PAULO HENRIQUE DE MELLO

Investigações morfológicas e metabólicas ao longo da ontogenia das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae)

"Morphological and metabolic investigations during the ontogeny of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) larvae"

Versão corrigida

São Paulo

2015

PAULO HENRIQUE DE MELLO

Investigações morfológicas e metabólicas ao longo da ontogenia das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae)

"Morphological and metabolic investigations during the ontogeny of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) larvae"

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Mello, Paulo Henrique de

Investigações morfológicas e metabólicas ao longo da ontogenia das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) / Paulo Henrique de Mello; Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton – São Paulo, 2015. 146 pg.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Larvas; 2. Ontogenia; 3. Ácidos graxos; 4. Morfologia; 5. *Epinephelus marginatus*
I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Agradecimentos

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pela amizade, confiança e orientação tão dedicada durante esses anos. Levarei sempre comigo tudo que aprendi e continuarei a aprender com você, jamais esquecerei os anos de trabalho no LAMEROA. Apenas tenho a agradecer pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal com uma das pessoas mais altruísta que conheço. Fica aqui minha gratidão, respeito e orgulho de ser seu aluno e parte do LAMEROA.

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão, que são a base para tudo na vida e que sempre me deram o exemplo que é preciso continuar e acreditar em nossos sonhos. Obrigado pelo incentivo, apoio e mesmo sabendo que a vida segue e pode nos distanciar fisicamente sempre estaremos presentes, seja no pensamento, seja no coração.

A minha família, primeiramente minha mulher Adriana por dividir comigo a felicidade de ser biólogo, pela cumplicidade, dedicação e por estar presente em todos os momentos. Ao meu filho João, meu melhor amigo e parceiro (futuro biólogo de carros) e com sua alegria de criança nos contagia e nos dá a força para continuar. A vocês dois meu obrigado especial, pois o amor de família, de pai é um sentimento indescritível.

Aos meus irmãos do LAMEROA Amanda, Aline, Bianca, Bruno, Kadu, Gabi, Cristiele, Jaja, Jaboti, Honji, Tiago, Vanessa, Ju Suzuki, Raísa, Gabriel, Mariana, Jéssica, Andreone e Walquiria. Sem a ajuda de cada um de vocês nada disso seria possível. Levarei todos esses anos de amizade e alegria comigo, seja no LAMEROA, C.A., coletas, etc, a benção foi graúda!

Em especial aos integrantes do verdadeiro Projeto Garoupa Bruno, Jajá, Jaboti, Mariana, Jéssica e Renata. Esses anos de projeto foram indescritíveis e nos mostrou como podemos avançar na pesquisa com dedicação, esforço e amor pelo que fazemos.

Galera esses anos em São Sebastião foram muito melhores do que eu imaginei, e hoje olhando pra trás vejo que realmente valeram a pena.

A todos os funcionários do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da Universidade de São Paulo que foram essenciais durante todas as etapas do Projeto Garoupa, desde a sua construção até os experimentos realizados. Ao pessoal da área técnica, diretoria, professores, motoristas, ao pessoal da cozinha, e em especial ao Seu Elso, Joseph (*in memoriam*), Zé Ilton, Profa. Áurea, Seu Luis, Elias e Paulo.

Aos amigos do CEBIMar pela amizade construída e pelo auxílio, seja no trabalho, com palavras de incentivo ou pelos momentos de diversão. Em especial a Mari, Pola e Caju por tudo, principalmente pela recepção durante tanto tempo na casa de vocês, fica aqui minha gratidão. Agradeço também ao Serginho, Sol, Pedro e Fernando, e aos outros colegas que ajudaram direta ou indiretamente no projeto garoupa.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em especial, à Roseli, Gisele, Prof. Eduardo Bicudo, Prof. Zé Gui, Prof. Gilberto, Marcilene, Vagnão e Suzi.

A FAPESP pelo suporte financeiro tanto no projeto no Brasil quanto ao estágio no exterior (processos 2011/12301-0 e 2014/03834-2). Ao CNPq (558992/2009-9) e a FAPESP (2011/50407-4) pelo suporte financeiro para a implantação e realização do Projeto Garoupa no CEBIMar.

Aos professores Dra. Neuza Takahashi, Dr. José Eduardo e Dr. Fernando Gomes pelas contribuições durante o exame de qualificação.

Aos funcionários e amigos do Hellenic Centre for Marine Research por tudo que me ensinaram e contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Agradeço em especial ao meu orientador (exterior) e amigo, o Prof. Dr. Constantinos C. Mylonas, serei sempre grato pela orientação, amizade e parceria no período no HCMR. Ao Dr. Ioannis E. Papadakis pela amizade e ensinamentos que sempre vou levar comigo.

Aos amigos de Iraklio, Giorgos, Maria, Katerina, Pantelis, Panos, Sarah, Tomasso, Ioannis, Irini, Maria, Hector e Mariana que certamente contribuíram para minha formação pessoal e profissional, Obrigado amigos, vocês me fizeram sentir em casa.

À Dra. Rossana Venturieri pelo apoio desde que iniciei no mestrado.

Aos meus amigos e primos de Barretos (em especial ao Flaviano, Duardão, Tiaguim, Heli, Cacá, Ademir e Robertim) e de São Paulo (em especial ao Sérgio, Marina, Fá, Tiago, Ken, Guida, Maurício, Alvinho, Thomaz, João Fera, Dedi e Afonso), obrigado por tudo que fizeram por mim e por estar sempre presente. Ao Marcelo Fortes Junqueira grande amigo. Todos vocês fizeram esse trabalho possível, mesmo às vezes distante, certamente fizeram parte dessa etapa.

À Claudia Kerber e Pedro da empresa Redemar Alevinos pelo apoio, colaboração e discussões sempre muito valiosas. Agradeço muito a vocês pela colaboração estabelecida durante esses anos.

Aos pescadores da Ilha do Montão de Trigo, pois sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus tios e tias, em especial ao tio Urias e tia Regina.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho fica aqui minha mais sincera gratidão.

Muito Obrigado!

Índice

Lista de abreviações i

Resumo Geral iv

General Abstract v

1. Introdução Geral 1

2. Objetivos 5

2.1. Geral 5

2.2. Específicos 6

3. Local e estruturas para condução do projeto 6

4. Espécie modelo – Garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus* Lowe 1834) (Teleostei: Serranidae) 8

4.1. Características gerais, classificação, hábito e ameaças 8

5. Materiais e Métodos 12

5.1. Obtenção dos reprodutores, experimentos de inversão sexual e criopreservação do sêmen 12

5.2. Indução a reprodução e fertilização artificial 13

6. Referências Bibliográficas 16

7. Figuras 22

Capítulo 1 - Embriogênese e desenvolvimento larval da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) reproduzida em cativeiro 28

Resumo 28

Abstract 29

1. Introdução 30

2. Materiais e Métodos 31

2.1. Manejo experimental 31

2.2. Coletas para a análise morfológica 33

2.2.1. Embriogênese e desenvolvimento larval 33

3. Resultados 33

3.1. Taxa de fertilização 33

3.2. Embriogênese 34

3.3. Período embrionário 34

3.4. Desenvolvimento larval 36

4. Discussão 38

5. Conclusões 44
6. Referências Bibliográficas 45
7. Figuras 50
Capítulo 2 - Alterações morfológicas ao longo da ontogenia das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) com enfoque no sistema digestório 59
Resumo 59
Abstract 60
1. Introdução 61
2. Materiais e Métodos 63
3. Resultados 65
3.1. Histologia das larvas 65
3.2. Saco vitelínico 65
3.3. Tubo digestório e Bucofaringe 65
3.4. Esôfago 66
3.5. Intestino 66
3.6. Estômago 67
3.7. Fígado e Pâncreas 67
3.8. Parâmetros morfométricos 67
3.8.1. Comprimento larval 67
3.8.2. Comprimento da boca 68
3.8.3. Área do saco vitelínico 68
5. Conclusão 79
6. Referências Bibliográficas 80
7. Figuras 87
Capítulo 3 - Ácidos graxos como uma ferramenta de investigação metabólica durante a ontogenia das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) 101
Resumo 101
Abstract 102
1. Introdução 103
2. Materiais e Métodos 105
2.1. Coleta das amostras 105
2.2. Lipídios Totais 106

2.3. Perfil de ácidos graxos 106
2.3. Análise dos resultados - Análise Estatística 107
3. Resultados 108
3.1. Ácidos graxos 108
3.1.1. Fração Neutra 108
3.1.2. Fração Polar 109
5. Conclusão 120
6. Referências Bibliográficas 121
7. Figuras 127
Discussão Geral 135
Referências Bibliográficas 141

Lista de abreviações

AG – Ácidos graxos

ARA – Ácido araquidônico do inglês *"Arachidonic acid"*

BF – Bucofaringe

BL – Bolsas Longitudinais

CB – Cavidade Bucal

CC – Células Caliciformes

CEBIMar – Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CSM – Células Secretoras de Muco

DAE – Dias após a eclosão

DAF – Dias após a fertilização

DF – Dentes Faríngeos

DHA – Ácido docosahexanóico do inglês *"Docosahexaenoic acid"*

EC – Esfíncter Cardíaco

EFA – Ácidos graxos essenciais do inglês *"Essential fatty acids"*

EN – Encéfalo

EP – Esfíncter Pilórico

EPA – Ácido graxo eicosapentanóico do inglês *"Eicosapentaenoic acid"*

ES – Esôfago

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FG – Fígado

GC – Cromatógrafo a Gás

GL – Gota de Lipídio

hCG – Gonadotropina coriônica humana

HG – Horas Grau

HUFA – Ácidos graxos altamente insaturados do inglês "*Highly unsaturated fatty acid"*

IA – Intestino Anterior

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IM – Intestino Médio

IN – Intestino

IP – Intestino Posterior

IUCN - *The World Conservation Union*

LAMEROA – Laboratório de metabolismo e reprodução de organismos aquáticos

LI – Lúmen Intestinal

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MUFA – Ácidos graxos monoinsaturados do inglês *"Monounsaturated fatty acids"*

N – Notocorda

N_2 - Nitrogênio

OL – Olhos

PA – Pâncreas

PEAD – Polietilieno de Alta Densidade

PG – Papilas Gustativas

PI – Pigmentação

PL – Fosfolipídios do inglês "*Phospholipids"*

PUFA – Ácidos graxos polinsaturados do inglês *"Polyunsaturated fatty acid"*

RE – Reto

RI – Rins

SFA – Ácidos graxos saturados do inglês *"Saturated fatty acids"*

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SV – Saco Vitelínico

TD – Trato Digestório

TG – Triglicerídeos do inglês *"Triglycerides"*

UI – Unidades Internacionais

USP – Universidade de São Paulo

UTA – Unidades Térmicas Acumuladas

VI – Válvula Íleo retal

Resumo Geral

O presente projeto analisou o perfil dos ácidos graxos, embriogênese e ontogenia do sistema digestório das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias de desenvolvimento. Além disso, descrevemos como os embriões se dividem, eclodem e desenvolvem suas principais características, como se desenvolve seu sistema digestório ao longo dos primeiros dias de desenvolvimento e como utilizam os AG durante os primeiros 8 dias de desenvolvimento. Observamos que as larvas da garoupa apresentam desenvolvimento de suas estruturas digestórias relativamente lento, no entanto, estas são capazes de capturar, ingerir e digerir presas já a partir do 4ºDAE. Os ovos da garoupa verdadeira são compostos por elevados percentuais de PUFA nos fosfolipídios e para o processo de eclosão utilizam preferencialmente os SFA dos fosfolipídios. Além disso, os PUFA da série n3 sobrepõem-se aos da série n6, principalmente o DHA, que apresentaram valores elevados em comparação com outras espécies marinhas tanto nos fosfolipídios quanto nos triglicérides nos três primeiros dias de desenvolvimento. As larvas apresentam uma elevada necessidade dos HUFAs DHA/EPA, e durante essa fase é importante a utilização de alimento vivo de tamanho reduzido (copépodes ou rotíferos da variedade "*SS strain*" *Brachionus rotundiformes*) enriquecidos com valores da relação entre DHA/EPA acima de 2,0. Com isso, todo o conhecimento gerado durante esses dias de desenvolvimento já permitem a aplicação deste conhecimento no processo de embriogênese e larvicultura da garoupa verdadeira contribuindo para alavancar sua domesticação e produção em cativeiro e elaborar futuramente um programa de repovoamento desta espécie contribuindo para sua conservação.

Palavras-chave: Larvas, ácidos graxos, embriogênese, larvicultura, garoupa verdadeira.

General Abstract

This project analyzed the fatty acid profile, embryogenesis and ontogeny of the digestive system of dusky grouper *Epinephelus marginatus* larvae during the first days of development. Furthermore, we described how the embryos are divided, hatch and develop its main features, and how they develop its digestive system during the first days of development, and how they use the FA during the first 8 days of development. We observed that the grouper larvae present relative slow development of their digestive structures, however, the larvae are able to capture, ingest and digest preys already from 4ºDAE. The dusky grouper eggs are composed by high percentages of PUFA in phospholipids and for the hatching process it uses preferably the SFA of phospholipids. Additionally, the n3 series PUFAs overlaps the n6 series, especially DHA, which exhibited high values compared to other marine species both in phospholipids as in the triglycerides during the first three days of development. The larvae exhibit a high requirement of HUFAs DHA/EPA, and during this phase is important to use live food of small size (copepods or "SS strain" *Brachionus rotundiformes*) enriched with the ratio of DHA/EPA levels above 2.0. Thus, all the knowledge generated during these days of development allow us the application of this knowledge in the embryogenesis and hatchery process of the dusky grouper contributing to leverage its domestication and production in captivity and eventually draw up a restocking program of this species contributing to their conservation.

Key-words: Larvae, fatty acids, embryogenesis, larval rearing, dusky grouper.

1. Introdução Geral

Muitos organismos durante seu ciclo de vida apresentam um estágio larval que é morfologicamente distinto dos adultos, ou podem ainda, habitar um ambiente diferente daquele que viverá quando adulto. Estes organismos apresentam desenvolvimento indireto, as larvas passam pelo processo de metamorfose, se transformam em, ou são substituídas pelos adultos (Hall e Wake, 1999).

O período larval é um período crucial na vida das larvas de peixes marinhos e durante essa fase as larvas irão adquirir características fenotípicas de peixes adultos, acompanhado pelo desenvolvimento de tecidos e órgãos, além da maturação de alguns dos principais sistemas fisiológicos (Mazurais *et al*., 2011).

Tais alterações ocorrem de várias formas e podem ser comportamentais, morfológicas, bioquímicas e/ou fisiológicas (Chu e Ozkizilcik, 1995). Neste período embrionário e larval os processos dominantes são a diferenciação de tecidos e o crescimento respectivamente, processos estes que modulam as alterações na mobilização dos recursos energéticos e estruturais que, por fim, resultarão nas alterações morfológicas que ocorrem durante a ontogenia. Estes processos morfofisiológicos são muito importantes e podem indicar as exigências e necessidades tanto nutricionais quanto fisiológicas durante essa fase do desenvolvimento (Bromage, 1995).

Muitos estudos relatam que as principais alterações metabólicas e bioquímicas ocorrem durante as fases de embriogênese e larval (Chu e Ozkizilcik, 1995; Bromage, 1995; Holt, 2011). A maioria dessas mudanças ocorre no perfil lipídico uma vez que este é um dos principais substratos metabólicos utilizados durante essa fase (Chu e Ozkizilcik, 1995).

Do início da ontogenia (fertilização) até o momento da abertura da boca as larvas de peixes são exclusivamente alimentadas pelo vitelo. A condição fisiológica das larvas que inclui as reservas vitelínicas, a razão do tamanho do saco vitelínico/corpo da larva, densidade e sua condição nutricional são determinadas durante o processo de vitelogênese e variam entre as espécies, idade e qualidade nutricional dos reprodutores durante a maturação dos ovários (Balon, 1999).

O estímulo que desencadeia o início da vitelogênese é ambiental (ex. fotoperíodo e chuvas) e integrado ao controle endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, estimula o fígado a produzir a vitelogenina. Durante a vitelogênese, a vitelogenina (fosfoglicolipoproteína) é produzida no fígado e é transportada via corrente sanguínea até sua incorporação nos oócitos e ao final da incorporação da vitelogenina nos oócitos, estes irão iniciar a segunda fase do ciclo reprodutivo através dos processos de maturação final e ovulação (Mylonas e Zohar, 2001).

Segundo Jalabert (2005) o vitelo é composto principalmente de proteínas (79%) e lipídios (19%). Estes têm papel central na taxa de crescimento e no desenvolvimento, sendo os lipídios a principal fonte de energia metabólica (Rainuzzo *et al*., 1997), além de ácidos graxos essenciais (EFA, do inglês - *essential fatty acids*) até que a alimentação endógena seja estabelecida (Ozkizilcik *et al*., 1995).

Os lipídios representam um dos grupos de biomoléculas mais diverso estrutural e funcionalmente (Sheridan, 1994) e, dentre estas, os fosfolipídios (PL) que juntamente com os esteróis, são os principais componentes das membranas biológicas, sendo imprescindíveis para inúmeras funções biológicas (Nelson e Cox, 2005), como: crescimento, resistência ao estresse e aumento de sobrevivência durante os períodos larvais e juvenis (Azarm *et al*., 2012). Além disso, são precursores de uma variedade de mediadores biologicamente ativos do metabolismo como: diacilgliceróis, fosfato de

inositol, fatores ativadores de plaquetas (Tocher *et al*., 2008) e fonte de ácidos graxos (AG) (Gurr e Harwood, 1991).

Outra classe importante de lipídios são os triglicerídeos (TG), que são estruturalmente compostos por três AG unidos por ligações ésteres a um glicerol. Estes atuam como a principal fonte de energia, sendo catabolizados para prover energia metabólica para o desenvolvimento da larva, além de fornecer AG essenciais, agirem na síntese de membranas, e são importantes moduladores do metabolismo e sinalizadores químicos (Gurr e Harwood, 1991).

Os AG altamente insaturados (HUFA, do inglês - *highly unsaturated fatty acids*) como o ácido docosahexanóico (DHA C22:6n3), ácido eicosapentanóico (EPA C20:5n3) e ácido araquidônico (ARA C20:4n6) constituem importantes componentes estruturais durante a organogênese, sendo abundantes nas membranas das células (principalmente células cerebrais e retina) e são precursores da atividade de moléculas como os eicosanoides (Abi-Ayad *et al*., 2004). Estes HUFAs são considerados EFAs, o que significa que necessariamente devem ser ingeridos na dieta (Izquierdo e Koven, 2011).

O perfil dos AG presentes nas larvas são ferramentas para investigar como funciona o metabolismo lipídico, por exemplo, as espécies de peixes marinhos possuem elevados níveis de HUFAs (DHA, EPA e ARA) em seus oócitos e tecidos (larvas) e estes níveis podem indicar que esses animais têm uma elevada necessidade nutricional desses AG durante as fases iniciais do desenvolvimento. Além disso, conhecer alterações metabólicas dos AG durante essa fase inicial (ovos e larvas) podem indicar as necessidades nutricionais destas larvas durante o seu desenvolvimento inicial (Hemming e Buddington, 1988; Chu e Ozkizilcik, 1995) e podem ser aplicadas no cultivo das espécies estudadas.

Além dos estudos na fisiologia, estudos morfológicos com enfoque na morfologia digestória vêm sendo conduzidos nos últimos 20 anos, visando não somente o conhecimento científico das espécies de peixes marinhos, mas sua aplicação no cultivo de algumas espécies alvo e em potencial determinadas espécies que apresentam dificuldades no seu cultivo em cativeiro (Zambonino-Infante *et al*., 2008).

O conhecimento da diferenciação do trato digestório, aliado às mudanças na digestão e processo de assimilação dos alimentos, são pontos necessários para o entendimento da fisiologia nutricional em larvas de peixes. Além disso, são importantes para sincronizar práticas alimentares e protocolos de cultivo com o estágio de desenvolvimento (Hoehne-Reitan e Kjorsvik, 2004).

Sabemos que o período larval representa um período transicional no qual a larva é influenciada pelo ambiente, por suas reservas vitelínicas, e posteriormente pelos nutrientes incorporados na dieta (Zambonino-Infante e Cahu, 2007). Sua habilidade em assimilar nutrientes dependerá diretamente dessas variáveis, bem como, da sua habilidade intrínseca em modular seus processos metabólicos e digestórios para assim progressivamente adquirir a capacidade de digestão do adulto que é essencial para seu desenvolvimento e passagem para a fase de juvenil (Zambonino-Infante e Cahu, 2007). Com isso, informações sobre o desenvolvimento do sistema digestório são ferramentas muito utilizadas para elaborar protocolos alimentares específicos.

No Brasil devido aos fortes tipos de pressão antrópica, espécies de ambientes costeiros oceânicos vêm apresentando reduções significativas de suas populações, chegando a, em alguns casos, ameaça de extinção. As espécies mais ameaçadas são geralmente importantes recursos pesqueiros e economicamente mais valiosos e sua sobreexplotação acarreta no aumento de espécies de menor valor comercial que ocupam os nichos liberados pelas espécies mais impactadas. Este quadro caracteriza um

ambiente em desequilíbrio e pode ocasionar uma séria ameaça ao desenvolvimento sustentável dos recursos pesqueiros (FAO, 2014).

Nos últimos anos a sobreexplotação dos recursos marinhos é o principal problema destes sistemas em todo o mundo. Segundo as estimativas da FAO (*Food and Agricultural Organization*) atualmente cerca de 61% dos estoques naturais de peixes marinhos foram completamente explorados ou atingiram o máximo admissível, cerca 28% encontram-se sobreexplotadas e cerca de 10% estão se recuperando da intensa exploração (FAO, 2014).

Esta situação que os ambientes marinhos veem sofrendo leva à busca de estratégias mitigadoras de conservação e, com o estoque natural dos peixes cada vez mais reduzido, o repovoamento e a aquicultura surgem como opção direta para a manutenção das espécies. Este quadro inclui a garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae) espécie hermafrodita protogínica que foi escolhida para esta pesquisa. Desta forma, o presente projeto analisou o perfil dos AG, embriogênese e ontogenia do sistema digestório, além de aspectos morfológicos durante o desenvolvimento das larvas da garoupa verdadeira visando à aplicação deste conhecimento no processo de embriogênese e larvicultura contribuindo para alavancar sua produção em cativeiro e elaborar futuramente um programa de repovoamento desta espécie contribuindo para sua preservação.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Investigar as alterações metabólicas e morfológicas das larvas de *Epinephelus marginatus* visando entender de que forma os animais se desenvolvem

morfologicamente e de que forma utilizam alguns substratos metabólicos durante o período larval.

2.2. Específicos

Para investigar o desenvolvimento ontogenético, os seguintes objetivos específicos foram traçados, visando aplicar esse conhecimento no cultivo e domesticação da espécie:

- Descrever a embriogênese dessa espécie, visando conhecer aspectos básicos do desenvolvimento;

- Descrever as alterações histomorfológicas das larvas com enfoque no trato digestório e suas principais células;

- Descrever dados morfométricos básicos, como crescimento, área do saco vitelínico e tamanho da boca;

- Analisar aspectos do metabolismo lipídico (perfil de ácidos graxos) e suas alterações ao longo da larvicultura.

3. Local e estruturas para condução do projeto

Para a condução do projeto foram construídas estruturas para acondicionamento, reprodução e larvicultura no Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar), localizado no município de São Sebastião, SP, Brasil (figura 3A e B). Toda a estrutura foi montada com recursos dos projetos financiados pelo CNPq (Edital 36/2009) e FAPESP (processo FAPESP nº 2011/50407-4).

As estruturas para reprodução e larvicultura (figuras 3C, D, E e F) foram construídas entre os anos de 2010/11. O ponto de captação de água (mangueira de PEAD) foi colocado a cerca de 50 metros para dentro do mar (próximo ao marégrafo) a

uma profundidade aproximada de 4 metros. A água do mar é enviada ao poço de captação que está localizado na beira da praia, por gravidade. O sistema de bombeamento, localizado dentro do poço artificial, conta com duas bombas de 3cv cada (figura 4B). Estas bombeiam a água do mar para os filtros de areia (figura 4D) que, por fim, é liberada em um reservatório de $50m^3$ de capacidade (figura 4C) que se localiza em um ponto mais alto em relação às estruturas de cultivo. A partir do filtro a água do mar entra por gravidade no sistema de cultivo, bem como para outras dependências do CEBIMar. O sistema de aeração conta com um soprador de ar de 1,5cv de capacidade (figura 4A) e é distribuído para todos os tanques de reprodução e tanques de larvicultura com mangueiras e difusores de ar (figuras 4E e F).

A estrutura para acondicionamento dos reprodutores (figura 3C) é composta por três tanques circulares de lona plástica de PVC, com reforço de fios de poliéster (Vinitank, SANSUY®), um tanque de $17m^3$ (figuras 3D e 4E) e dois de $9.6m^3$ (figuras 3D e 4E), com a média de densidade de $2.3kg/m^3$. A estrutura para o acondicionamento dos ovos e das larvas, conta com oito tanques de fibra de vidro (caixas dágua) de $2m^3$ com interior revestido com tinta epóxi (tinta atóxica) (figuras 3E e 4F). A água utilizada nas estruturas para os reprodutores e para as larvas abastece o sistema por gravidade. A água utilizada para a larvicultura ainda atravessa outro filtro em um sistema com diferentes capacidades de filtragem (micragens de 100, 25 e 5µm) e, posteriormente, passa por um sistema de esterilização com luz ultravioleta para garantir boa qualidade da água.

Para a produção de alimento vivo (rotíferos e artêmias) foram utilizadas seis incubadoras de 60 litros e três de 120 litros (figuras 3F e 5A) que também são abastecidas com o sistema de filtragem e esterilização descrito acima.

4. Espécie modelo – Garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus* Lowe 1834) (Teleostei: Serranidae)

4.1. Características gerais, classificação, hábito e ameaças

Os serranídeos (família Serranidae, sub-família Epinephelinae) compreendem 475 espécies distribuídas em 64 gêneros (Heemstra *et al.*, 2003; Nelson, 2006). A garoupa verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae), é um peixe teleósteo, hermafrodita sequencial, protogínico, característico do litoral rochoso, que vive desde águas rasas até profundidades de mais de 200 metros. Sua distribuição é bastante ampla ocorrendo desde o litoral sudeste do Brasil até em países como Argentina e Uruguai (Irigoyen *et al.*, 2005), assim como em todo o mar Mediterrâneo, Atlântico leste; das Ilhas Virgens Britânicas a África do Sul, Açores, Madeira, Canárias e Cabo Verde (Barreiros, 1995) além de países mais ao sudoeste e sul da África, com distribuição até Moçambique e Madagascar (Heemstra e Randall, 1993). Esta espécie possui importância econômica em praticamente todas as regiões em que ocorre, por sua importância ecológica, além da pesca e produção para a comercialização.

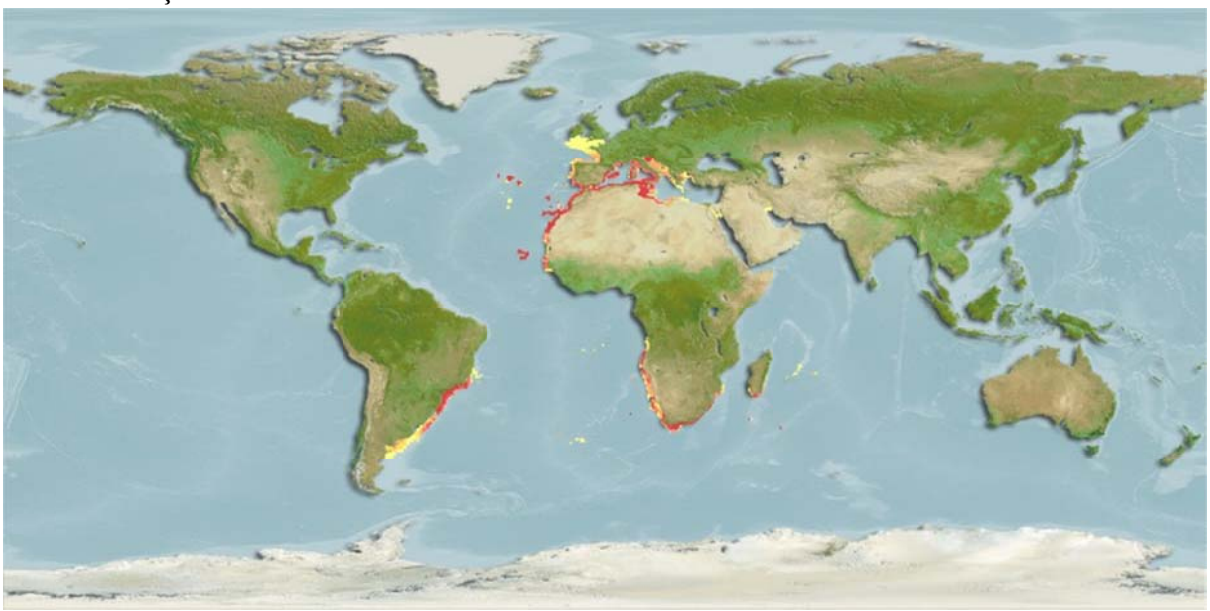


Figura 1. Mapa mundial com a distribuição da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*. Fonte: www.fishbase.org.

A classificação da garoupa verdadeira é a seguinte:

Super Classe: Pisces

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Subordem: Percoidae

Família: Serranidae

Sub-família: Epinephelinae

Gênero: *Epinephelus*

Espécie: *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834)

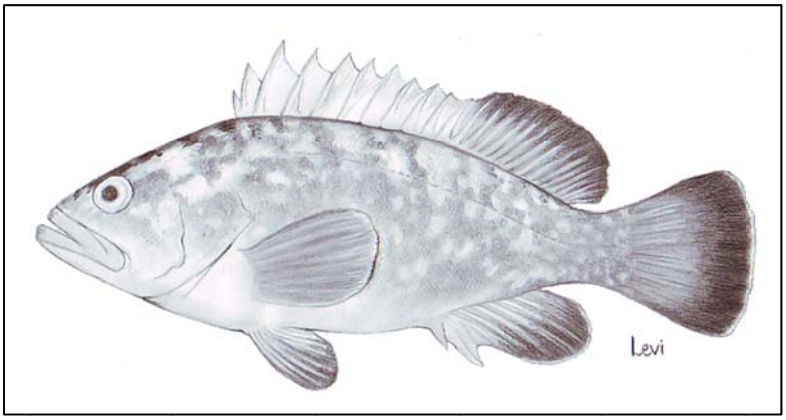


Figura 2. Garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae).

A maturação sexual da garoupa verdadeira nas fêmeas ocorre quando o indivíduo atinge 45cm de comprimento e em média 2kg e uma idade aproximada de 5 anos. Sendo animais protogínicos apresentam a primeira maturação sexual como fêmea e invertem o sexo ao longo da vida. Sua inversão sexual na natureza ocorre a partir dos 83cm de comprimento, 9kg de massa corpórea e aproximadamente a partir dos 9 anos de idade (Chauvet, 1981; Bruslé, 1985; Spedicato *et al*., 1995; Andrade *et al*., 2003) sob influência de diversos estímulos (sociodemográfico, comportamental, hormonal, etc).

Devido às diversas características como a forte pressão de pesca aliada à falta de planejamento de manejo desta espécie, a maturação sexual tardia dos machos (cerca de 10 anos), a agregação na época reprodutiva e a ampla utilização na culinária mundial levaram à inclusão de *Epinephelus marginatus* na lista da IUCN (*The World Conservation Union*) como espécie sobrexplotada no mundo (Cornish *et al.*, 2004) e recentemente, mais especificamente, no Estado de São Paulo (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho *et al*., 2009). Recentemente o MMA (Ministério do Meio Ambiente) lançou a portaria 445/2014 (Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos) que proíbe a pesca da garoupa verdadeira em todo o território nacional.

Diante de todas as ameaças a esta espécie, devido à qualidade de sua carne, comportamento dócil, agregação reprodutiva e maturação tardia dos machos sua produção em cativeiro surge como opção direta na tentativa de reverter este quadro de ameaças. Atualmente alguns países produzem algumas espécies de garoupas visando comercialização como, por exemplo, os países do sudeste asiático, principalmente países como a China, Taiwan, Indonésia, Malásia, Filipinas e Vietnam (Liao e Leaño, 2008). Sua produção mundial totalizou 75.520 toneladas em 2009 segundo dados da FAO (Aquaculture Asia Pacific, 2012).

As principais espécies de garoupa produzidas no continente asiático são: *orange spotted grouper* (*Epinephelus coioides*), *brown-marbled grouper* (*Epinephelus fuscoguttatus*), *malabar grouper* (*Epinephelus malabaricus*), *dusky-tail grouper* (*Epinephelus bleekeri*), *giant grouper* (*Epinephelus lanceolatus*), *humpback grouper* (*Cromileptes altivelis*) e *coral grouper* (*Plectropomus leopardos*). Na Ásia sua produção é tradicionalmente realizada por pequenos e médios produtores em tanques

rede com estruturas rudimentares, e em regiões costeiras, com litoral abrigado (Liao e Leaño, 2008).

No entanto, sua produção no Brasil seja comercial ou visando repovoamento, ainda são incipientes. No momento no Brasil existem apenas dois locais que visam à reprodução e larvicultura da garoupa verdadeira em cativeiro, sendo um para a produção comercial e o outro para a pesquisa aplicada. O primeiro é a empresa Redemar Alevinos, localizada no município de Ilha Bela, e o segundo é a base experimental do LAMEROA no CEBIMar, localizada no município de São Sebastião, ambos no litoral norte de São Paulo. Além destes dois projetos que visam à reprodução em cativeiro e produção de larvas e juvenis, existe apenas um projeto voltado para a educação ambiental que atua também no litoral norte do estado de São Paulo e litoral sul do Rio de Janeiro que atuam em parceria com a empresa Redemar Alevinos.

Durante os anos de projeto conseguimos diversos avanços como, por exemplo, o estabelecimento da reprodução, domínio da inversão do sexo (Garcia *et al*., 2013) e criopreservação (Garcia *et al*., dados não publicados). No entanto, de todas as fases de cultivo de espécies marinhas a fase de larvicultura ainda é a que mais apresenta problemas de uma forma geral. Essa etapa ainda é considerada o maior entrave para a produção em grande escala, seja comercial ou para o repovoamento (Khono *et al*., 1997). Além disso, muitos produtores relatam mortalidade em massa durante as fases de larvicultura de outras espécies de garoupa, especialmente entre o 4º e 9º dias após a eclosão (Khono *et al*., 1990; Doi *et al*., 1991).

Segundo Glamuzina *et al.* (1998), os membros da família Epinephelinae apresentam um desenvolvimento inicial muito similar, caracterizado por um padrão de larvas pequenas, frágeis, e com o tamanho bucal reduzido na primeira alimentação. O diâmetro inicial do ovo varia de 0.8-1.0mm e o comprimento total no momento da

eclosão varia de 1.6-2.3mm. Khono *et al*. (1997) avaliaram o crescimento ósseo em larvas de *E. coioides* e observaram que essas larvas apresentam pequeno aparato bucal nos primeiros dias de alimentação.

Diante dos aspectos acima abordados observamos a necessidade de aprofundar os estudos durante essa fase inicial do desenvolvimento dessa espécie abordando aspectos morfológicos e fisiológicos fornecendo subsídios para a produção e cultivo das larvas e juvenis da garoupa verdadeira, visando a sua aplicação no cultivo da espécie em cativeiro, contribuindo para alavancar sua produção, além de indiretamente auxiliar na manutenção de seus estoques naturais.

5. Materiais e Métodos

5.1. Obtenção dos reprodutores, experimentos de inversão sexual e criopreservação do sêmen

Para viabilizar a reprodução induzida, no ano de 2012/13, realizamos previamente o processo de inversão de sexo de alguns exemplares jovens para a obtenção do sêmen. Os animais utilizados nesse experimento foram provenientes do ambiente natural e foram adquiridos junto a pescadores artesanais da Ilha do Montão de Trigo, localizada próxima à praia da Barra do Una, localizada no município de São Sebastião, São Paulo. As coletas foram todas autorizadas pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pertencente ao MMA (Ministério do Meio Ambiente) através da autorização para atividades com finalidade científica nº 33668-3.

Para a inversão do sexo, doze animais jovens com média entre 2 e 3kg foram capturados e transferidos em tanques plásticos com volume de $1m^3$ com água do mar com cilindro de oxigênio acoplado para o CEBIMar, onde foram acondicionados em

tanques de $2m^3$ durante 15 dias. Após aclimatização os animais foram anestesiados (benzocaína 100mg/l) e identificados com microchips (*transponders* - TROVAN). Após a identificação, foram transferidos para os tanques de $10m^3$ (3D), onde permaneceram durante todo o processo para a inversão do sexo, que foi realizado segundo Garcia *et al*. (2013). Os animais receberam duas doses de 100mg/kg de IA (inibidor de aromatase – Letrozole, lote: 080328 Venturepharm, Beijing, China) diluídas em 2,0ml de óleo de fígado de bacalhau (figura 5B), que foi aplicada com intervalo de 30 dias. O processo de inversão foi concluído em nove semanas sendo que todos os animais ao final do experimento possuíam sêmen viável. Após a inversão do sexo, realizamos o processo de criopreservação do sêmen seguindo protocolo de Sanches *et al*. (2009).

5.2. Indução a reprodução e fertilização artificial

Para a condução dos experimentos com os ovos e larvas foram realizadas a reprodução induzida e fertilização artificial dos oócitos e sêmen no ano de 2012/13.

Com o processo de inversão sexual concluído, os machos foram anestesiados em benzocaína (100mg/l) e injetados com 1000UI/kg de Gonadotropina Coriônica Humana (hCG, Ovidrel, Serono) (injeção para indução aplicada no mesmo local da figura 5B) para estimular a espermiação (este processo será descrito em detalhes abaixo).

As fêmeas utilizadas nesse experimento são provenientes do ambiente natural. Os exemplares foram adquiridos junto aos pescadores da Ilha do Montão de Trigo, localizada próxima à praia da Barra do Una, localizada no município de São Sebastião, São Paulo. As coletas desses exemplares foram todas autorizadas pelo SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) pertencente ao MMA (Ministério do Meio

Ambiente) através da autorização para atividades com finalidade científica número 33668-3.

Após a indução hormonal, os machos e as fêmeas foram estocados em 3 tanques circulares de lona plástica de PVC, com reforço de fios de poliéster (Vinitank, SANSUY®), um tanque de 17 m^3 (figura 3D e 4E) e dois de 9.6 m^3 (figura 3D e 4E); com a média de densidade de cerca de 2.3kg/m^3. Os peixes foram mantidos sob fotoperíodo natural e a renovação da água foi de cerca de 100% ao dia. Os reprodutores foram alimentados 3 vezes por semana com pedaços de peixes frescos (sardinha e bonito) e cefalópodes (lula e polvo) uma vez por semana.

Como foi descrito anteriormente, a desova espontânea de *E. marginatus* não ocorre em cativeiro. Desta forma, a reprodução induzida artificialmente com suplementação hormonal foi conduzida para a obtenção dos gametas. As fêmeas com oócitos maiores que 350µm foram induzidas a ovulação com duas doses de 1000UI de hCG/kg totalizando 2000UI/kg de peixe com auxílio de uma seringa e agulha (injeção para indução aplicada no mesmo local da figura 5B). O hormônio foi injetado na cavidade abdominal logo abaixo da nadadeira peitoral com intervalo de 17 horas entre as doses (figura 5B). Após a segunda dose hormonal, as fêmeas foram avaliadas a cada 6 horas, uma vez que a garoupa apresenta múltiplas ovulações. A cada verificação os animais foram canulados (com auxílio de cânula e seringa) (figura 5C) e tinham uma pequena amostra de oócitos coletados (biópsia) para avaliação do diâmetro oocitário sob estereomicroscópio (figura 5F). Após as averiguações, caso estivessem ovulando, as fêmeas eram extrusadas (figura 5E) e os oócitos ovulados (figura 5F) retirados e posteriormente fertilizados com o sêmen criopreservado.

Para a fertilização artificial foram utilizados 2µl de sêmen para cada 5ml de oócitos. Os oócitos coletados por extrusão foram mantidos em recipientes de vidro

estéreis (béquer 200ml) na mesma temperatura da água do tanque, e, em seguida o sêmen que havia sido previamente descongelados foi adicionado ao béquer que continha os oócitos. Os oócitos e o sêmen foram levemente misturados com auxílio de uma colher de plástico e em seguida foi adicionada água do mar previamente filtrada e esterilizada em um volume de 10 vezes o volume total dos óocitos. Imediatamente após a coleta do sêmen, uma alíquota foi avaliada quanto à motilidade e densidade dos espermatozoides, em microscópio óptico. Os espermatozoides foram ativados em água do mar na proporção de 1:1000 e os ovos fertilizados foram transferidos para um béquer de 2L contendo água do mar misturada ao sêmen e levemente agitado por cerca de 2-5 minutos para permitir a fertilização.

Após 10 minutos foram estimadas as taxas de fertilização. Em seguida, os ovos foram transferidos para os tanques de cultivo de $2m^3$ contendo água do mar esterilizada (Ultra-Violeta) e com aeração suave e sem renovação de água, até o momento da eclosão, em uma densidade de 16 ovos/litro (Boglione *et al*., 2011).

Após a segunda indução hormonal das fêmeas foram estimados os valores em horas grau (HG) para a ovulação ou unidades térmicas acumuladas (UTA), que é calculada a partir da soma das temperaturas por hora, calculados a partir da segunda dose, até o momento da ovulação.

Vale lembrar que para todas as larviculturas realizadas, os protocolos adotados foram os mesmos. Os procedimentos do presente trabalho foram submetidos e aprovados no Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP (Protocolo 055/2008).

6. Referências Bibliográficas

Abi-Ayad, S.M.E.A.; Boutiba, Z.; Mélard, C.; Kestemont, P. 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30:129-136.

Andrade, A.B.; Machado, L.F.; Hostim-Silva, M.; Barreiros, J.P. 2003. Reproductive Biology of the Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46:373-381.

Asia Pacific Aquaculture, 2012. Groupers in Asia. 8:(2). p.5.

Azarm, H.M.; Kenari, A.A.; Hedayati, M. 2012. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture Research*, 1-11.

Balon, E. 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses. *Environmental Biology of Fishes*, 56:17-38.

Barreiros, J.P. 1995. Aspectos do comportamento e reprodução do mero *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) nos Açores. Angra do Heroísmo. Dissertação, Universidade dos Açores.

Boglione, C.; Marino, G.; Giganti, M.; Longobardi, Ç.D.; Kamaci, O.; Saka, S.; Firat, K.; Alpbaz, A. 2011. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1934) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture*, 291:48-60.

Bromage, N.R.; Roberts, R.J. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Univ. Press. Cambridge.

Bruslé, J. 1985. Exposé synoptique des données biologiques sur les mérous, *Epinephelus aeneus* (G. St-Hilaire, 1809) et *E. guaza* (Linné, 1758) de l'Océan Atlantique et de la Méditerranée. FAO, Synopsis sur les peches, 129:1-64.

Chauvet, C. 1981. Calcul par otolithométrie de la relation log.-Td'Epinephelus guaza (Linné, 1758) de la côte nord de la Tunisie. Rapp. P.V. *Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Méditerranée*, 27(5):103-106.

Chu, F.L.E.; Ozkizilcik, S. 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 11:665-674.

Cornish, A.; Harmelin-Vivien, M. 2004. *Epinephelus marginatus*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.

Doi. M.; Munir, M.N.; Razali N.L.N.; Zulkiffi, T. 1991. Artificial propagation of the grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demongo Terrengganu, Malaysia. Kertas Pengembangan Perikanan, 167:41pp.

Falk-Petersen, S.; Sargent, J.R.; Fox, C.; Falk-Petersen, I.B.; Haug, T.; Kjorsvik, E. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Marine Biology*, 101:553-556.

Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2014.

Garcia, C.E.O.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Narcizo, A.M.; Rodrigues-Filho, J.A.; Medrado, A.T.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M.; Moreira, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex-change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, 192:170-180.

Glamuzina, B.; Skaramuca, B.; Glavic, N.; Kozul, V. 1998. Preliminary studies on reproduction and early stage rearing trial of dusky grouper. *Aquaculture Research*, 29:769-771.

Goçalo, C.G. 2015. Análise do comportamento natatório de larvas de peixes marinhos com técnicas de imageamento de alte frequência. Tese de Doutorado. 121p.

Gurr, M.I.; Harwood, J.L. 1991. Lipid Biochemistry. Chapman & Hall. Fourth Edition.

Hall, B.K.; Wake, M.H. 1999. Introduction: Larval development, evolution, and ecology. In: *The origin and evolution of larval forms*. Hall, B.K.; Wake, M.H. (eds), p.1-19. Academic Press, San Diego, CA.

Heemstra, P.C.; Anderson Jr, W.D.; Lobel, P.S. 2003. Serranidae. In Carpenter K.E. (ed). The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 2: Bonny fishes part 1 (Ascipenseridae to Grammatidae). FAO species identification guide for fisheries purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication Nº5. Rome: FAO, pp. 1308-1369.

Heemstra, P.C.; Randall, J.E. 1993. FAO Species Catalogue, 16. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. p.522.

Heming, T.A.; Buddington, R.K. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In Fish Physiology, vol. XIA (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 407-446. New York: Academic Press.

Hoehne-Reitan, K.; Kjorsvik, E. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas. *American Fisheries Society*, 40:9-36.

Holt, G.J. 2011. Larval Fish Nutrition. In: Digestive Development and Nutrient Requirements. Lipids. Izquierdo. M.; Koven, W. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Irigoyen, A.J.; GALVA, D.E.N.; VENERUS, L.A. 2005. Occurrence of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in gulfs of northern Patagonia, Argentina, *Journal of Fish Biology*, 67:1741-1745.

Izquierdo. M.; Koven, W. 2011. Lipids. In: Larval Fish Nutrition. Digestive Development and Nutrient Requirements. Holt, G.J. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Jagadis, I.; Ignatius, B.; Kandasami, D.; Khan, M.A. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquaculture Research*, 37:1140-1145.

Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, 45:261-279.

Kohno, H.; Diani, S.; Sunyoto, P.; Slamet, B.; Imanto, P.T. 1990. Early developmental events associated with changeover of nutrient sources in the grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, larvae. *Fisheries Resources Bulletin (Indonesia)*. Special Edition, 1:51-64.

Kohno, H.; Ordonio-Aguilar, R.; Ohno, A.; Taki, Y. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Resources*, 44:267-274.

Lazo, J.P.; Darias, M.J.; Gisbert, E. 2011. Ontogeny of the digestive tract. In: Holt, G.J. *Larval Fish Nutrition*. First edition, Ed. John Wiley &Sons. pp. 5-46.

Leu, M.Y.; Liou, C.H.; Fang, L.S. 2005. Embryonic and larval development of the malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). *Journal of Marine Biology*, 85:1249-1254.

Liao, I.C.; Leaño, E.M. 2008. The Aquaculture of Groupers. Ed. Asian Fisheries Society, Phillipines. p. 241.

Mazurais, D.; Darias, M.; Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Canadian Journal of Zoology*, 89(7):599-611.

Mylonas, C.C.; Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10:463-491.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2005. Lehninger: Principles of biochemistry. Freeman, New York, EUA, 1119 p.

Nelson, J.S. Fishes of the world. 4ª edição. New York: John Wiley & Sons. 601p. 2006.

Ozkizilcik, S.; Chu, F.L.E.; Place, A.R. 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113B(3):631-637.

Parrish, C.C.; Brown, J.A.; Daniel, E.S.; Somerton, D.C. 1993. Lipid composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs over the spawning season. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 93:35.

Rainuzzo, J.R.; Reitan, K.I.; Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. *Aquaculture*, 155:103-115.

Rodrigues-Filho, J.A.; Sanches, E.G.; Garcia, C.E.O.; Sebastini, E.F.; Pannuti, C.V.; Moreira, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85:301-302.

Ronnestad, I.; Fyhn, H.J. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries and Science*, 1:239-259.

São Paulo, 2008. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.

Sargent, J.R.; Bell, J.G.; McEvoy, L.A.; Tocher, D.R.; Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 177:191-199.

Sargent, J.R.; McEvoy, L.A.; Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155:117-127.

Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds.). Fish Nutrition, 3rd ed, Academic Press, San Diego, USA.

Sheridan, M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 107:495-508.

Skaramuca, B.D.; Musin, V.; Onofri,; Carie, M. 1989. A contribution to the knowledge of the spawning time of the dusky grouper (*Epinephelus guaza* L.). *Ichthyologia*, 21:79-85.

Soyano, K.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A. 2005. Reproduction and larviculture of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* in Japan. In: Liao, I.C. and Leaño E.M. (Eds). The Aquaculture of groupers. pp. 1-28.

Spedicato, M.T.; Lembo, G.; Di Marco, P.; Marino, G. 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterraneennes*, 16:131-148.

Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41:717-732.

Tocher, D.R.; Bendiksen, E.A.; Campbell, P.J.; Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280:21-34.

Tocher, D.R.; Sargent, J.R. 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids*, 19:492-499.

Yúfera, M.; Darias, M.J. 2007. The onset of feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268:53-63.

Zabala, M.; Garcia-Rubies, A.; Louisy, P.; Sala, E. 1997. Spawning behavior of the Mediterraneam dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61(1):65-77.

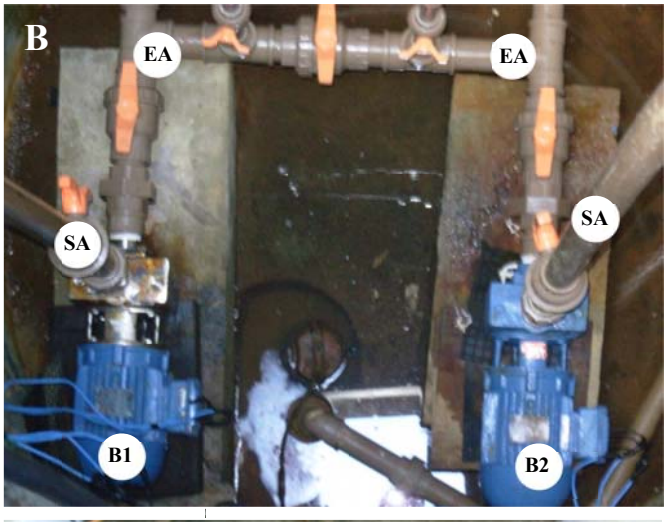
Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268:98-105.

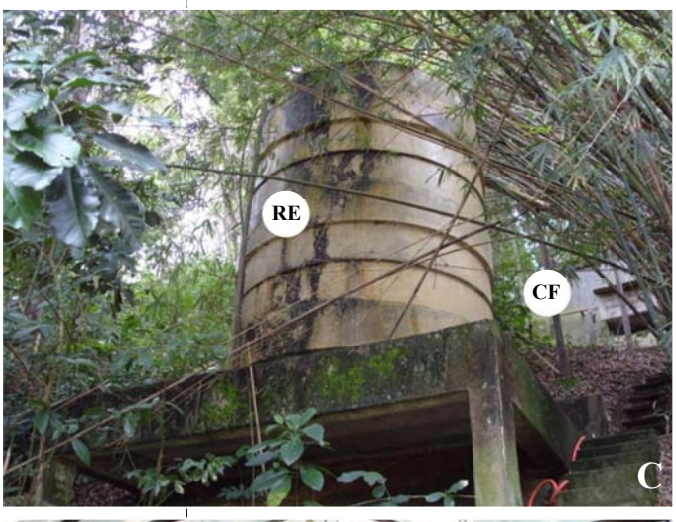
Zambonino-Infante, J.L.; Gisbert, E.; Sarasquete, C.; Navarro, I.; Gutierrez, J.; Cahu, C.L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fishes*. Ed. Cyrino, J.E.P.; Bureau, B.; Kapoor, B.G. Taylor & Francis Group. pp.281-348.

7. Figuras

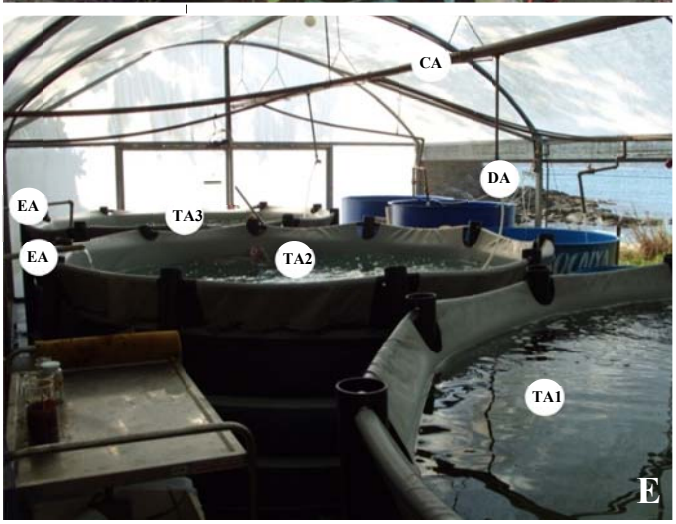
Figura 3. Localização e estruturas montadas para os experimentos com reprodução e larvicultura da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* em cativeiro. **A)** Localização do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da USP (Fonte: Google maps). **B)** Local das estruturas de reprodução e larvicultura dentro do CEBIMar (Fonte: Google maps). **C)** Área externa da estufa dos reprodutores. **D)** Área interna da estufa dos reprodutores. **E)** Área interna da estufa de larvicultura mostrando os tanques para a larvicultura. **F)** Área interna da estufa de larvicultura mostrando as incubadoras de produção de rotíferos.

A


B
EA
EA
SA
SA
B1
B2


RE
CF
C

SA
SA
F2
EA
F1
EA
D


CA
DA
EA
TA3
EA
TA2
TA1
E

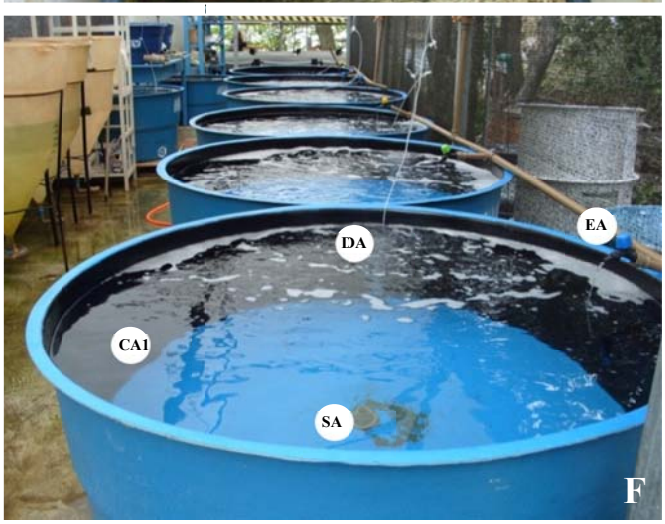

EA
DA
CA1
SA
F

Figura 4. Estruturas montadas adequadas para os experimentos com reprodução e larvicultura da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* em cativeiro. **A)** Soprador de ar de 1,5 cv para aeração do sistema de cultivo dos reprodutores, larvicultura e cultivo de alimento vivo. **B)** Área interna do poço que faz parte do sistema de captação de água do mar e de bombeamento de água para o reservatório do CEBIMar-USP, que conta com 2 bombas de 3 cv (B1 e B2), com entrada de água (EA - entrada de água) e saída de água para o reservatório (SA - saída de água). **C)** Foto da parte externa do reservatório do CEBIMar-USP, com capacidade de 50.000 litros (RE) que abastece o sistema de cultivo de garoupas, além de outros sistemas do Centro de Biologia Marinha. Ao fundo casa dos filtros (CF) na qual se localiza os filtros do sistema de abastecimento. **D)** Sistema de filtragem composto por 2 filtros (F1 e F2) com capacidade de filtragem de 15.000 litros por hora, com entrada de água (EA) e saída de água (SA). **E)** Vista dos tanques dos reprodutores (TA) com capacidade de 20.000 litros (TA1) e dois tanque de 10.000 litros (TA2 e TA3) com cano de abastecimento de água (CA) com entrada de água (EA) e difusores de aeração (DA). **F)** Vista geral da estufa de larvicultura com 6 tanques de 1000 litros (CA), evidenciando a entrada de água (EA) na parte superior da caixa, saída de água (SA) da região inferior da caixa e difusores de ar (DA).

IR 2
DA
IR 1
SA
A
IH
B
CA
PU
C
CS
D
PU
OC
E
CO
VT
200 µm
F

Figura 5. Técnicas utilizadas durante o processo de indução hormonal de reprodução da garoupa *Epinephelus marginatus*. **A)** Vista geral do sistema de cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformes*) que conta com incubadoras de 60 litros (IR1) e de 200 litros (IR2) com sistema de distribuição de ar (DA) e torneira de saída de água (SA) para coleta dos rotíferos. **B)** Técnica de indução hormonal (IH) com hCG (gonadotropina coriônica humana) para indução à ovulação nas fêmeas e indução a espermiação nos machos de *E. marginatus* com auxilio de seringa e agulha. **C)** Processo de canulação de fêmea de *E. marginatus* com auxílio de cânula (CA) de 0,5 mm com inserção da cânula no poro urogenital (PU) do animal para coleta de oócitos e aferição do diâmetro oocitário. **D)** Processo de coleta de sêmen (CS) dos machos de *E. marginatus* com auxílio de seringa durante o processo de extrusão do animal. **E)** Processo de extrusão dos oócitos (OC) de fêmea de *E. marginatus* através do poro urogential (PU) com auxílio de um béquer para a coleta dos oócitos ovulados. **F)** Oócitos coletados durante processo de canulação, ainda não ovulados evidenciando o córion com coloração esbranquiçada bem evidente (CO), com citoplasma denso e repleto de vitelo (VT) que se apresenta na forma de pequenos grânulos (seta branca).

Capítulo 1

Embriogênese e desenvolvimento larval da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) reproduzida em cativeiro

Paulo H. Mello[1,2]; Bruno C. Araújo;[1,2]; Mariana F. Campos;[1,2]; Jandyr A. Rodrigues-Filho[1,2]; Carlos E.O. Garcia[1,2]; Renata G. Moreira[1,2].

[1]- Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, São Paulo, Brasil. phmello@usp.br

[2]- Universidade de São Paulo, Centro de Biologia Marinha, São Sebastião, Brasil.

Resumo

Investigamos a embriogênese da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias do desenvolvimento. O tamanho do ovo da garoupa verdadeira *E. marginatus* é um dos menores encontrados para o gênero *Epinephelus*, são esféricos com aspecto transparente contendo uma gota de lipídio de coloração amarela. Durante o período embrionário, foram observados os principais estágios do desenvolvimento como: zigoto, mórula, blástula, gástrula e a eclosão. A eclosão das larvas da garoupa ocorreu com 31 horas após a fertilização. Verificamos a similaridade na embriogênese da garoupa verdadeira com outras espécies congenéricas, além de similaridade nas etapas do desenvolvimento quando comparados a outro estudo realizado com a mesma espécie. Observamos que as larvas da garoupa apresentaram todos os órgãos necessários para a captura, ingestão e digestão de presas a partir do 4º DAE. Além disso, verificamos a boca e poro urogenital abertos, trato digestório incipiente, mas já funcional, olhos pigmentados, corpo pigmentado, e nadadeiras caudal e peitoral presentes no 4º DAE, confirmando que os animais estavam aptos a realizar funções vitais de busca e apreensão de alimento, natação e fuga de predadores a partir desse dia.

Palavras-chave: Larva, embriogênese, organogênese, larvicultura, garoupa verdadeira.

Abstract

We investigated the embryogenesis of eggs and larvae of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* during the early stages of development. The size of the dusky grouper *E. marginatus* egg is one of the smallest found in *Epinephelus* gender, they are spherical and transparent, containing a yellow lipid oil droplet. During the embryonic period the main stages of development were observed: zygote, morula, blastula, gastrula, embryogenesis and hatching. The hatching of the grouper larvae happened at 31 hours after fertilization. We noted the similarity in embryogenesis of dusky grouper with other congeneric species, beyond the similarity in the stages of development when compared to another study of the same species. We observed that grouper larvae had all the necessary organs to capture, ingestion and digestion of live prey from the 4thDAH. In addition, we observed the mouth and urogenital pore opened, the digestive tract incipient, but functional, pigmented eyes, pigmented body, caudal and pectoral fins present at 4th DAH, confirming that the animals were able to perform these vital functions such as, sarch and capture of food, swim and escape predators from this day.

Keywords: larvae, embryogenesis, organogenesis, hatchery, dusky grouper.

1. Introdução

Estudos que abordam a embriogênese nas larvas de peixes são importantes para entender o desenvolvimento dessas espécies, principalmente aquelas que possuem potencial para aquicultura e as espécies ameaçadas de extinção (Feiden *et al*., 2006).

Trabalhos com ontogenia de larvas de peixes datam do século XIX, e são estudos de ótima qualidade descritiva e abordam em sua maioria as alterações morfológicas dos embriões de teleósteos (Kamler, 2002). No entanto, diversas abordagens surgiram e tornaram o estudo ontogenético muito mais interessante como, por exemplo, a inclusão de análises morfológicas do trato digestório, ossificação e histologia, além das abordagens ecológicas e evolutivas que também contribuem para o avanço nos estudos de embriogênese e larval (Kamler, 2002).

De acordo com Balon (1975) os peixes possuem 5 diferentes fases durante sua vida que são as seguintes: período embrionário, larval, juvenil, adulto e senescente. O período embrionário que se inicia na fertilização se caracteriza pelo período no qual os animais se alimentam exclusivamente de suas reservas endógenas (vitelínicas). Já o período larval se inicia com a alimentação exógena e finaliza quando as larvas possuem diferenciação completa do esqueleto axial e flexão da nadadeira caudal (Balon, 1975). No entanto, outra classificação é proposta por Kendall *et al*. (1984), na qual a fase embrionária se inicia na fertilização e se finaliza com a eclosão, dando origem a fase larval. A fase larval por sua vez é finalizada com algumas modificações morfológicas como o início da formação das escamas, perda das caraterísticas larvais e final do desenvolvimento da nadadeira caudal dando início ao estágio de juvenil (Kendall *et al*., 1984).

Durante os períodos embrionário e larval os processos dominantes são crescimento, diferenciação de tecidos e alterações fisiológicas (Fuiman e Higgs, 1997) e

o conhecimento específico desses períodos nos permite entender mais sobre sua morfologia e fisiologia viabilizando maior sucesso no cultivo durante essa fase crítica da vida.

As garoupas estão entre as espécies com potencial para a aquicultura brasileira, seja para a sua produção comercial ou para o repovoamento. No entanto, dificuldades em seu processo de larvicultura impedem sua produção em larga escala.

Diversas espécies do gênero *Epinephelus* obtiveram sucesso em produção em larga escala, no entanto, a garoupa verdadeira ainda apresenta diversos problemas durante as fases de larvicultura. Alguns autores (Doi *et al*., 1991; Hussain e Higuchi, 1980; Kayano, 1988; Khono *et al*., 1990) relataram que as maiores mortalidades durante o cultivo de espécies de garoupa se concentram nos primeiros dias de desenvolvimento, geralmente entre o 4º e 9º dias após a eclosão. Alguns deles atribuem elevada mortalidade ao pequeno tamanho da boca na primeira alimentação e outros como Khono *et al*. (1997) à maturação tardia dos elementos ósseos bucais.

Levando em conta todas as dificuldades abordadas no cultivo dessa espécie em cativeiro, aliada ao fato de ser uma espécie ameaçada de extinção (São Paulo, 2008; Rodrigues-Filho, 2009), o objetivo do presente trabalho foi investigar as fases de embriogênese e larval da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias, fornecendo subsídios para entender o desenvolvimento desses animais visando contribuir para a domesticação dessa espécie em cativeiro.

2. Materiais e Métodos

2.1. Manejo experimental

Após a inversão do sexo, indução à reprodução e fertilização (Garcia *et al*., 2013), que foi conduzida em três fêmeas, os ovos fertilizados foram acondicionados em

tanques de $2m^3$. Os tanques foram mantidos sem fluxo de água durante os primeiros quatro dias após a fertilização (DAF) somente com aeração bem suave distribuída com difusores de ar de madeira a fim manter um pequeno fluxo de água dentro do tanque e evitar choque mecânico dos ovos e larvas com a parede do tanque. Os ovos e larvas sobreviveram até o 16ºDAE.

Após a abertura da boca as larvas foram alimentadas inicialmente com rotíferos (S-type – *Brachionus rotundiformes*) a uma densidade conforme a figura 6. A densidade de rotíferos era estimada duas vezes ao dia (manhã e tarde) a fim de manter a densidade de presas ajustada e disponível para as larvas. Os rotíferos foram alimentados diariamente com alga em pasta *Rotigrow*® e posteriormente enriquecidos com *N-rich*® adquiridos junto à empresa *Reed mariculture* (*Campbell, CA, USA*). As concentrações foram utilizadas seguindo as instruções do fabricante.

As larvas foram submetidas ao fotoperíodo natural, temperatura de 23,0ºC, as trocas de água foram iniciadas no 2ºDAE e a taxa de renovação foi progressivamente sendo elevada (figura 6). O manejo sanitário foi realizado por sifonamento do fundo da caixa a cada dois dias para retirada da matéria orgânica acumulada no fundo da caixa. Foi colocada uma tela de sombrite em cima dos tanques para evitar incidência direta da luz do sol e permitir um ambiente mais ameno para as larvas.

Todos os dias, durante o período de 16 dias, 5 larvas foram coletadas para verificar a ingestão de alimentos, a condição de desenvolvimento dos animais e registro fotográfico. A taxa de fertilização foi verificada cerca de 2 horas após a fertilização através da análise de 5 sub-amostras de cada desova.

2.2. Coletas para a análise morfológica

2.2.1. Embriogênese e desenvolvimento larval

Todas as coletas foram realizadas no CEBIMar-USP (Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo).

Os ovos e as larvas foram constantemente monitorados a partir do momento da fertilização e ao longo de todas as coletas, alguns animais foram amostrados e analisados sob estereomicroscópio (Leica – modelo S6D) e fotografados com auxílio de um sistema computadorizado de captura de imagens (Leica DFC 295, *Leica Application Suíte Professional* – LAS – 3.6). Após o registro fotográfico os animais foram classificados quanto ao estágio embrionário de desenvolvimento e tiveram suas principais estruturas identificadas com auxílio de microscópio óptico (Leica modelo DM1000).

3. Resultados

Tabela 1. Dados de reprodução das desovas obtidas da garoupa *Epinephelus marginatus* em Novembro de 2011 (fêmea 1) e Novembro de 2012 (fêmeas 2 e 3).

Animais	Massa corpórea(g)	T (ºC)	O_2 (mg/l)	hCG (Cada Dose)	Ovos (g)	Diâmetro do oócito (µm)	Horas grau
Fêmea 1	4000	24,0 ±0,5	6,5 ±0,8	4000	70	994 ± 43,50	484
Fêmea 2	4380	23,6 ±0,4	6,8 ±1,2	3600	85	1226 ± 63,91	478
Fêmea 3	3350	23,2 ±0,5	7,0 ±0,79	3000	60	1121,67 ± 46,14	417

3.1. Taxa de fertilização

Em todas as fêmeas foram observadas mais de uma ovulação, embora a taxa de fertilização das ovulações posteriores à primeira ovulação tenham sido baixa, com estimativas próximas a 0%. Apenas uma das ovulações apresentou um número mais elevado de cerca de 40%.

3.2. Embriogênese

Os estágios do desenvolvimento embrionário adotados no presente trabalho seguem a classificação proposta por Kendall *et al*. (1984).

Durante essas fases foram observados diferentes estágios do desenvolvimento embrionário que serão abordados a seguir juntamente com o respectivo tempo a partir do momento da fertilização.

3.3. Período embrionário

Durante o período embrionário, foram observados os principais estágios do desenvolvimento como: zigoto, mórula, blástula, gástrula, organogênese e eclosão, entre outras fases que serão descritas nas figuras em anexo. Como o desenvolvimento é temporalmente heterogêneo nos indivíduos, as fases da embriogênese foram caracterizadas com as quais observamos em um primeiro indivíduo, em cada uma das fases, ovos/embriões/larvas.

No momento da biópsia (canulação antes da indução hormonal), os oócitos apresentavam coloração densa acinzentada no citoplasma, com o vitelo apresentando pequenos grânulos, córion bem definido de coloração branca, medindo cerca de 994µm. Cerca de 18 horas após a segunda indução hormonal, observamos que os oócitos ovulados apresentavam citoplasma transparente com pequenos grânulos espalhados pelo citoplasma que caracterizam o vitelo (figura 1A), de formato esférico, córion bem marcado e evidente de coloração esbranquiçada, sendo que a maioria dos oócitos que se desenvolveram continha apenas uma gota de lipídio.

A partir da fertilização, a visualização dos diferentes estágios foi acompanhada em detalhes permitindo visualização das principais etapas. A clivagem foi visualizada e caracterizada pelo surgimento de uma região celular que foi iniciada a partir da divisão

do blastodisco, dividindo o blastodisco em dois blastômeros de mesmo tamanho (2 células embrionárias). A primeira clivagem aconteceu aos 45MAF (minutos após a fertilização) (figura 1B). A segunda e terceira clivagens deram origem a 4 blastômeros (2 arranjos de 2 células) (75MAF, figura 1C) e 8 blastômeros (em 2 x 4 arranjos de células) (95MAF) (figura 1C). A quarta clivagem com 16 células (4 x 4 arranjos de células) (figura 1D) e quinta clivagem com 32 células (sem um arranjo ordenado) (figura 1E) ocorreram com 125 e 135MAF, respectivamente. O estágio de mórula foi identificado pelas sucessivas divisões celulares (a partir de 64 células) a partir de 145MAF (figura 1F).

Após 5 horas e 55 minutos foi identificado o estágio de blástula (figura 2A) que é principalmente identificado pelos espaços entre os blastômeros. Com 6 horas e 55 minutos foi identificado estágio de gástrula, devido ao início dos movimentos morfogenéticos, conhecidos por epibolia (figura 2B) que gera uma reorganização da blastoderme relativa ao início da formação do saco vitelínico e por último dará origem ao folículo germinativo e estabelecerá o eixo embrionário.

Após 9 horas e 55 minutos foi observado 50% de epibolia (figura 2C) e em seguida início da organogênese (figura 2D). A fase de organogênese é dividida em duas principais fases, a fase de segmentação inicial e fase de segmentação tardia. Na figura 2D (14HAF – horas após a fertilização), logo após a segmentação de eixo embrionário, observa-se a segmentação inicial, com clara divisão entre a região cefálica e caudal do embrião, no qual a cauda ainda apresenta tamanho bastante reduzido e colada ao saco vitelínico. Nesta fase observamos vesículas ópticas presentes, além dos somitos que darão origem a musculatura larval.

Após essa fase inicia-se a fase de segmentação tardia, que se caracteriza pela presença da cauda bem desenvolvida e livre ou desprendida do saco vitelínico, com

somitos mais desenvolvidos, vesícula óptica muito desenvolvida e crescimento embrionário robusto (figuras 2E, 26HAF).

Diferentemente das etapas anteriores o córion apresenta espessura mais delgada, etapa esta fundamental para a eclosão, que se inicia com a movimentação vigorosa do embrião (figura 2F - 28HAF).

3.4. Desenvolvimento larval

O processo de eclosão se inicia com 31 horas AF (figura 3A) com larvas não pigmentadas (translúcidas), com natação errática, gota de lipídio e saco vitelínico completamente desenvolvido. Cerca de 1 hora AF (figura 3B) as larvas ainda apresentam natação errática, no entanto, já é visível um consumo inicial das reservas vitelínicas, bem como bom desenvolvimento da nadadeira caudal e dos somitos. Além disso, durante essa fase, as larvas apresentam natação na região mais próxima à superfície.

Com 1 dia após a eclosão (1DAE - dia após a eclosão) (figura 3C) as larvas apresentam natação orientada, apresentam um consumo mais elevado do saco vitelínico, iniciam a pigmentação na região próxima a nadadeira caudal na altura da linha lateral (região dos somitos). Também é visível formação inicial do sistema digestório e do aparelho excretor.

Com 1 dia e meio AE (figura 3D) as larvas consumiram grande parte do saco vitelínico, apresentam natação direcionada, olhos ainda não completamente pigmentados, corpo com pigmentação característica, bem acentuada na região da linha lateral próxima a nadadeira caudal. A gota de lipídio também apresenta redução considerável em seu volume. O trato digestório também se encontra em estágio mais

avançado de desenvolvimento sendo possível visualizar a porção distal do intestino. Estruturas como o coração e fígado também são facilmente visualizadas.

Após 2DAE (figura 3E) e o saco vitelínico praticamente esgotado (visualmente), as larvas apresentavam as nadadeiras peitorais mais desenvolvidas, olhos pigmentados, natação correta e direcionada ocupando de forma mais ativa a coluna d´água, indicando um controle maior com relação à natação, além da pigmentação do corpo mais intensa e localizada na região da linha lateral entre o trato digestório e a nadadeira caudal.

Aos 3DAE (figura 3F) ocorre a abertura do poro urogenital e da boca, no entanto ainda não estava funcional, pois nenhum alimento foi visualizado no trato digestório da larva e nenhuma observação de captura de presa foi visualizada. Uma porção bem reduzida da gota de lipídio ainda é visível, em contrapartida ao saco vitelínico que está visualmente esgotado. A partir desse dia, iniciamos a oferta de rotíferos como alimento vivo em uma densidade de 2 rotíferos/ml.

Dos 4 aos 7DAE já é possível visualizar com clareza a boca da larva aberta, embora apenas verificamos (macroscopicamente) alimento no sistema digestório a partir do 8º e 9º DAE (figuras 4E e F). O trato digestório também está aparentemente maduro e fácil de ser observado, além da pigmentação corpórea avançada, que juntamente com os olhos apresentam maior tamanho, principalmente se comparados ao restante do corpo. A partir do 4ºDAE o corpo se torna mais alongado e comprimido lateralmente e mais elevado na porção anterior. A pigmentação (melanóforos) é facilmente visualizada como manchas pretas na altura do intestino e outras duas manchas na região da linha lateral entre o intestino e a nadadeira caudal.

Aos dias 8 e 9 as larvas apresentaram início do desenvolvimento da espícula dorsal, marcando o início do estágio de vela, que se caracteriza pelo surgimento da nadadeira dorsal (figuras 4E e F). Além disso, foi possível observar com facilidade o

alimento no trato digestório dos animais (figuras 4E e F). Além disso, nos dias 8, 9, 14 e 16DAE as larvas ainda apresentavam o mesmo padrão de desenvolvimento, corpo alongado, comprimido lateralmente e alto na porção anterior, com espícula dorsal mais desenvolvida ao longo dos dias e desenvolvimento das nadadeiras com o surgimento da espícula peitoral. A pigmentação na altura do intestino se expande para toda a parte superior do intestino e as duas manchas na região intermediária entre o intestino e a nadadeira caudal se tornam mais arredondados e mais uniformes e ainda é possível visualizar pigmentação da região interna da larva na altura dos miômeros.

4. Discussão

O ovo de *E. marginatus* é um dos menores encontrados para o gênero *Epinephelus* (Glamuzina *et al*., 1998a). Quando comparamos o diâmetro dos oócitos encontrados em animais do sudeste brasileiro com outros trabalhos que abordam *E. marginatus* em diversas regiões do mundo observamos os seguintes valores: Espanha 750µm (Zabala, 1997) em águas da Andalúcia, no Mar Adriático diâmetros de 836µm descritos por Skaramuca *et al*. (1989) e no Sudeste da Itália com maiores diâmetros com 888µm descrito por Spedicato (1995), sendo que no Sudeste brasileiro foram aferidos oócitos com menor diâmetro de cerca de 994 µm, sugerindo portanto que o diâmetro dos oócitos dos animais no sudeste brasileiro sejam os maiores já descritos para a espécie.

Segundo Glamuzina *et al*. (1998a) apenas duas outras espécies de garoupa apresentam oócitos com diâmetros tão pequenos, atingindo valores médios de 757,3µm para *Epinephelus polyphekadion* (James *et al*., 1997) e 769µm para *Epinephelus microdon* (Tamaru *et al*., 1996). No entanto, Leu *et al*. (2005), apresentam uma tabela de comparações entre oócitos de espécies de garoupas e descrevem menores diâmetros

dos oócitos para *Epinephelus akaara* com 700µm (Ukawa *et al*., 1996), *E. fasciatus* com 770µm (Murai *et al*., 1984; Kawabe, 2000). Segundo Jagadis *et al*. (2006), valores médios do diâmetro oocitário ainda menores são encontrados em *E. merra* atingindo entre 710 e 730µm, e valores similares são encontrados para *E. polyphekadion* atingindo até 730µm (Salem e James, 1996).

As características observadas nos oócitos de *E. marginatus* (esféricos com aspecto transparente contendo uma gota de lipídio de coloração amarela) são similares aos descritas por Glamuzina *et al*. (1998b) e Zabala *et al*. (1997). Por outro lado, os oócitos de pior qualidade (não fertilizados ou que cessaram seu desenvolvimento) apresentavam coloração translúcida, ligeiramente opaca, e mais de uma gota de lipídio (2 ou 3 gotas de lipídio).

A primeira clivagem foi observada com 45 minutos após a fertilização (minutos após a fertilização - MAF), a 23ºC, Glamuzina *et al*. (1998a) analisando os ovos da mesma espécie incubados à mesma temperatura, observaram a primeira clivagem somente com cerca de 1 hora e 5 minutos após a fertilização. Para outras espécies de garoupa, a primeira divisão celular pode ser mais acelerada como ocorreu em *E. malabaricus* em 25ºC (Leu *et al*., 2005) na qual a primeira clivagem ocorreu com 35MAF, possivelmente em razão da temperatura mais elevada.

Na tabela 2 apresentada abaixo são comparados nossos resultados com os de Glamuzina *et al*. (1998a), entre os momentos em que ocorreram os principais eventos embrionários na garoupa verdadeira, utilizando a mesma temperatura durante a embriogênese. Podemos observar diferenças no tempo de desenvolvimento desde o momento da primeira clivagem, sendo que o desenvolvimento dos animais obtido por Glamuzina *et al*. (1998a) foi mais lento em todas as etapas, mesmo com a temperatura da água não sendo um diferencial. No entanto, quando a fase de desenvolvimento vai se

aproximando do momento da eclosão a diferença no tempo de desenvolvimento embrionário é mínima, sendo que diferenças maiores no tempo de desenvolvimento só são observadas nas fases intermediárias da embriogênese.

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário comparativo de *E. marginatus* em 23ºC.

Tempo (MAF)		**Estágio**
Mello, P.H.	**Glamuzina, B (1998)**	
0	0	Fertilização
45 MAF	65 MAF	2 celulas
75 MAF	80 MAF	4 células
95 MAF	100 MAF	8 células
125 MAF	130 MAF	16 células
135 MAF	150 MAF	32 células
145 MAF	200 MAF	64 células
175 MAF	300 MAF	Mórula
6h e 55 MAF	8h e 15 MAF	Gástrula
26 HAF	27 HAF	Embrião
31 HAF	31 e 30 MAF	Eclosão

Obs: MAF significa minutos após a fertilização e HAF significa horas após a fertilização.

Dentro do mesmo gênero *Epinephelus* encontramos tempos de eclosão com variação muito ampla, que vão desde 24 horas após a fertilização (HAF) para espécies como *E. tauvina* a 24ºC (Chen *et al*., 1977) e *E. merra* com 27 a 29ºC (Jagadis *et al*., 2006) encontrando cerca de 30-31HAF como ocorreu para *E. marginatus* a 23ºC em nosso experimento e com Glamuzina *et al*. (1998a), cerca de 35HAF para *E. septemfasciatus* com temperaturas de 21 a 23ºC (Kitajima *et al*., 1991) e 32 a 36 horas

para *E. bruneus* com temperaturas de 23 a 25ºC (Manabe e Kasuga, 1989 e Sawada *et al*., 1999).

Com 1 dia após a eclosão, observa-se o consumo do vitelo contido no saco vitelínico, diminuição do diâmetro do saco vitelínico, além de maior desenvolvimento da nadadeira caudal e início da pigmentação (cromatóforos) na linha lateral. Características como: forma do saco vitelínico, formatos da cabeça e do corpo, localização da gota de lipídio, trato digestório curto, bem como a pigmentação na linha lateral são características presentes em quase todos os animais do gênero *Epinephelus* (Khono *et al*., 1993). No entanto, a pigmentação encontrada para *E. marginatus*, localizada na linha lateral acompanhando a notocorda e acima do anus foi observada em apenas quatro espécies do gênero *Epinephelus*. As outras 3 espécies de garoupas que apresentam pigmentação parecida à encontrada para *E. marginatus* são a *E. tauvina* (Hussain e Higguchi, 1980), *E. striatus* (Powell e Tucker, 1992) e *E. fuscogatus* (Khono *et al*., 1993). Estes dados de pigmentação são ferramentas úteis para identificação de larvas de peixes marinhos quando coletadas em ambiente natural (Glamuzina *et al*., 1998a).

Durante os dois primeiros dias de vida, as larvas de *E. marginatus* são frágeis e pequenas. Diversos trabalhos relatam o tamanho reduzido destes animais, bem como a fragilidade durante o manejo e cultivo dos animais do gênero *Epinephelus* (Glamuzina *et al*., 1998a; Jagadis *et al*., 2006; Leu *et al*., 2005; Soyano *et al*., 2008). No entanto, durante o 2ºDAE, os animais vão desenvolvendo alguns de seus órgãos digestórios e aumentando a sua pigmentação, ao mesmo tempo que se observa o consumo do saco vitelínico. Durante o 2ºDAE, visualmente o saco vitelínico apresenta-se aparentemente esgotado, no entanto, quando analisamos os dados histológicos encontramos a presença de vitelo até o 7ºDAE.

No 3ºDAE, as larvas abrem a boca e o poro urogenital, no entanto, como não foi observada a captura de nenhum alimento, bem como não foi verificado alimento no trato digestório de nenhuma larva, inferimos que embora estivesse aberta, ainda não estava funcional. Este fato foi observado também por Glamuzina *et al*. (1998a), pois a abertura da boca foi verificada com 72HAE mas somente foi definida como completamente funcional com 96HAE, quando foi encontrado alimento no trato digestório destes animais durante o 4ºDAE. Outras espécies congeneras também apresentam desenvolvimento similar durante esta fase como, por exemplo, *E. merra* que abriram a boca com 72HAE, mas esta apresentou-se desenvolvida com cerca de 82 a 92HAE (Jagadis *et al*., 2006), enquanto que para *E. costae* foi observada abertura com 60HAE e funcional com cerca de 80HAE (Glamuzina *et al*., 2000). Por fim, em *E. malabaricus* a abertura da boca foi observada com 72HAE, no entanto, o autor não indica o momento que os animais foram capazes de capturar presas. Tais informações sugerem fortemente que exista um período ou um tempo necessário para o completo desenvolvimento das estruturas orais, de cerca de 20 a 24 horas entre abertura e a completa funcionalidade que permita a captura de presas para algumas espécies deste grupo. Kohno *et al*. (1997) relatam que a ossificação de alguns elementos da boca se desenvolvem muito vagarosamente e associaram a dificuldade de cultivo dessa espécie a esses fatores em conjunto com outros como, tamanho reduzido do saco vitelínico e tamanho reduzido da boca.

Outra característica importante verificada no 4ºDAE, além da pigmentação mais completa do olho e seu tamanho, foram as nadadeiras bem desenvolvidas e os animais apresentando distribuição de seus indivíduos por toda a coluna de água, o que nos dá evidências de um completo desenvolvimento de boa parte das estruturas necessárias para a natação, visualização e captura de presas, além de percepção de movimentos

dentro da água indicando que, embora ainda muito frágeis, os animais já se desenvolvem ativamente e estão com muitas estruturas para captura de presas. Goçalo (2015) estudando o comportamento natatório em larvas de *E. marginatus* afirma que as larvas aos 3DAE têm total controle sobre sua natação, movimentos e interação com o meio. Além disso, apresentam comportamento natatório complexo que inclui contrações musculares, batimentos do complexo caudal, movimentação especializada das nadadeiras peitorais e movimentação dos espinhos dorsais que são responsáveis pelos movimentos ondulatórios do corpo durante o deslocamento e alterações no período de respouso (Goçalo, 2015).

A partir do 4º até o 7ºDAE os animais apresentaram desenvolvimento similar, com larvas ainda muito pequenas e frágeis e com pouco crescimento. Do 9º ao 16ºDAE observamos animais maiores e com nadadeiras dorsal e peitoral (estágio de vela) desenvolvidas, com sistema digestório com alimento, além de pigmentação dos olhos.

Aos 8, 9, 14 e 16 DAE, as larvas da garoupa apresentaram formato corporal alongado com estreitamento lateral e com a porção anterior mais elevada, corroborando a descrição realizada por Santos (2014) para diversas espécies congenéricas da garoupa em ambiente natural no litoral do sudeste brasileiro. As espículas que darão origem à nadadeira dorsal juntamente com as laterais surgem aos 8DAE e vão crescendo até o 16ºDAE. Além disso, podemos observar que os olhos das larvas estão pigmentados e aliados ao desenvolvimento completo das nadadeiras e a presença de alimento no trato digestório (a partir do 8ºDAE) podemos sugerir que as larvas estão aptas a capturar e ingerir presas já a partir do 4ºDAE.

Sabemos que diversos fatores afetam a captura de alimento pelas larvas como, por exemplo, desenvolvimento dos olhos e órgãos sensoriais para localização das presas, formação e desenvolvimento do pedúnculo e da nadadeira caudal para o

deslocamento, abertura da boca e funcionalidade do órgão para captura de presas, desenvolvimento do sistema digestório além de atividade enzimática para digestão do alimento ingerido (Yúfera e Darias, 2007). Embora não tenha sido observado alimento no trato digestório das larvas durante os 7 primeiros dias, podemos afirmar que através do ponto de vista morfológico as larvas estavam aptas a se alimentarem, e não se alimentaram provavelmente devido ao tamanho do alimento vivo fornecido. Uma das possíveis soluções para essa dificuldade na alimentação pode ser a inclusão de copépodes na dieta durante esses primeiros dias de alimentação das larvas.

A partir do 8ºDAE observamos alimento vivo no trato digestório das larvas confirmando que estas estavam se alimentando ativamente possuindo desenvolvimento normal de todas as estruturas necessárias para a captura, ingestão e digestão do alimento vivo. Com isso, sugerimos a utilização de alimento vivo de menor tamanho durante os 10 primeiros dias de desenvolvimento, por exemplo, copépodes, e a partir do 7ºDAE fornecimento de rotíferos de qualquer variedade com uma transição alimentar, pois o período crítico (4º ao 7ºDAE) estaria finalizado.

5. Conclusões

A embriogênese da garoupa verdadeira é similar a outras espécies congenéricas, além de apresentar etapas da embriogênese e do desenvolvimento muito similar a outro estudo realizado com a mesma espécie. As larvas apresentaram todos os órgãos necessários para a captura, ingestão e digestão de presas ao 4ºDAE.

6. Referências Bibliográficas

Balon, E.K. 1975. Terminology of intervals in fish development. *Journal of the Fisheries Resources Board of Canada*, 32:1663-1670.

Chen, F.Y.; Chow, M.; Chao, T.M.; Lim, R. 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskal) in Singapore. *Singapore Journal of Primary Industry*, 5:1-21.

Doi, M.; Munir, M.N.; Razali, N.L.N.; Zulkiffi, T. 1991. Artificial propagation of the grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demongo Terrengganu, Malaysia. *Kertas Pengembangan Perikanan*, 167:41pp.

Feiden, A.; C. Hayashi, W.R.; Reidel, A. 2006. Desenvolvimento de larvas de *Steindachneridion sp.*em diferentes condições de refúgio e luminosidade. *Pesquisa Agropecuária Brasília*, 41: 133-137.

Fuiman, L.A.; Higgs, D.M. 1997. Ontogeny, growth and the recruitment process. In: Chambers, R.C. and Trippel, E.A. (eds.), Early Life History and Recruitment in Fish Populations. Chapman & Hall, London.

Garcia, C.E.O.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Narcizo, A.M.; Rodrigues-Filho, J.A.; Medrado, A.T.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M.; Moreira, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex-change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, 192:170-180.

Glamuzina, B.; Glavic, N.; Skaramuca, B.; Kozul, V. 1998b. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Aquaculture Resources, 29:563-567.

Glamuzina, B.; Glavic, N.; Tutman, P.; Kozul, V.; Skaramuca, B. 2000. Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper, *Epinephelus costae*. Steindachner, 1878 Pisces, Serranidae . *Scientia Marina*, 64(3):341-345.

Glamuzina, B.; Skaramuca, B.; Glavic, N.; Kozul, V. 1998a. Preliminary studies on reproduction and early life stages in rearing trials with dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquaculture Research*, 29:769-771.

Goçalo, C.G. 2015. Análise do comportamento natatório de larvas de peixes marinhos com técnicas de imageamento de alte frequência. Tese de Doutorado. 121p.

Hussain, N.A.; Higguchi, M. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskal). *Aquaculture*, 19:339-350.

Jagadis, I.; Ignatius, B.; Kandasami, D.; Khan, M.A. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquaculture Resources*, 37:1140-1145.

James, C.M.; Althobaiti, S.A.; Rasem, B.M.; Carlos, M.H. 1997. Breeding and larval rearing of the camouflage grouper, *Epinephlus polyphekadion* (Bleeker) in the hypersaline waters of the Red Sea coast of Saudi Arabia. *Aquaculture Resources*, 28(9):671-681.

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

Kawabe, K. 2000. Fin development and squamation of blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*, reared artificially in the tank. *Suisanzoshoku*, 48:39-46.

Kayano, Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Bulletin of Okayama Prefectural Fisheries Experimental Station,* 3:55-60.

Kendall, A.W.J.; Ahlstrom, E.H.; Moser, H.G. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser, H.G.; Richards, W.J.; Cohen, D.M.; Fahay, M.P.; Kendall, A.W.J.; Richardson, D.M. Ontogeny and systematics of fishes. *American Society Ichthyologists and Herpetologists*, 1:11-22.

Kitajima, C.; Takaya, M.; Tsukashima, Y.; Arakawa, T. 1991. Development of eggs, larvae and juveniles of the grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, reared in the laboratory. *Japanese Journal of Ichthyology*, 38:47-55.

Kohno, H.; Ordonio-Aguilar, R.; Ohno, A.; Taki, Y. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Resources*, 44:267-274.

Kohno, H.; Diani, S.; Sunyoto, P.; Slamet, B.; Imanto, P.T. 1990. Early developmental events associated with changeover of nutriente sources in the grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, larvae. *Fisheries Resources Bulletin (Indonesia)*. Special Edition, 1:51-64.

Kohno, H.; Diani, S.; Supriatna, A. 1993. Morphological development of larval and juvenile grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*. *The Japanese Journal of Ichthyology*, 40(3):307-316.

Leu, M.Y.; Liou, C.H.; Fang, L.S. 2005. Embryonic and larval development of the malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). *Journal of Marine Biology*, 85:1249-1254.

Manabe, S.; Kasuga, A. 1989. Spawning behavior and early life history of *Epinephelus moara* in an aquarium. *Journal of the Japanese Association of Zoological Gardens and Aquariuns*, 30: 16-24.

Murai, M,; Aoki, Y.; Nishimura, K. 1984. On the egg collection of *Epinephelus fasciatus*. *Technical Report of farming Fisheries*, 13:63-67.

Powell, A.B.; Tucker, J.W. 1992. Egg and larval development of laboratory-reared Nassau grouper, *Epinephelus striatus* (Pisces: Serranidae). *Bulletim of Marine Science*, 50(1):171-185.

Rodrigues-Filho, J.A.; Sanches, E.G.; Garcia, C.E.O.; Sebastini, E.F.; Pannuti, C.V.; Moreira, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85:301-302.

Salem, A.T.; James, C.M. 1996. Developments in grouper culture in Saudi Arabia. *INFOFISH International*, 1:22-29.

Santos, M.R. 2014. Ocorrência, distribuição e abundância das larvas de Serranidae na costa sudeste brasileira, entre Cabo Frio (RJ) e cabo de Santa Marta Grande (SC). Dissertação. 98p.

São Paulo, 2008. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.

Sawada, Y.; Kato, K.; Okada, T.; Kurata, M.; Mukai, Y.; Miyashita, S.; Murata, O.; Kumai, H. 1999. Growth and morphological development of larval and juvenile *Epinephelus bruneus* (Perciformes: Serranidae). *Ichthyological Research*, 46:245-257.

Skaramuca, B.D.; Musin, V.; Onofri,; Carie, M. 1989. A contribution to the knowledge of the spawning time of the dusky grouper (*Epinephelus guaza* L.). *Ichthyologia*, 21:79-85.

Soyano, K.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A. 2005. Reproduction and larviculture of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* in Japan. In: Liao, I.C. and Leaño E.M. (Eds). The Aquaculture of groupers. pp. 1-28.

Spedicato, M.T.; Lembo, G.; Di Marco, P.; Marino, G. 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterraneennes*, 16:131-148.

Tamaru, C.S.; Carlstromtrick, C.; Fitzgerald, W.J.; Ako, H. 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper *Epinephelus microdon* captured from spawning aggregations in the Republic of Palau, Micronesia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(4):363-372.

Ukawa, M.; Higuchi, M.; Mito, S. 1966. Spawning habits and early life history of a serranid fish, *Epinephelus akaara* (Temminck et Schlegel). *Japanese Journal of Ichthyology*, 13:156-161.

Yúfera, M.; Darias, M.J. 2007. The onset of feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268:53-63.

Zabala, M.; Garcia-Rubies, A.; Louisy, P.; Sala, E. 1997. Spawning behavior of the Mediterraneam dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61(1):65-77.

7. Figuras

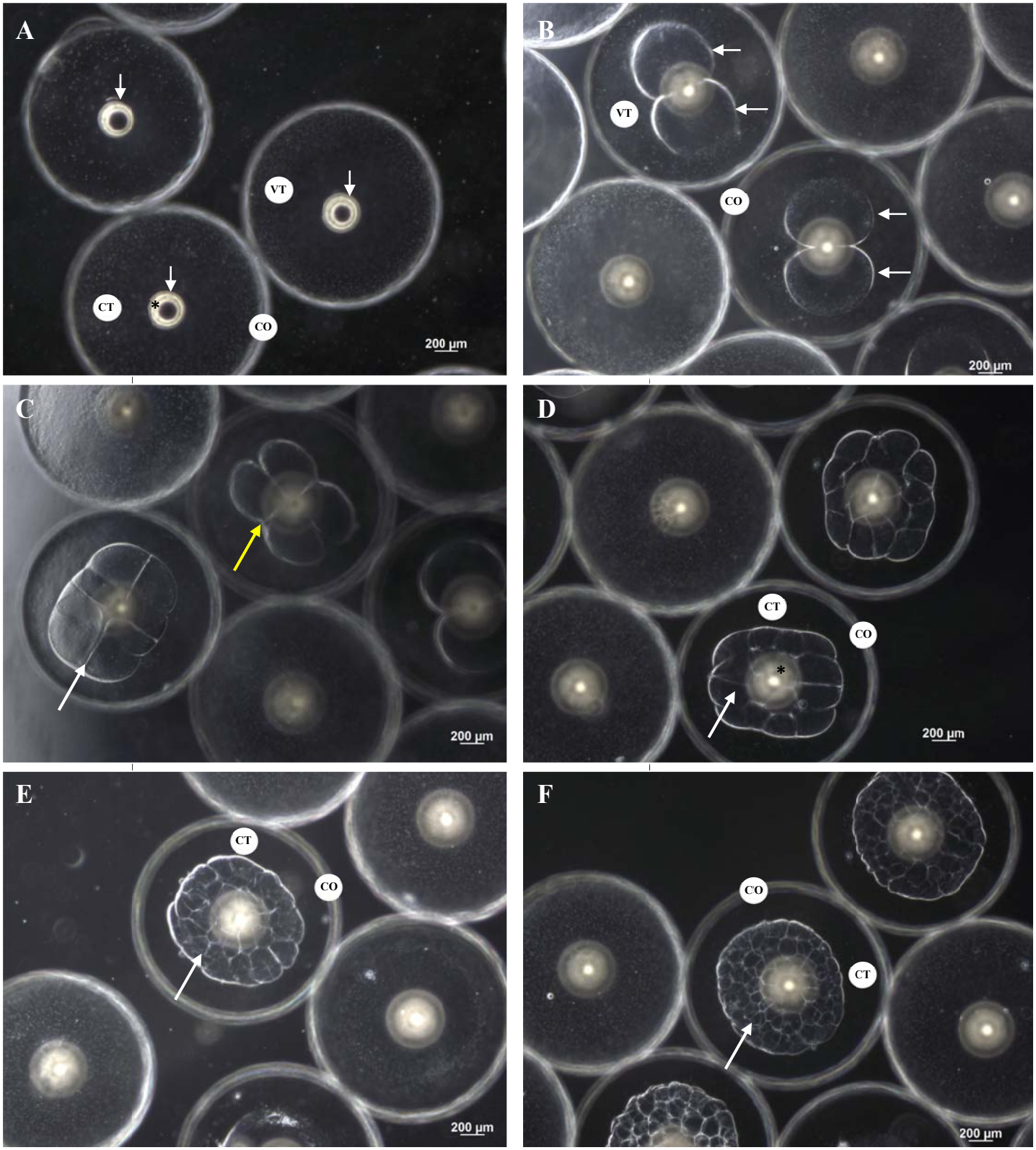

A
VT
CT
*
CO
200 µm
B
VT
CO
200 µm
C
200 µm
D
CT
CO
*
200 µm
E
CT
CO
200 µm
F
CO
CT
200 µm

Figura 1 – Fases de desenvolvimento durante a embriogênese de *E. marginatus*. **A)** Oócito ovulado e não fertilizado com córion (CO) com camada espessa e coloração esbranquiçada, citoplasma (CT) transparente com pequenos grânulos (*) de vitelo (VT) contendo uma gota de lipídio (setas brancas) em cada oócito (momento 0). **B)** Ovo durante a primeira clivagem que ocorreu com 45 minutos após a fertilização (MAF) evidenciando os 2 blastômeros (setas brancas) de mesmo tamanho, córion (CO) de coloração esbranquiçada e citoplasma (CT) contendo vitelo (VT). **C)** Ovo durante a segunda clivagem (seta amarela) que ocorreu com 75 MAF e terceira clivagem (seta branca) que ocorreu com 95 MAF, dando origem a 4 e 8 blastômeros respectivamente, com córion (CO) esbranquiçado e citoplasma transparente. **D)** Ovo durante a quarta clivagem (seta branca) que ocorreu com 125 MAF, dando origem a 16 blastômeros, com córion (CO) de coloração esbranquiçada e citoplasma (CT) transparente contendo uma gota de lipídio (*). **E)** Ovo durante a quinta clivagem (seta branca) que ocorreu com 135 MAF, dando origem a 32 blastômeros distribuídos irregularmente, com córion (CO) de coloração esbranquiçada e citoplasma (CT) transparente. **F)** Ovo em estágio de mórula (seta branca) que ocorreu aos 145 MAF, dando origem a 64 blastômeros, com córion (CO) esbranquiçado e citoplasma (CT) transparente.

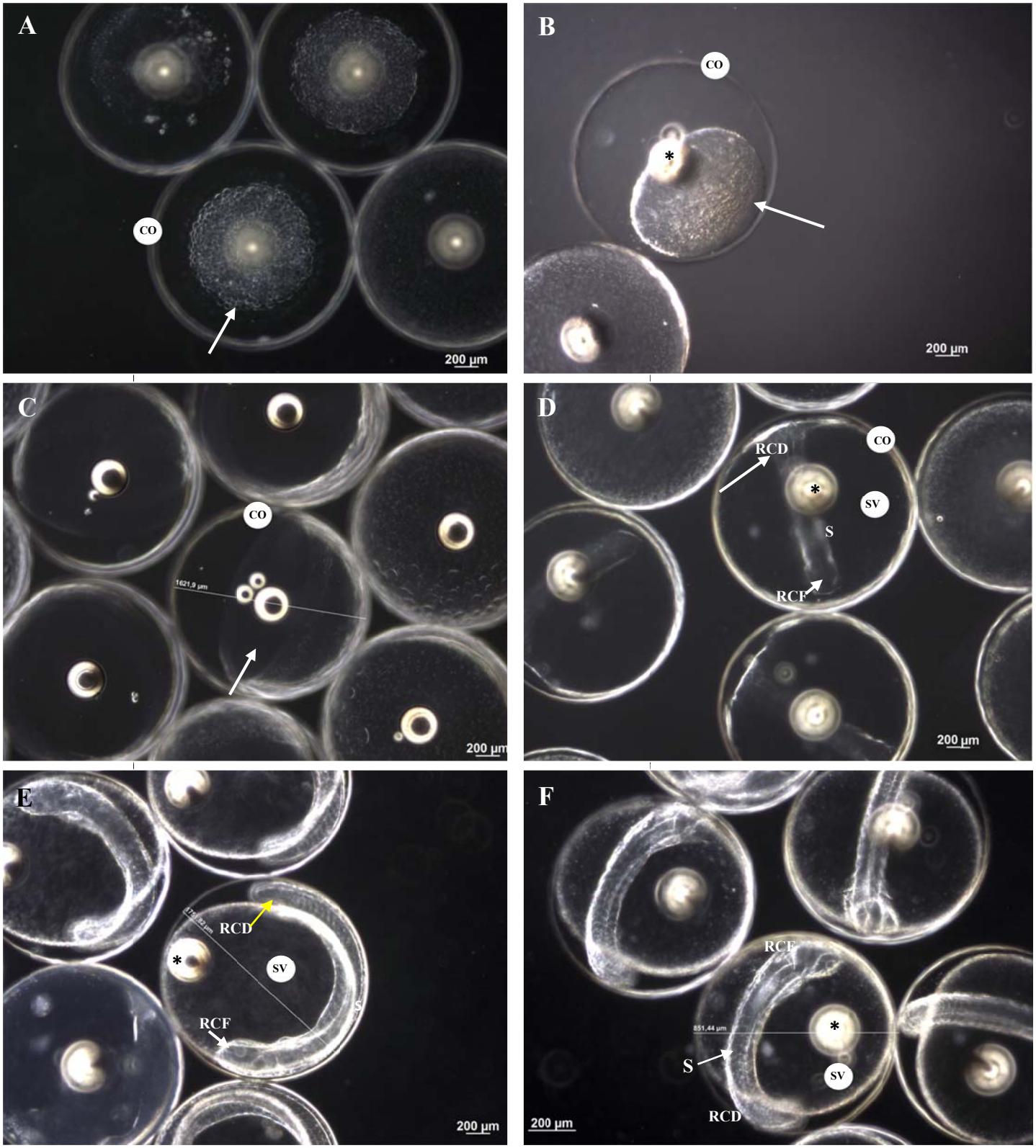

A
CO
200 µm
B
CO
*
200 µm
C
CO
1621,9 µm
200 µm
D
RCD
CO
*
SV
S
RCF
200 µm
E
RCD
*
SV
S
RCF
200 µm
F
RCF
851,44 µm
*
S
SV
RCD
200 µm

Figura 2. Fases de desenvolvimento durante a embriogênese de *E. marginatus*. **A)** Ovo em estágio de blástula (5h e 55MAF) (seta branca), córion (CO) e citoplasma. **B)** Ovo em estágio de gástrula (6h e 55 MAF) (seta branca) com 25% de epibolia, com córion (CO), citoplasma (CT) e gota de lipídio (*). **C)** Ovo em estágio de gástrula (9h e 55min) (seta branca) com 50% de epibolia, córion (CO) e citoplasma (CT). **D)** Formação da larva (14 horas após a fertilização - HAF) (seta branca maior), saco vitelínico (SV), região cefálica (RCF), região caudal (RCD), córion (CO), gota de lipídio (*), somitos, e vesícula óptica (seta branca menor). **E)** Larva em desenvolvimento (26 HAF) apresentando desprendimento caudal (seta amarela), região cefálica (RCF), região caudal (RCD), córion (CO), gota de lipídio (*), saco vitelínico (SV) e vesícula óptica (seta branca). **F)** Início da movimentação larval para eclosão (28 HAF) (seta branca), região cefálica (RCF), região caudal (RCD), gota de lipídio (*), saco vitelínico (SV), somitos (S) e córion (seta branca) com menor espessura, indicando proximidade do momento da eclosão.

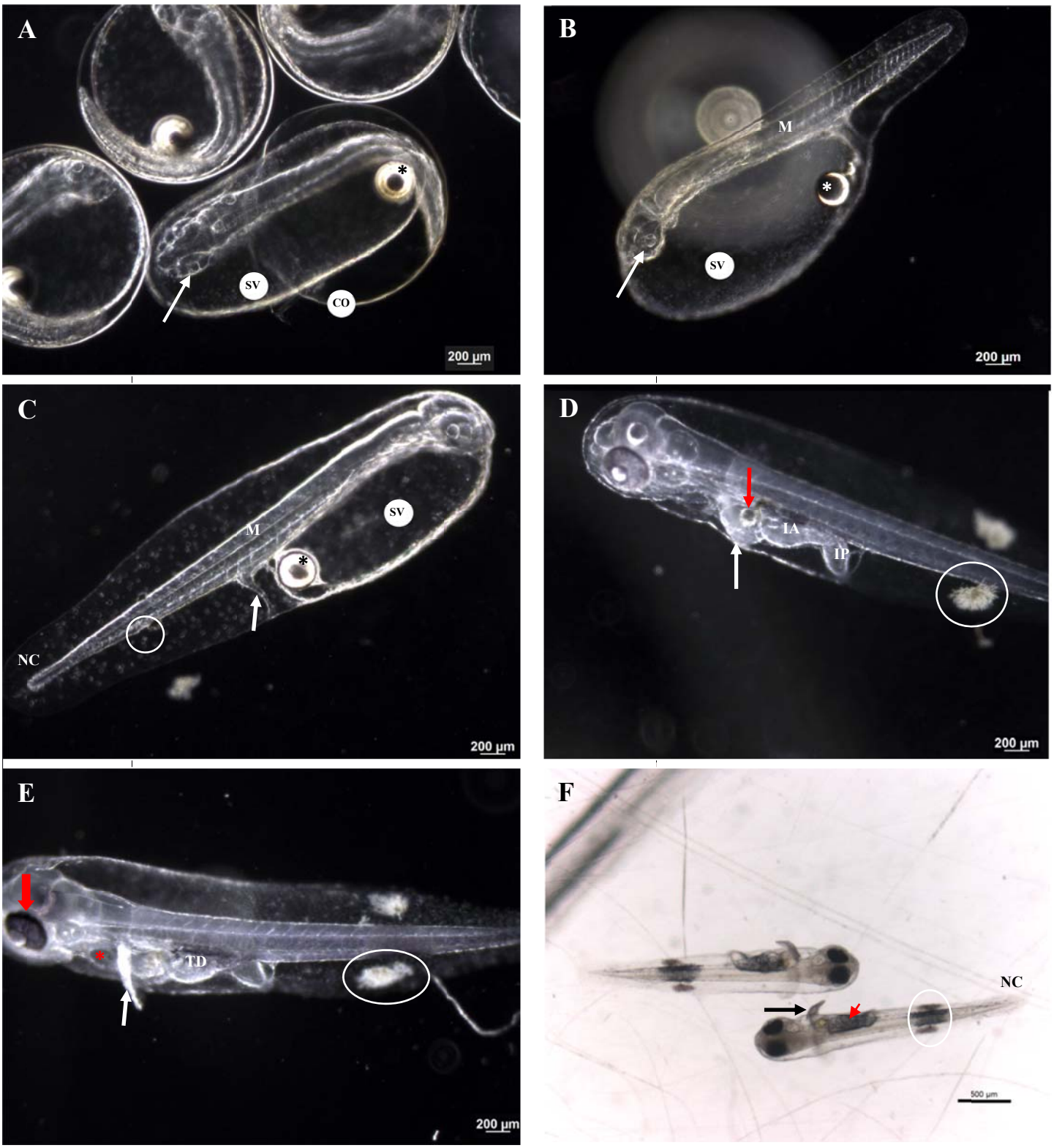

A
SV
CO
200 µm
B
M
SV
200 µm
C
M
SV
NC
200 µm
D
IA
IP
200 µm
E
TD
200 µm
F
NC
500 µm

Figura 3. Fases de desenvolvimento durante a embriogênese e organogênese de *E. marginatus*. **A)** Processo de eclosão (31 HAF) no momento de rompimento do córion (CO), saco vitelínico (SV), olhos ainda não pigmentados (seta branca) e gota de lipídio (*). **B)** Larva recém eclodida (1 HAE - hora após a eclosão) com musculatura (M), saco vitelínico (SV), olhos não pigmentados (seta branca) e gota de lipídio (*). **C)** Larva com 1 DAE (dia após a eclosão) apresentando consumo do saco vitelínico (SV), nadadeira caudal em desenvolvimento (NC), musculatura dorsal (M), gota de lipídio (*), com início da pigmentação (círculo branco) na região da linha lateral, apresentando início da formação do sistema excretor e digestório (seta branca). **D)** Larva com 1 dia e meio AE, com saco vitelínico reduzido (seta vermelha), gota de lipídio presente (seta branca), intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP) e pigmentação (círculo branco) mais avançados. **E)** Larva com 2 DAE, olhos pigmentados (seta vermelha), nadadeiras peitorais desenvolvidas (seta branca), região do fígado e coração (*) com formação mais robusta, trato digestório (TD) e pigmentação (circulo branco) mais evidentes. **F)** Larva com 3 DAE com poro urogenital e boca abertos, nadadeira peitoral (seta preta), trato digestório (seta vermelha) bem desenvolvido, pigmentação (círculo branco) mais robusta, e nadadeira caudal (NC).

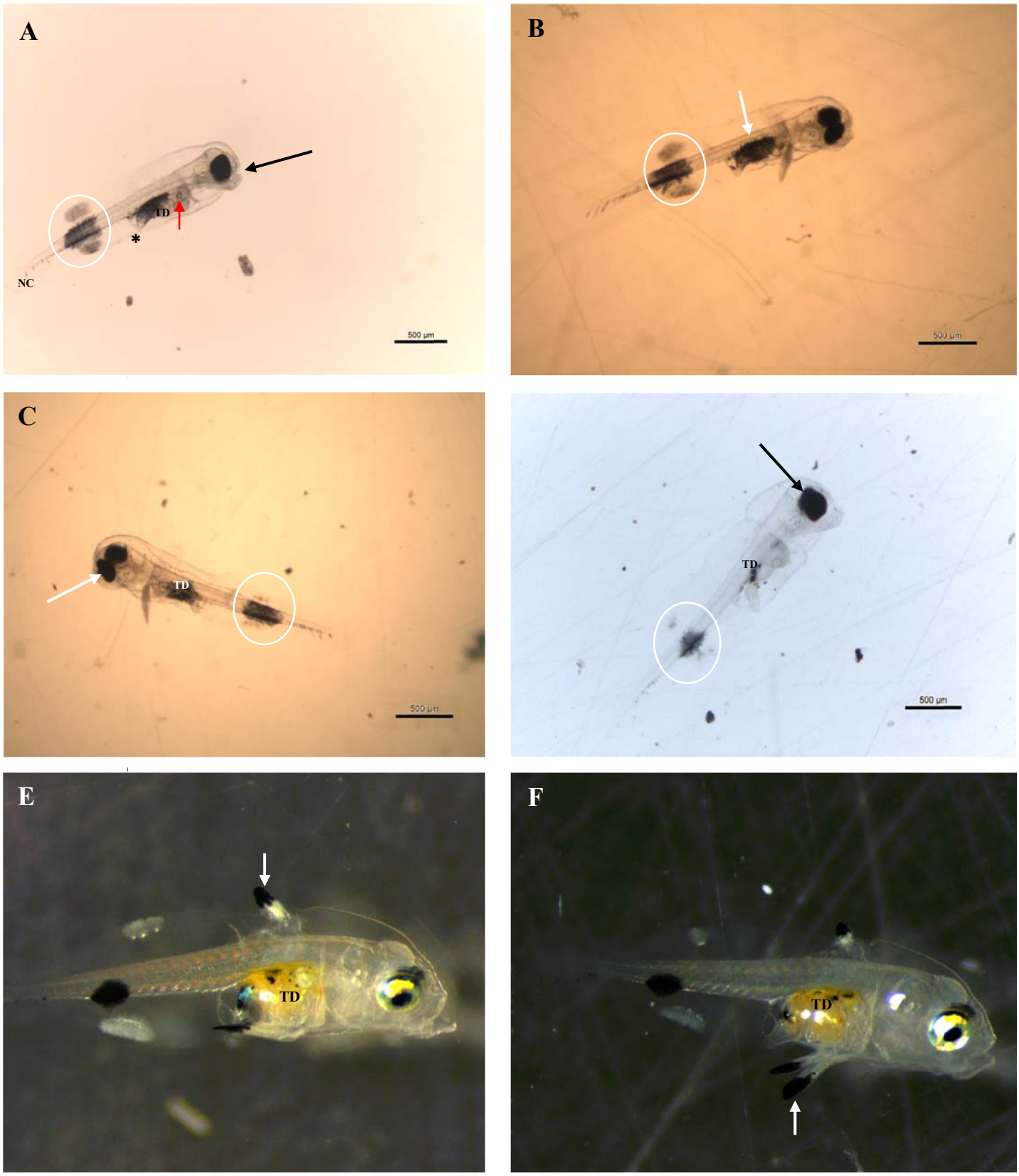

A
TD
*
NC
500 µm
B
500 µm
C
TD
500 µm
TD
500 µm
E
TD
F
TD

Figura 4. Fases de desenvolvimento durante larvicultura de *E. marginatus.* **A)** Larva com 4 DAE, com a boca aberta e funcional (seta preta), pigmentação (círculo branco), poro urogenital (*), trato digestório (TD) mais desenvolvidos, e gota de lipídio ainda presente (seta vermelha). **B)** Larva com 5 DAE, evidenciando pigmentação na linha lateral próxima a região caudal (círculo branco), pigmentação e trato digestório (seta branca). **C)** Larva com 6 DAE, com pigmentação dos olhos (seta branca), região do trato digestório e próxima a região caudal bem características. **D)** Larva com 7 DAE, com região cefálica (seta preta) bem desenvolvida, trato digestório (TD) e pigmentação (círculo branco) avançadas. **E)** Larva com 8 DAE, com formação da nadadeira dorsal (seta preta) e trato digestório com alimento (TD). **F)** Larva com 9 DAE com nadadeiras peitorais formadas (seta branca) e trato digestório com alimento (TD).

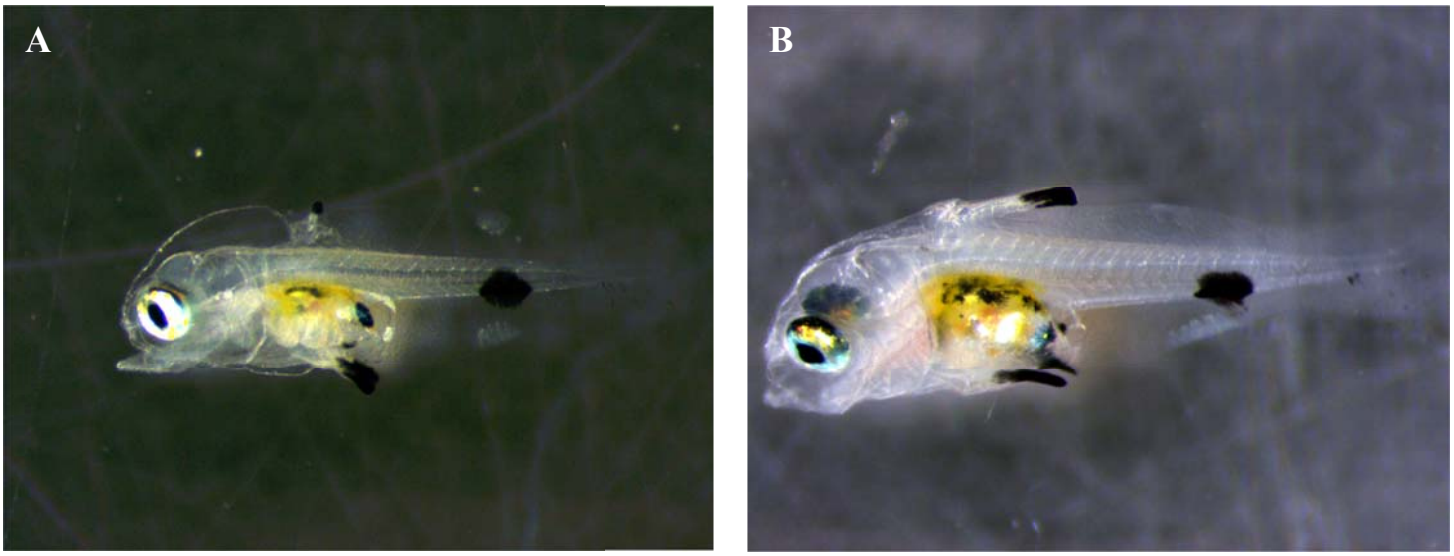


Figura 5. Fases de desenvolvimento durante a larvicultura de *E. marginatus*. **A)** Larva com 14 DAE, com fase larval bem desenvolvida. **B)** Larva com 16 DAE com início da formação do estágio de curvatura da nadadeira caudal.

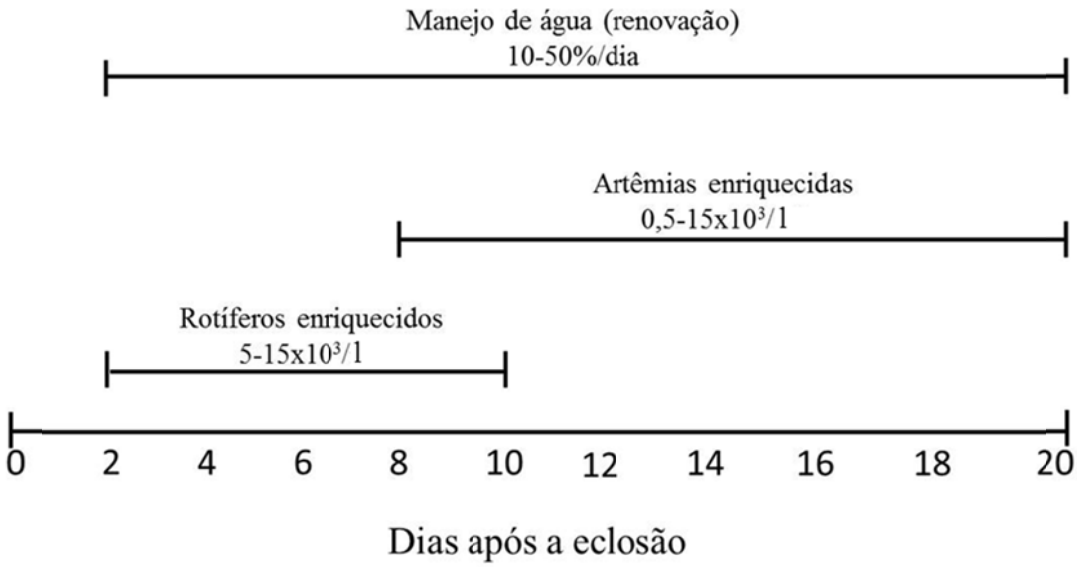


Figura 6. Manejo alimentar e de renovação de água ao longo do período experimental da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*.

Capítulo 2

Alterações morfológicas ao longo da ontogenia das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae) com enfoque no sistema digestório

Paulo H. Mello[1,2]; Bruno C. Araújo;[1,2]; Mariana F. Campos;[1,2]; Jandyr A. Rodrigues-Filho[1,2]; Carlos E.O. Garcia[1,2]; Renata G. Moreira[1,2].

[1]- Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, São Paulo, Brasil. phmello@usp.br

[2] - Universidade de São Paulo, Centro de Biologia Marinha, São Sebastião, Brasil.

Resumo

O presente trabalho analisou a ontogenia do sistema digestório das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias de desenvolvimento. Do ponto de vista morfológico, as larvas da garoupa verdadeira apresentam desenvolvimento muito similar a outras espécies congenéricas, no entanto, lento em comparação com outras espécies marinhas. As larvas da garoupa apresentam uma fase mista de alimentação endógena e exógena observada entre os dias 4 e 7 após a eclosão. Observamos até o 16º DAE diversas estruturas do sistema digestório como: a boca e poro urogenital abertos com a boca apresentando os dentes faríngeos e papilas gustativas, esôfago com células secretoras de muco, estômago compartimentalizado sem glândulas gástricas, intestino compartimentalizado com esfíncteres presentes e células caliciformes. De uma forma geral podemos observar que as larvas da garoupa-verdadeira apresentam um padrão de desenvolvimento morfológico do trato digestório muito similar à maioria dos teleósteos e a outras espécies congenéricas, com órgãos relacionados à captura, ingestão e digestão e glândulas anexas presentes a partir do

4ºDAE, o que nos permite afirmar que estes animais estão aptos a capturar, ingerir e digerir alimento vivo a partir do 4ºDAE.

Palavras-chave: Larvas, ontogenia, sistema digestório, desenvolvimento, garoupa verdadeira.

Abstract

This study analyzed the ontogeny of the digestive system in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* larvae during the early days of development. From the morphological point of view, the dusky grouper larvae present a very similar development pattern compared to other congeneric species, but, slow when compared with other marine species. The grouper larvae present a mixotrophic phase feeding observed between 4 and 7 days after hatching. We observed until the 16thDAH different structures of the digestive system such as the opened mouth and urogenital pore, with the mouth presenting the taste buds and pharyngeal teeth, the esophagus with mucus secreting cells, compartmentalized stomach without the gastric glands, compartmentalized intestine with sphincters with goblet cells. In general we can observe that the dusky grouper larvae present the pattern of morphological development of the digestive tract very similar to most teleosts fishes and other congeneric species, with organs related to capture, ingestion, digestion and accessory glands present from 4ºDAH, which allows us to affirm that these animals are able to capture, ingest and digest live food from that moment.

Keywords: Larvae, ontogeny, digestive system, development, dusky grouper.

1. Introdução

Durante os períodos embrionário e larval os eventos dominantes são crescimento, diferenciação de tecidos e alterações fisiológicas (Fuiman e Higgs, 1997) e estudos voltados para o conhecimento específico desses períodos nos permite entender sobre sua morfologia e fisiologia viabilizando o cultivo desses animais durante essa fase tão crítica da vida dos peixes. Nos últimos 25 anos diversos estudos que abordam a ontogenia do trato digestório das larvas de peixes têm sido desenvolvidos. Tais estudos são muito importantes, pois fornecem informações acerca do desenvolvimento das espécies de peixes, sendo essas informações úteis para aplicações no cultivo (Lazo *et al*., 2011).

Mais especificamente, o conhecimento sobre a ontogenia do sistema digestório permite descrever a cronologia do surgimento dos principais órgãos digestórios e suas glândulas anexas e, com isso, entender quando ocorrem as alterações morfológicas e fisiológicas durante essa fase do desenvolvimento. Com o conhecimento exato sobre o surgimento das principais estruturas digestórias e sua funcionalidade, podemos elaborar protocolos de manejo e nutricionais específicos, contribuindo assim para sua domesticação e maior sobrevivência. A análise histológica da cronologia ontogenética dos órgãos e células do sistema digestório é considerado por Hamlin *et al*. (2000) o método mais acurado para avaliar o surgimento, funcionalidade e condição nutricional das larvas.

Diferentes espécies de peixes desenvolveram estruturas alimentares e digestórias específicas que permitem a cada uma delas se alimentar de uma vasta variedade de plantas e/ou animais, e consequentemente, seu sistema digestório possui características para capturar, digerir e assimilar esses diferentes alimentos (Moyle e Cech, 2000). A necessidade nutricional de cada espécie durante o período larval é diferente dos juvenis

e adultos e, portanto, sua morfologia, fisiologia e comportamento são pontos que devem ser considerados visando suprir as necessidades nutricionais desses animais nessa fase (Wallace *et al*., 2005).

O período larval é considerado o período mais crítico durante a vida dos peixes, uma vez que envolve as maiores alterações metabólicas e morfológicas, principalmente no sistema digestório (Govoni *et al*., 1986). A fase de transição da alimentação endógena para a exógena que ocorre durante o período larval muitas vezes é acompanhado de grandes mortalidades sendo, por isso, considerado um período crítico (Holt *et al.*, 2011). Para buscar alternativas de manejo e protocolos capazes de reverter esse quadro é imperativo o conhecimento da cronologia do sistema digestório nas larvas de peixes, principalmente, em espécies com potencial para a aquicultura e espécies ameaçadas de extinção.

O conhecimento da diferenciação do sistema digestório e das glândulas anexas ao longo do desenvolvimento larval é essencial para entender a fisiologia digestória e nutricional e aperfeiçoar técnicas de cultivo em cativeiro (Lazo *et al*., 2011). Sabendo da importância dos estudos voltados para a ontogenia dos órgãos do trato digestório, aliado ao fato da garoupa verdadeira se encontrar na lista de espécies ameaçadas de extinção, o objetivo do presente trabalho foi investigar o surgimento dos principais órgãos do sistema digestório e glândulas anexas na garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias de desenvolvimento, fornecendo subsídios para entender o desenvolvimento desses animais visando contribuir para a domesticação dessa espécie em cativeiro.

2. Materiais e Métodos

Os animais (ovos fertilizados) foram adquiridos junto à Empresa Redemar Alevinos localizada no município de Ilha Bela, SP, Brasil. Os ovos fertilizados foram transferidos para o CEBIMar/USP e acondicionados em tanques de $2m^3$. Os tanques foram mantidos sem fluxo de água durante os primeiros quatro dias após a fertilização (DAF) somente com aeração bem suave distribuída com difusores de ar de madeira a fim manter um pequeno fluxo de água dentro da caixa e evitar choque mecânico dos ovos e larvas com a parede da caixa. Os ovos e larvas sobreviveram até o 16ºDAE.

Após a abertura da boca as larvas foram alimentadas inicialmente com rotíferos (S-type – *Brachionus rotundiformes*) a uma densidade conforme a figura 10. A densidade de rotíferos era estimada duas vezes ao dia (manhã e tarde) a fim de manter a densidade de alimento ajustada e disponível para as larvas. Os rotíferos foram alimentados diariamente com alga em pasta *Rotigrow*® e posteriormente enriquecidos com *N-rich*® adquiridos junto à empresa *Reed mariculture* (*Campbell, CA, USA*). As concentrações foram utilizadas seguindo as instruções do fabricante.

As larvas foram submetidas a um fotoperíodo natural, as trocas de água foram iniciadas no 2ºDAE e a taxa de renovação foi progressivamente sendo elevada (figura 6). O manejo sanitário foi realizado por sifonamento do fundo da caixa a cada dois dias para retirada da matéria orgânica acumulada no fundo da caixa. Foi colocada uma tela de sombrite em cima dos tanques para evitar incidência direta da luz do sol e permitir um ambiente mais ameno para as larvas.

Para as análises morfológicas as larvas (n=5) foram coletadas uma vez por dia até o 16ºDAF, anestesiadas e fixadas em solução de Bouin acético e permaneceram por 14-24 horas (dependendo do tamanho da larva) neste fixador. Após esse período, as amostras passaram por várias lavagens com água e foram transferidas para etanol 70%.

Após esses procedimentos as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70 a 95%), seguida de pré-inclusão em solução A (Historesina + etanol 100% em uma diluição de 1:1) durante 2 horas, seguido de impregnação em solução A pura mantidas *overnight* em rotação. Após esse processo foi realizada inclusão em solução B (solução A + polimerizador), previamente colocada em formas de silicone. As amostras incluídas em historesina foram coladas em um bloco de madeira e levados ao micrótomo (Leica RM2255) onde foram cortadas longitudinalmente a uma espessura de 2µm com uma navalha de vidro de 10mm. Os cortes foram então distendidos em água contendo algumas gotas de etanol e, em seguida, levemente retirados com a lâmina.

Para a coloração foi utilizado o método de azul de toluidina e fucsina. As lâminas foram inicialmente imersas em água destilada, em seguida corada durante 3 minutos em azul de toluidina (0,1%) e novamente imersas em água destilada durante 1 minuto. Após esse procedimento, foram coradas com fucsina básica (0,05%) durante 10 segundos e em seguida imersas em água destilada novamente. Após esse procedimento foram secas, recobertas por lamínulas e coladas com Entelan (Merck).

Após a preparação das lâminas, as amostras foram analisadas sob microscópio Leica (DM1000) e as imagens foram capturadas com auxílio de um sistema computadorizado de captura de imagens (Leica DFC 295, *Leica Application Suíte Professional* – LAS – 3.6).

Para a análise do comprimento total, área do saco vitelínico e abertura da boca foi utilizado o sistema de captura e análise de imagens Leica DFC 295, *Leica Application Suite Professional* – LAS – 3.6. Para as análises do tamanho bucal utilizamos protocolo descrito por Shirota (1970).

3. Resultados

3.1. Histologia das larvas

Foram identificadas diversas estruturas do sistema digestório das larvas da garoupa verdadeira, com enfoque em algumas das mais importantes células de cada órgão deste sistema bem como suas glândulas anexas. A ontogenia dos principais órgãos e células do sistema digestório e glândulas anexas estão resumidas na figura 9.

3.2. Saco vitelínico

Nos 3 primeiros dias após a eclosão as larvas da garoupa verdadeira possuem o saco vitelínico de coloração homogênea ocupando grande volume na região abdominal, com uma única gota de lipídio de formato circular localizada na região posterior dessa estrutura (figuras 1A, B, C, D, E e F). O saco vitelínico já pode ser visualizado horas após a fertilização e foi observado microscopicamente através das análises histológicas até o 7ºDAE, bem como a gota de lipídio (figuras 2A, B, C, D, F e 4A).

3.3. Tubo digestório e Bucofaringe

Com um dia após a eclosão podemos observar o início da formação do tubo digestório que se apresenta como um tubo estreito e indiferenciado (figuras 1B, C e F). Podemos observar a cavidade bucofaríngea no 1ºDAE (figura 1C). No 4ºDAE podemos observar a cavidade bucal aberta e a cavidade bucofaríngea formada por epitélio escamado simples (figuras 2D, E e F).

Foi possível observar as papilas gustativas a partir do 13ºDAE (figuras 5A e B). Além disso, foram observados os dentes faríngeos a partir do 16ºDAE (figuras 5E).

3.4. Esôfago

O esôfago somente foi visualizado no 3ºDAE (figuras 2A e B), bem como no 4ºDAE (figuras 2D, E e F). O esôfago foi inicialmente caracterizado por um epitélio estratificado com pequeno lúmen no interior do epitélio com células irregulares em sua borda e revestidas por uma camada fina de musculatura (figuras 2D, E e F). Aos 12DAE foi possível visualizar o início da formação das bolsas longitudinais do esôfago (figuras 4F e 5B) e células secretoras de muco aos 10DAE (figuras 4C, 5A e 5D). Foram observados os esfíncteres pilóricos e cardíacos a partir do 4ºDAE (figuras 2F, 4D e 5C).

3.5. Intestino

O início da formação do intestino posterior foi observado com um dia após a eclosão (figura 1B). No dia da eclosão, o trato gastrointestinal é inicialmente um tubo reto indiferenciado e somente a partir do 2ºDAE foi possível observar a formação do intestino posterior na região posterior do saco vitelínico (figura 1F), bem como a formação do reto (figura 1F). Com 3DAE é possível observar o intestino medial já com células de epitélio colunar estratificado e juntamente com o intestino posterior apresentam formato de L (figuras 2B e C). Aos 3DAE ainda não é possível caracterizar diferenças morfológicas entre os intestinos médio e posterior, sendo ambos caracterizados por epitélio colunar simples (figuras 2B e C). Já nesse dia os animais estavam com a boca aberta e foi possível observar claramente a dilatação do lúmen intestinal bem como foi possível visualizar a formação do reto (figura 2C). A partir do 12ºDAE observamos as células caliciformes (figura 5F) e a válvula ileoretal foi observada aos 6DAE (figura 4E).

3.6. Estômago

O estômago foi observado com 4DAE através da continuação do esôfago, sendo o estômago caracterizado por epitélio cúbico simples e o tecido do esôfago caracterizado pelo epitélio estratificado (figuras 2D e F). Embora tenhamos observado a compartimentalização do estômago, não observamos as glândulas gástricas nos dias analisados.

3.7. Fígado e Pâncreas

As glândulas anexas ao trato digestório foram somente visualizadas aos 4DAE, sendo o fígado identificado abaixo do estômago e à frente do intestino medial e o pâncreas acima do intestino posterior e abaixo da coluna vertebral (figuras 2D e F). Além de fígado e pâncreas os rins foram identificados no 4DAE (figuras 2D e F).

3.8. Parâmetros morfométricos

3.8.1. Comprimento larval

O comprimento larval foi acompanhado a partir de momento da eclosão (Tabela 1 e figura 6), no entanto durante esse experimento essa medida só foi realizada até o 9ºDAE. Já no momento da eclosão as larvas apresentavam comprimento médio de 0,77mm e crescimento significativo entre os dias após a eclosão até o 4ºDAE, momento no qual as larvas abriram a boca. Após o 4ºDAE os animais não apresentaram crescimento e até apresentaram uma diminuição em seu comprimento larval até o 9ºDAE (Tabela 1 e figura 6).

3.8.2. Comprimento da boca

A abertura da boca foi verificada no 3ºDAE, no entanto, só estava funcional ao 4ºDAE e não foi possível mensurar a abertura da boca uma vez que a mandíbula ainda se encontrava em uma posição muito ventral em relação à maxila, não permitindo o registro fotográfico para posterior mensuração. Observamos um aumento significativo no comprimento da boca do 5ºDAE para o 6ºDAE ($p<0,05$) (Tabela 1 e figura 7). Observamos também um aumento significativo do 7º para o 8ºDAE ($p<0,05$) e em seguida o comprimento bucal permaneceu inalterado (Tabela 1 e figura 7).

3.8.3. Área do saco vitelínico

A partir do momento da eclosão foi mensurada a área do saco vitelínico para analisar macroscopicamente o consumo das reservas desta estrutura ao longo dos dias de desenvolvimento da larva. No momento da eclosão, foi mensurada uma área de $0,35mm^2$ que foi significativamente sendo consumida até o 2ºDAE ($p<0,001$). No 2º e 3ºDAE não houve consumo significativo do saco vitelínico, o qual foi quase totalmente consumido, de acordo com a análise macroscópica no 4ºDAE ($p<0,002$) (Tabela 1 e figura 8).

4. Discussão

Durante os dias analisados as larvas da garoupa apresentaram desenvolvimento tardio em relação a outras espécies de teleósteos cultivados em cativeiro como, por exemplo, *greater amberjack* (Papandroulakis *et al*., 2005) e o *meagre* (Papadakis *et al*., 2013). O saco vitelínico das larvas da garoupa verdadeira possuem aspecto homogêneo ocupando grande volume na região abdominal, com uma única gota de lipídio de formato circular localizada na região posterior do saco vitelínico. Ambos foram

visualizados até o 7ºDAE na garoupa verdadeira mostrando que a nutrição endógena e exógena ocorre simultaneamente até esse dia.

Durante a nutrição endógena que durou até o 3ºDAE os animais se nutrem exclusivamente das suas reservas do saco vitelínico e da gota de lipídio que serão absorvidos através da camada sincicial (Balon, 1986; Diaz *et al*., 2002; Hemming e Buddington, 1988), que é formada durante a epibolia (Hemming e Buddington, 1988). O saco vitelínico e a gota de lipídio são absorvidos e utilizados na atividade intracelular da camada sincicial no vitelo, cuja função é acelerada pela circulação sanguínea que começa com o início da função cardíaca (Ronnestad *et al*., 1992).

Na maioria das larvas das espécies de teleósteos, no momento da eclosão o trato digestório é descrito como um tubo estreito localizado dorsalmente ao saco vitelínico (Lazo *et al*., 2011). Este é o caso das larvas da garoupa verdadeira que possuem um trato digestório formado por um epitélio ainda não diferenciado, localizado dorsalmente ao saco vitelínico e de uma maneira geral, a parede do trato digestório é formada pelas camadas serosa, muscular, submucosa e a mucosa, partindo do esôfago até o intestino posterior e reto, lembrando que a cavidade bucal e a faringe não possuem a camada serosa (Hossain e Dutta, 1996).

Comparando o surgimento de uma estrutura básica relacionada à gustação e seleção de presas, como as papilas gustativas, observamos o surgimento desta estrutura somente aos 13DAE, enquanto que, para espécies como *Argyrossomus regius* (Papadakis *et al*., 2013), *Petenia splendida* e *Oxyeleotris marmoratus* (Abol-Munafi *et al*., 2006), essa estrutura foi verificada respectivamente aos 4, 3 e 3DAE. Outra estrutura que pode refletir desenvolvimento tardio nas larvas de garoupa é a presença das estruturas relacionadas à captura de presas como, os dentes faríngeos, que foram observados nas larvas da garoupa verdadeira aos 16DAE, enquanto que, em outras

espécies como *Seriola lalandi* (Chen *et al*., 2006) e *Dentex dentex* (Santamaria *et al*., 2004) esta estrutura surgiu respectivamente aos 8 e 7DAE.

As células secretoras de muco localizadas no esôfago são responsáveis pela produção e secreção de muco que irá atuar na proteção mecânica e infecciosa das paredes do esôfago (Gisbert *et al*., 1999; Humbert *et al*., 1984), facilitar a ingestão alimentar (Abol-Munafi *et al*., 2006; Kapoor *et al*., 1975), além de proteger a mucosa intestinal contra a degradação enzimática neutralizando o pH estomacal (Scocco *et al*., 1996). Nas larvas da garoupa foi observada somente aos 12DAE, sendo que, em espécies como o *meagre* (*Argyrossomus regius*) esta estrutura surge aos 5DAE (Papadakis *et al*., 2013). Além disso, as bolsas longitudinais que estão relacionadas à expansão do esôfago para ingestão de alimento e que indica a habilidade da larva em se alimentar exogenamente somente foram verificadas aos 12DAE nas larvas da garoupa verdadeira. Em outras espécies cultivadas como *Argyrossomus regius* (Papadakis *et al*., 2013) esta estrutura foi observada aos 2DAE e foi associada ao rápido desenvolvimento e capacidade avançada de se alimentar exogenamente.

Além disso, de uma forma geral as larvas de teleósteos marinhos apresentam um padrão muito similar de desenvolvimento do trato digestório nos primeiros dias após a eclosão, sendo que após a diferenciação inicial as larvas apresentam bucofaríngе, esôfago, intestino, pâncreas e fígado, além do estômago que apresenta variação de desenvolvimento entre as espécies (Lazo *et al*., 2011).

A cavidade bucofaríngea da garoupa foi visualizada aos 2DAE, caracterizada por epitélio escamado simples, assim como encontrado para as larvas de *Plectropomus leopardus* (Qu *et al*., 2012) e para as larvas de *Epinephelus coioides* (Quinitio *et al*., 2004). A abertura da boca foi verificada aos 4DAF apresentando apenas um descolamento da mandíbula em relação à maxila numa posição ventral. Nesse dia não

foi observado alimento no trato digestório das larvas, no entanto, encontramos vitelo na região abdominal das larvas.

O esôfago foi visualizado aos 3DAE e neste estágio conecta a região posterior da faringe partindo do último arco branquial se conectando ao intestino anterior como um tubo morfologicamente não diferenciado. Já em *E. coioides*, Quinitio *et al*. (2004) visualizaram o desenvolvimento do esôfago aos 2DAE. Vale lembrar que nessa fase o esôfago liga diretamente a faringe ao intestino posterior, uma vez que o estômago ainda não estava diferenciado. Já aos 12DAE podemos visualizar as bolsas longitudinais e as células secretoras de muco que já caracterizam a diferenciação histológica do esôfago (Lazo *et al*., 2011).

No 4ºDAE, podemos observar o início da compartimentalização do estômago com o aparecimento dos esfíncteres pilóricos e cardíaco, caracterizado por epitélio cúbico simples. No entanto, as glândulas gástricas não foram encontradas em nenhuma das larvas analisadas. Em estudo com uma espécie da subfamília Epinephelinae (*Plectropomus leopardus*), Qu *et al*. (2012) identificaram a diferenciação das glândulas gástricas e o surgimento dos cecos pilóricos a partir do 17ºDAE, enquanto que Quinitio *et al*. (2004) visualizaram glândulas gástricas e cecos pilóricos aos 20DAE em *E. coioides*, o que permite a classificação do estágio de juvenis, ou seja, os animais passam do estágio de larvas para juvenis a partir dessas diferenças morfológicas. Segundo Tanaka (1971) a diferenciação das glândulas gástricas e dos cecos pilóricos são os indicadores morfológicos da passagem da fase larval para a fase de juvenil, etapa que não atingimos no presente trabalho considerando que não atingimos a idade na qual esta diferenciação ocorre.

Nos vertebrados, o estômago possui função de armazenar o alimento, secretar pepsinogênio e ácido clorídrico (células parietais e principais), além de misturar o

alimento às secreções gástricas que é possível devido à musculatura que recobre o órgão e promove os movimentos de distensão e contração (Stevens e Hume, 2005). O período de desenvolvimento do estômago bem como das glândulas gástricas varia muito entre as espécies de teleósteos (Zambonino-Infante e Cahu, 2001; Zambonino-Infante *et al*., 2008), podendo em algumas espécies como no *barramundi* (*Lates calcarifer*) ser visualizado já aos 15DAE (Walford e Lam, 1993), e em outras espécies como o linguado (*Solea solea*) ser visualizado aos 10DAE (Bouhlic e Gabauldan, 1992). Na garoupa verdadeira foi visualizado o início da compartimentalização do estômago aos 4DAE, enquanto que em outras espécies de serranídeos *Plectropomus leopardus* e *Epinephelus coioides*, Qu *et al*. (2012) e Quinitio *et al*. (2004) identificaram o surgimento do estômago aos 2DAE.

Após o 10ºDAE podemos visualizar o surgimento das células secretoras de muco no esôfago, o que indica estágio avançado da formação deste tecido. Estas células possuem a função de secretar muco e facilitar a passagem do alimento durante a alimentação exógena. Em algumas espécies essas células aparecem logo após a abertura da boca como: *Solea solea* (Boulhic e Gabaudan, 1992), *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al*., 1999), *Limanda ferruginea* (Baglole *et al*., 1997), *Pseudociena crocea* (Mai *et al*., 2005) e em duas espécies de esturjão, *Ascipenser baerii* (Gilsbert *et al*., 1999) e *Ascipenser medirostris* (Gilsbert e Doroshov, 2003). O muco secretado por essas células atuam de forma análoga à saliva, que somente é produzida pelos mamíferos e possuem funções muito similares, atuando além de lubrificantes para a mucosa do trato digestório (Scocco *et al*., 1998), atuam produzindo ácido siálico que serve para prevenir infecções por bactérias (Zimmer *et al*., 1992). Assim como a garoupa verdadeira, *P. leopardus*, também apresentou desenvolvimento similar do esôfago (Qu *et al*., 2012), no entanto, em *P. leopardus* o aparecimento do esôfago ocorreu de forma mais precoce aos 2DAE.

Da mesma forma, as bolsas longitudinais, bem como as células secretoras de muco foram visualizadas aos 7DAE em *P. leopardus* (Qu *et al*., 2012), surgindo mais tardiamente nas larvas da garoupa verdadeira. Sabemos que inúmeros parâmetros afetam o desenvolvimento das larvas de teleósteos, dentre eles a temperatura. Vale ressaltar que a temperatura média durante a larvicultura da garoupa verdadeira foi de 23,0ºC e a temperatura de cultivo das larvas de *P. leopardus* variaram entre 24-29,0ºC o que pode ter acelerado o desenvolvimento de determinadas estruturas como a formação completa do esôfago.

O intestino é uma das primeiras estruturas a se diferenciar nas larvas de teleósteos e também é a mais longa das porções do trato digestório, ocupando quase toda cavidade da região abdominal (Lazo *et al*., 2011). O intestino posterior bem como o reto já foi visualizado no 3ºDAE na garoupa verdadeira, mostrando que este órgão apresenta um crescimento dinâmico e ativo, pois desempenha um papel de suma importância nos processos de digestão e absorção dos nutrientes. Além disso, o intestino quando maduro atua em inúmeras outras funções como ativação hormonal, produção de enzimas, além de estimular a produção da bile pelo fígado e pâncreas (Lazo *et al*., 2011). A partir do 3ºDAE, é possível visualizar o intestino medial ou pré-valvular nas larvas da garoupa verdadeira. Já a partir do 4ºDAE, podemos observar que ocorre a formação de bolsas e dobramento do tecido intestinal, pois, o intestino vai aumentando em comprimento e ocupando cada vez maior volume na cavidade abdominal, com vistas a aumentar a superfície de digestão e absorção uma vez que a quantidade de alimento vai aumentando com o desenvolvimento das larvas (Lazo *et al*., 2011). Além disso, essa diferenciação é um ponto importante, pois é nessa região que ocorre a liberação das enzimas pancreáticas e secreções biliares, além de ser uma região de absorção de

lipídios e proteínas (Diaz *et al*., 1997; Olsen *et al*., 2000) desempenhando um papel muito importante para o metabolismo das larvas da garoupa.

Outras estruturas como, por exemplo, a válvula ileoretal, indica a compartimentalização do intestino. Este processo de compartimentalização do trato digestório facilita a digestão e ação das enzimas dentro de cada compartimento, uma vez que o alimento permanece mais tempo dentro do intestino com ação restrita das enzimas nas diferentes seções do intestino (Kowalska *et al*., 2006; Pedersen e Hjelmeland, 1988). Enquanto na maioria das espécies como *Scophthalmus maximus* (Segner *et al*., 1994), *Ascipenser medirostris* (Gisbert e Doroshov, 2003), *Argyrossomus regius* (Papadakis *et al*., 2013), esta estrutura é observada já no final da fase autotrófica, nas larvas da garoupa foi verificada somente aos 6DAE.

No 4ºDAE também observamos o fígado e o pâncreas que juntamente com os órgãos descritos acima, desempenham papel determinante no metabolismo dos nutrientes, bem como conversão de substratos e envio desses metabólitos para tecidos periféricos. Além disso, o fígado secreta bile que possui papel na emulsificação dos lipídios e o pâncreas que atuará na produção de enzimas pancreáticas que serão secretadas na região anterior do intestino.

De uma forma geral podemos observar que as larvas da garoupa verdadeira apresentam um padrão de desenvolvimento morfológico do trato digestório muito similar à maioria dos teleósteos, com órgãos relacionados à digestão e glândulas anexas presentes. Segundo Yúfera e Darias (2007), o padrão anatômico necessário para a alimentação exógena consiste em possuir estruturas para a localização (olhos e órgãos sensoriais), captura (boca, nadadeiras e músculos), ingestão e digestão (trato digestório).

Com base nestas informações, do ponto de vista morfológico a partir do 4ºDAE as larvas da garoupa verdadeira estão aptas a capturar, digerir e assimilar alimentos

exógenos. No entanto, para que possamos inferir dados de forma mais prática precisamos complementas informações, por exemplo, da atividade enzimática durante essa fase, uma vez que morfologicamente identificamos que as larvas estão aptas a realizar estes processos, porém, estes dados bioquímicos de atividade enzimática são importantes para complementar essa informação e elucidar o potencial de ação fisiológico desses órgãos nesses animais durante essa fase.

Com relação ao comprimento total, no momento da eclosão, as larvas da garoupa verdadeira apresentavam comprimento muito inferior em comparação a outras espécies e até mesmo com outro trabalho com a mesma espécie, uma vez que o comprimento total médio das larvas da garoupa verdadeira no momento da eclosão foi de 0,77mm. Glamuzina *et al*. (1998) relatam para *E. marginatus* comprimento total 1,52mm, e Cunha *et al*. (2013) 2,3mm, e trabalhos com espécies congenéricas relatam comprimento total maiores como em *E. merra* com comprimento total no momento da eclosão de 1,5mm (Jagadis *et al*., 2006), bem como híbridos descritos por Glamuzina *et al*. (2000) com 1,76mm de comprimento total. Embora algumas variáveis possam influenciar no crescimento dos animais, com destaque para a temperatura, podemos afirmar que as larvas da garoupa verdadeira são as menores larvas descritas para o gênero no momento da eclosão, fato este corroborado por Leu *et al*. (2005), que comparam os comprimentos totais de 16 espécies de garoupas no momento da eclosão e a garoupa verdadeira apresenta o menor comprimento total de todas as larvas nesta fase. Segundo Khono *et al*. (1997) o gênero das garoupas está entre os mais difíceis de se cultivar em cativeiro, devido ao tamanho muito reduzido dos animais, aliado a seu desenvolvimento tardio, estruturas ósseas pequenas formando a cavidade bucal, pequeno tamanho bucal, além de poucas reservas endógenas e baixa frequência alimentar inicial.

Após a eclosão, as larvas da garoupa verdadeira apresentaram crescimento significativo até o 4ºDAE, quando estabilizou o seu crescimento e nos 8º e 9ºDAE apresentaram redução em seu crescimento. Isto pode estar relacionado a alguma influência nutricional, e levantamos alguns pontos que podem explicar este fato como, baixa ingestão de alimento vivo, problemas na digestão ou baixa qualidade nutricional do alimento vivo fornecido, uma vez que a temperatura de 23,0ºC não parece ser um fator limitante no crescimento dessa espécie, já que outros autores como Cunha *et al*. (2013) obtiveram fases mais avançadas da larvicultura com temperatura da água no cultivo a 24,0ºC. No entanto, algumas outras variáveis podem influenciar no crescimento dos peixes como, por exemplo, outras variáveis físicas (fotoperíodo, intensidade, O_2 dissolvido) e químicas (pH, dureza e salinidade), fatores genéticos, densidade de cultivo, etc (Badisserotto, 2002).

Comparando o comprimento total máximo atingido pelas larvas da garoupa verdadeira que foi registrado no 7ºDAE, com 2,18mm, larvas de *E. merra* atingiram 2,55 já no 5ºDAE (Jagadis *et al*., 2006), enquanto que Glamuzina *et al*. (1998) observaram larvas da garoupa verdadeira com 2,63mm no 4ºDAE, enquanto que a maioria das larvas de diferentes espécies de garoupas atingem comprimento total superiores a 2,60mm já no 3ºDAE (Leu *et al*., 2005) evidenciando o pequeno comprimento dessas larvas no momento da eclosão.

Quanto à área do saco vitelínico podemos observar um consumo acelerado das reservas energéticas, que se esgotaram visualmente do 4º para o 5ºDAE. Podemos observar uma relação inversa entre o consumo do saco vitelínico e o comprimento total das larvas da garoupa, uma vez que com quanto menor a área do saco vitelínico, maior o comprimento total das larvas da garoupa, com ambos dados morfométricos apresentando diferenças significativas no decorrer do desenvolvimento, ou seja, quanto

mais as larvas foram utilizando suas reservas energéticas, mais foram aumentando seu comprimento total. Esse dado pode nos indicar que realmente pode ter havido algum problema relacionado à nutrição das larvas da garoupa verdadeira durante essa fase, pois, até o momento em que possuíam reservas energéticas o crescimento foi significativo e no momento em que se esgotou esta reserva vitelínica, os animais não foram capazes de suprir a intensa demanda energética envolvida na transição da alimentação endógena para exógena, momento esse crucial para a maioria das espécies de garoupa (Sugama *et al*., 2012).

Outro dado relevante é o tamanho da boca das larvas da garoupa verdadeira. No 5ºDAE a boca das larvas apresenta uma abertura máxima de 0,07mm e apresenta dois momentos de crescimento significativo, do 5º para o 6ºDAE e do 7º para o 8ºDAE. No entanto, embora existam tais diferenças de crescimento e certo desenvolvimento do aparato bucal, fica claro que a abertura máxima da boca da garoupa verdadeira restringe bastante sua alimentação no cativeiro. Alguns autores como Duray *et al*. (1997) sugerem somente rotíferos SS (*Brachionus rotundiformes*) para as larvas da garoupa durante esta etapa do desenvolvimento, pois apresentam tamanhos inferiores a 100µm de comprimento, enquanto Russo *et al*. (2009) sugerem o fornecimento de náuplios de copépodes. Alguns autores sugerem que a ingestão de presas durante esta fase está em sua maior parte relacionada com o tamanho da presa em relação a outros fatores como sabor ou outros sentidos (Shirota, 1970; Fernández-Díaz *et al*., 1994; Planas e Cunha, 1999; Yúfera e Darias, 2007). Com isso, podemos aplicar esta afirmação ao cultivo da garoupa verdadeira uma vez que sendo a menor em comprimento das larvas de garoupa, com pouca reserva vitelínica e tamanho bucal reduzido, estas larvas devem ser alimentadas em sua primeira alimentação bem como durante os dias analisados com a menor das variedades de rotíferos conhecida por "SS Strain" ou "S-type" da espécie

Brachionus rotundiformes, uma vez que o alimento vivo mais adequados, ainda não são disponíveis em grande escala no Brasil para abastecer maiores demandas. De uma forma prática, sugerimos o fornecimento da variedade de rotíferos "SS" ou copépodes durante a primeira alimentação e primeiros dias de desenvolvimento, uma vez que o desenvolvimento lento aliado ao pequeno tamanho da boca parecem ser fatores que limitam o uso de determinados tipos de alimento vivo. Além disso, sugerimos o enriquecimento do alimento vivo com fontes de ácidos graxos essenciais, além de ácidos graxos saturados, para que forneçam a quantidade necessária de lipídios e proteínas adequados.

Outro ponto importante relatado por alguns autores como Doi *et al*. (1991) e Kohno *et al*. (1997) foram grandes mortalidades encontradas entre o 4º e 7ºDAE em larvas de *E. coioides*. Alguns autores como Hussain e Higuchi (1980) e Kayano (1988) atribuíram essas mortalidades massivas durante esses dias ao tamanho reduzido da boca das garoupas. Além disso, Kohno *et al*. (1997) relatam que os elementos da boca se ossificam vagarosamente e associaram a dificuldade de cultivo dessa espécie a esses fatores em conjunto.

As estruturas descritas até o 16º DAE nas larvas da garoupa verdadeira indicam que esta espécie apresenta desenvolvimento relativamente lento em relação a algumas espécies cultivadas em cativeiro. Além disso, durante a larvicultura continuamos a observar elevada taxa de mortalidade nessa espécie que pode estar relacionada não somente a sua biologia e fisiologia, mas pode, em partes, ser atribuída ao alimento vivo disponível com tamanho incorreto ou ainda, a nossa estrutura física que foi utilizada durante os experimentos.

No entanto, os dados gerados já podem ser aplicados em cultivos futuros, pois permitiram descrever como as larvas desenvolvem seu trato digestório ao longo dos

primeiros 16 dias de desenvolvimento. A partir dos dados gerados, sabemos que as larvas da garoupa apresentam desenvolvimento de suas estruturas digestórias relativamente lento, no entanto, estas são capazes de capturar, ingerir e digerir presas já a partir do 4ºDAE. Além disso, durante os dias analisados verificamos que a cronologia do surgimento das estruturas do sistema digestório é similar a outras espécies de teleósteos. Consideramos de suma importância a continuidade dos estudos com enfoque no desenvolvimento larval e que são necessários mais tempo e investimento no conhecimento desta espécie, a fim de entender completamente seu desenvolvimento larval até a fase juvenil, contribuindo assim para a domesticação desta espécie no cativeiro.

5. Conclusão

Do ponto de vista morfológico, as larvas da garoupa verdadeira apresentam desenvolvimento muito similar a outras espécies congenéricas. O surgimento das principais células e órgãos do sistema digestório segue também um padrão similar a outras espécies de garoupas e as larvas possuem uma fase mista de alimentação endógena e exógena entre os dias 4 e 7 após a eclosão. Do ponto de vista prático, embora apresentem semelhanças ao grupo das garoupas, o desenvolvimento de algumas estruturas parece ser lento e, aliado ao tamanho do alimento vivo fornecido pode ter influenciado negativamente em sua alimentação exógena. Com isso, sugerimos para esta espécie a inclusão de espécies menores de alimento vivo como, por exemplo, náuplios de copépodes durante seus primeiros dias de desenvolvimento e posteriormente a inclusão dos rotíferos, possibilitando assim melhor desempenho na captura do alimento vivo pelas larvas da garoupa garantindo assim sua sobrevivência nesta fase tão crítica de seu desenvolvimento.

Os órgãos relacionados à captura, ingestão, digestão e as glândulas anexas estão presentes a partir do 4ºDAE, o que nos permite afirmar que os animais estão prontos para capturar, ingerir e digerir alimento vivo a partir deste momento.

6. Referências Bibliográficas

Abol-Munafi, A.B.; Liem, P.T.; Van, M.V.; Ambak, M.A.; Effendy, A.W.M.; Awang Soh, M.; 2006. Hystological ontogeny of the digestive system of Marble Goby (*Oxyeleotris marmoratus*) larvae. *Journal of Sustainability Science and Management*, 1:79-86.

Baglole, C.L.; Goff, G.P.; Wrigth, G.M. 1997. Ontogeny of digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a ligth microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology*, 51(1):120-134.

Baldiserotto, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Ed. UFSM. 212 p.

Balon, E. 1986. Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model. *Environmental Biology of Fishes*, 16:11-24.

Bouhlic, M.; Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*, 102(4):373-396.

Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W., Clarke, S., 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 256:489-501.

Cunha, M.E.; Quental-Ferreira, P.R.H.; Gavais, P.J.; Pousão-Ferreira, P. 2013. Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. *Journal of Fish Biology*, 83(3):448-465.

Diaz, J.P.; Guyot, E.; Vigier, S.M. 1997. First events in lipids absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology*, 51(1):180-192.

Diaz, J.-P.; Mani-Ponset, L.; Blasco, C.; Connes, R. 2002. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquatic Living Resources*, 15:169-178.

Doi, M.; Munir, M.N.; Nik Razali, N.L.; Zulkiffi, T. 1991. Artificial propagation of the grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demongo Terrengganu, Malaysia. Kertas Pengembangan Perikanan. Department of Fisheries, Malaysia. 41 pp.

Duray, M.N.; Estuddilo, C.B.; Alpasan, L.G. 1997. Larval rearing of the grouper *Epinephelus suillus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 150:63-76.

Fernández-Díaz, C.; Pascual, E.; Yúfera, M. 1994. Feeding behaviour and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae fed on inert and live food. *Marine Biology*, 118:323-328.

Fuiman, L.A.; Higgs, D.M. 1997. Ontogeny, growth and the recruitment process. In: Chambers, R.C. and Trippel, E.A. (eds.), Early Life History and Recruitment in Fish Populations. Chapman & Hall, London, pp. 225-249.

Gisbert, E.; Doroshov, S.I. 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Aquatic Living Resources*, 16:77-89.

Gisbert, E.; Sarasquete, M.C.; Williot, P. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon (*Ascipenser baeri*, Brandt) during early ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 55(3):596-616.

Gisbert, E.; Sarasquete, M.C.; Williot, P.; Castelló, F. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) during early ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 55:596-616.

Glamuzina, B.; Skaramuca, B.; Glavic, N.; Kozul, V. 1998. Preliminary studies on reproduction and early life stages in rearing trials with dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Aquaculture Research*, 29:769-771.

Glamuzina, B.; Tutman, N.G.P.; Kozul, V.; Skaramuca, B. 2000. Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1878) (Pisces, Serranidae). *Scientia Marina*, 64(3):341-345.

Govoni, J.J.; Boehlert, G.W.; Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16(1-3):59-77.

Hamlin, H.J.; Hunt Von Herbing, I.; King, L.J. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 57(3):716-732.

Heming, T.A.; Buddington, R.K. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, pp. 407-446.

Holt, G.J. 2011. Larval Fish Nutrition. In: Digestive Development and Nutrient Requirements. Lipids. Izquierdo. M.; Koven, W. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Hossain, A.M.; Dutra, H.M. 1996. Assessment of structural and functional similarities and differences between caeca of the bluegill. *Journal of Fish Biology*, 53(6):1317-1323.

Humbert, W.; Kirsch, R.; Meister, M.F. 1984. Scanning electron microscopic study of the oesophageal mucous layer in the eel *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 25:117-122.

Hussain, N. A.; Higuchi, M. 1980. Larval rearing and development of the brown spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskal). *Aquaculture*, 19:339-350.

Jagadis, I.; Ignatius, B.; Kandasami, D.; Khan, M.A. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquaculture Research*, 37:1140-1145.

Kapoor, B.G.; Smit, H.; Verighina, I.A. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology*, 13:109-239.

Kayano, Y. 1988. Development of mouth parts and feeding in the larval and juvenile stages of red spotted grouper *Epinephelus akaara.* Bulletin of the Fisheries Experiment Station, Okayama Prefecture, 3:55-60.

Kohno, H.; Ordonio-Aguilar, R.S.; Ohno, A.; Taki, Y. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyology Resources*, 44(3):267-274.

Kowalska, A.; Zakęś, Z.; Demska-Zakęś, K. 2006. The impact of feeding on the results of rearing larval pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), with regard to the development of the digestive tract. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, Fisheries 9.

Lazo, J.P.; Darias, M.J.; Gisbert, E. 2011. Ontogeny of the digestive tract. In: Holt, G.J. *Larval Fish Nutrition*. First edition, Ed. John Wiley &Sons. pp. 5-46.

Leu, M.Y.; Liou, C.H.; Fang, L.S. 2005. Embryonic and larval development of the malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). *Journal of Marine Biology*, 85:1249-1254.

Mai, K.; Yu, H.; Ma, H. 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudociaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 64(4):1094-1106.

Moyle, P.; Cech, J.J. 2000. Fishes. An introduction to Ichthyology, 4th edition. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Olsen, R.E.; Myklebust, R.; Ringo, E. 2000. The influence of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Artic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(2):207-216.

Papadakis, I. E.; Kentouri, M.; Divanach, P.; Mylonas, C.C. 2013. Ontogeny of the digestive system of meagre *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from hatching to juvenile. *Aquaculture*, 388:76-88.

Papandroulakis, N.; Mylonas, C.C.; Maingot, E.; Divanach, P. 2005. First results of greater amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture*, 250:155-161.

Pedersen, B.H.; Hjelmeland, K. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. *Marine Biology Research*, 97:467-476.

Planas, M.; Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177:171-190.

Qu, M.; Ding, S.; Xu, X.; Shen, M.; You, Y.; Su, Y. 2012. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture*, 334: 337:132-141.

Quinitio, G.F.; Sa-an, A.C.; Toledo, J.D.; Tan-Fermin, J.D. 2004. Changes in the gastrointestinal tract and associated organs during early development. In. Advances in grouper aquaculture. Rimmer, M.A.; Mcbride, S.; Williams, K.C. Australia Centre of International Research, Camberra.

Ribeiro, L.; Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 1999. Development of digestive system in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179(3-4):465-473.

Rønnestad, I.; Finn, R.N.; Groot, E.P.; Fyhn, H.J. 1992. Utilization of free amino acids related to energy metabolism of developing eggs and larvae of lemon sole Microstomus kitt reared in the laboratory. *Marine Ecology Progress Series*, 88:195-205.

Santamaría, C.A.; Marín de Mateo, M.; Traveset, R.; Sala, R.; Grau, A.; Pastor, E.; Sarasquete, C.; Crespo, S. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 237:207-228.

Scocco, P.; Ceccarelli, P.; Menghi, G. 1996. Glycohistochemistry of the *Tilapia* spp. stomach. *Journal of Fish Biology*, 49(4):584-593.

Segner, H.; Storch, V.; Reinecke, M.; Kloas, W.; Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology* 119:471-486.

Shirota, A. 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 36:353-367.

Stevens, C.E.; Hume, I.D. 2005. Comparative physiology of digestive system. Cambridge University Press, Cambridge.

Sugama, K.; Rimmer, M.A.; Ismi, S.; Koesharyani, I.; Suwirya, K.; Giri, N.A.; Alava, V.R. 2013. Hatchery management of tiger grouper (*Epinephelus fiscogatus*): A best practice manual**.** Australian Centre for International Agricultural Research. Camberra.

Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-III. Development of the digestive system during post larval stage. *Japanese Journal of Ichthyology*, 18:164-174.

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

Wallace, K.N.; Akhter, S.; Smith, E.N. 2005. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mecanisms of Development*, 122(2):157-173.

Yúfera, M.; Darias, M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae, *Aquaculture*, 268:53-63.

Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 2001. Ontogeny of digestive tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 130:477-487.

Zambonino-Infante, J.L.; Gisbert, E.; Sarasquete, C. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O.; Bureau, D.; Kapoor, B.G. (eds). Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers Inc, Enfield, NH, pp. 277-344.

Zimmer, G.; Reuter, G.; Schauer, R. 1992. Use of influenza c-virus for detection of acetylated sialic acids on immobilized glycoconjugates by esterase activity. *European Journal of Biochemistry*, 204:209-215.

7. Figuras

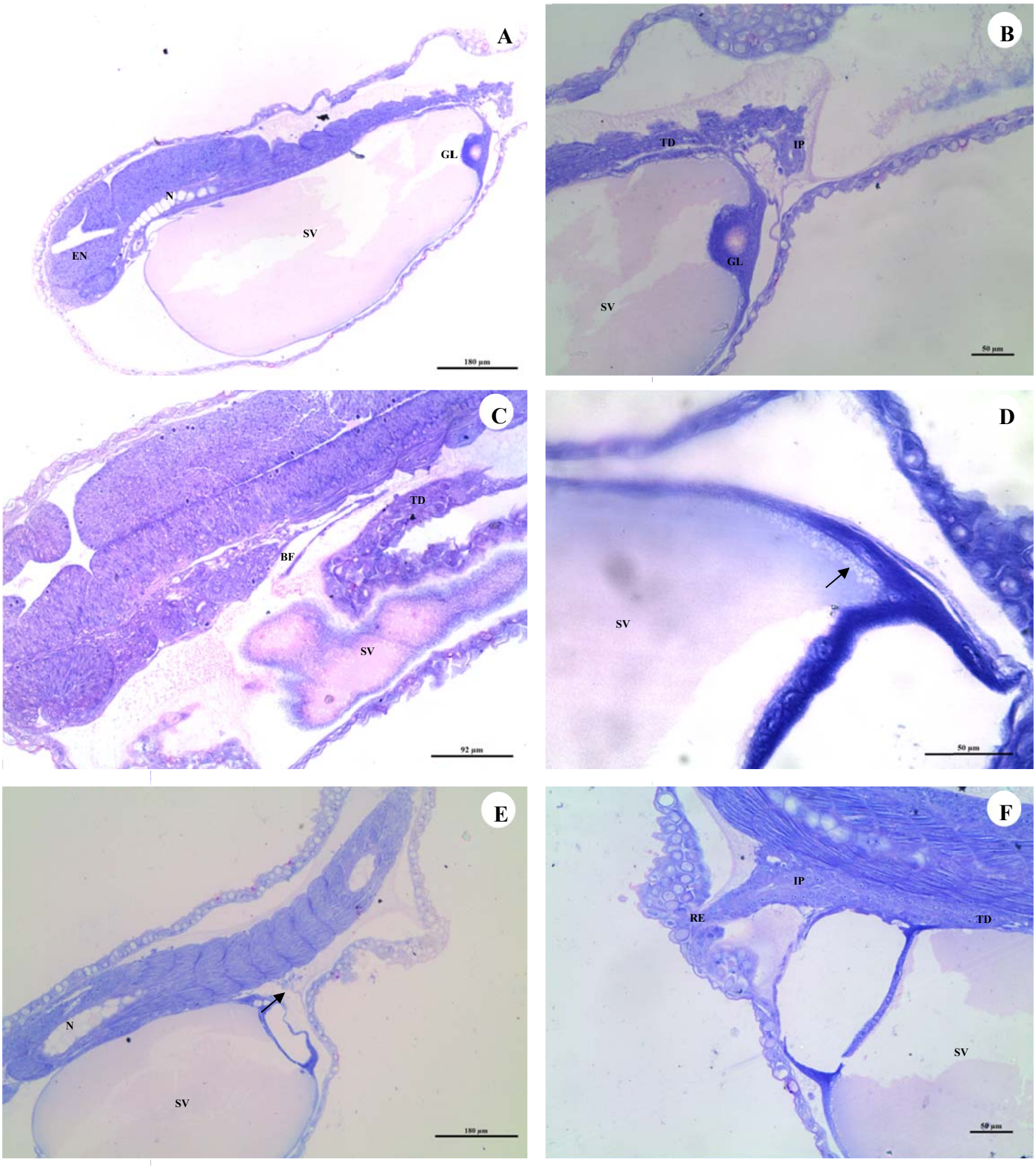

A
GL
N
SV
EN
180 µm
B
TD
IP
GL
SV
50 µm
C
TD
BF
SV
92 µm
D
SV
50 µm
E
N
SV
180 µm
F
IP
RE
TD
SV
50 µm

Figura 1. Histologia do trato digestório das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*. **A)** Larva com 1 dia após a eclosão (DAE), evidenciando encéfalo (EN), notocorda (N), saco vitelínico (SV) e gota de lipídio (GL); **B)** Larva com 1DAE, evidenciando saco vitelínico (SV), gota de lipídio (GL), início da formação do tubo digestório (TD) e início da formação do intestino posterior (IP); **C)** Larva com 1DAE, evidenciando cavidade bucofaríngea (BF), porção anterior do trato digestório (TD) e saco vitelínico (SV); **D)** Larva com 1DAE, evidenciando saco vitelínico e região de absorção dos lipídios do vitelo (seta); **E)** Larva com 2DAE, evidenciando notocorda (N), saco vitelínico (SV) e início da formação do trato digestório na região do intestino posterior (seta); **F)** Larva com 2DAE, evidenciando saco vitelínico (SV), trato digestório (TD), intestino posterior (IP) e formação do reto (RE).

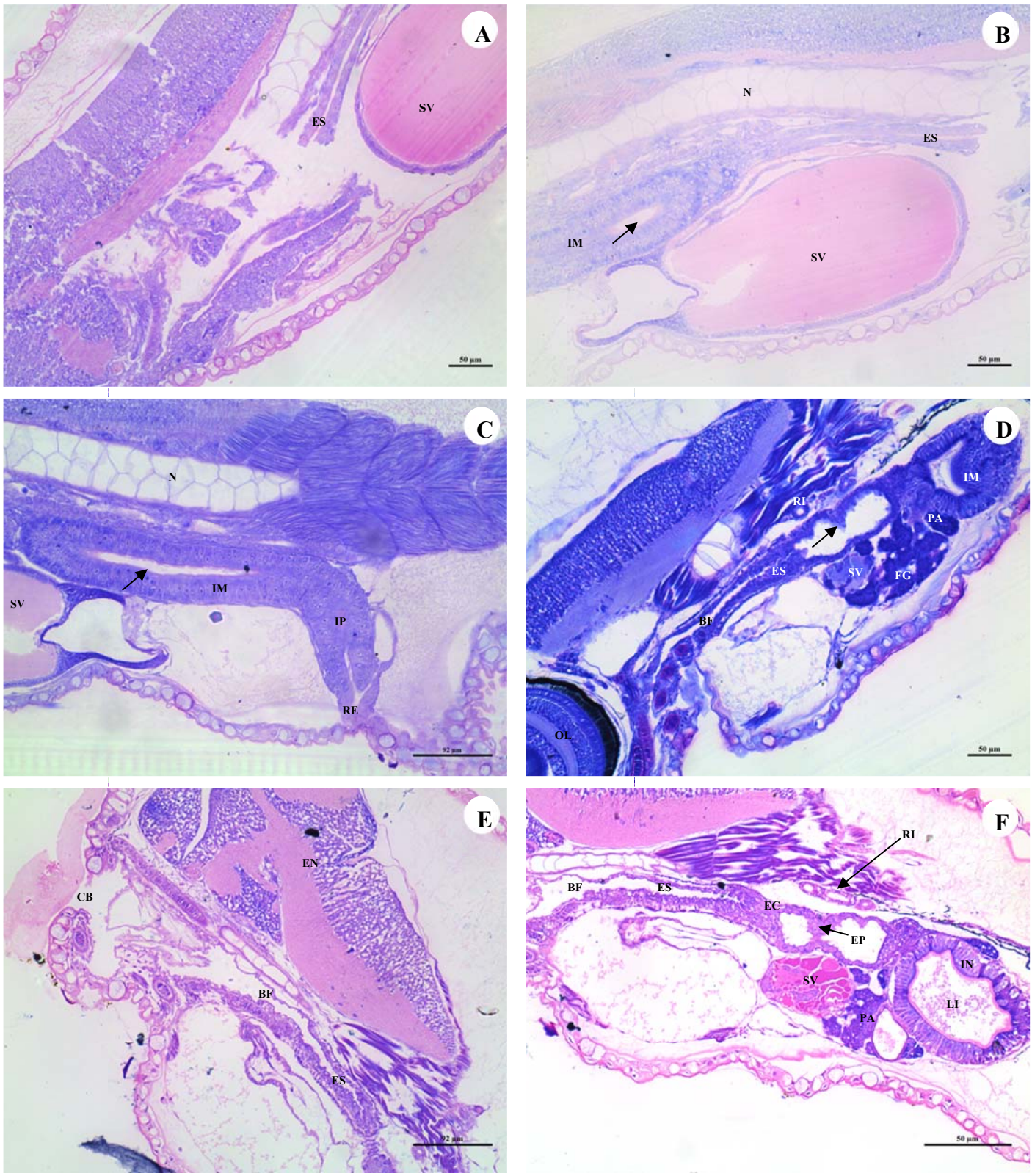

A
ES
SV
50 µm
B
N
ES
IM
SV
50 µm
C
N
SV
IM
IP
RE
92 µm
D
IM
RI
PA
ES
SV
FG
BF
OL
50 µm
E
EN
CB
BF
ES
92 µm
F
RI
BF
ES
EC
EP
IN
SV
LI
PA
50 µm

Figura 2. Histologia do trato digestório das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*). **A)** Larva com 3 dias após a eclosão (DAE) evidenciando esôfago (ES) e saco vitelínico (SV); **B)** Larva com 3DAE, evidenciando saco vitelínico (SV), notocorda (N), esôfago (ES), intestino médio (IM) e formação do lúmen intestinal (seta); **C)** Larva com 3DAE, evidenciando saco vitelínico (SV), intestino médio (IM), intestino posterior (IP), reto (RE) e lúmen intestinal (seta); **D)** Larva com 4DAE, evidenciando cavidade bucofaríngea (BF), esôfago (ES), saco vitelínico (SV), fígado (FG), pâncreas (PA), intestino médio (IM) e esfíncter pilórico (seta preta); **E)** Larva com 4DAE, evidenciando encéfalo (EN), cavidade bucal (CB), cavidade bucofaríngea (BF) e esôfago (ES); **F)** Larva com 4DAE, evidenciando cavidade bucofaríngea (BF), esôfago (ES), saco vitelínico (SV), pâncreas (PA), intestino (IN), lúmen intestinal (LI), rins (RI), esfíncter cardíaco (EC) e esfíncter pilórico (seta preta).

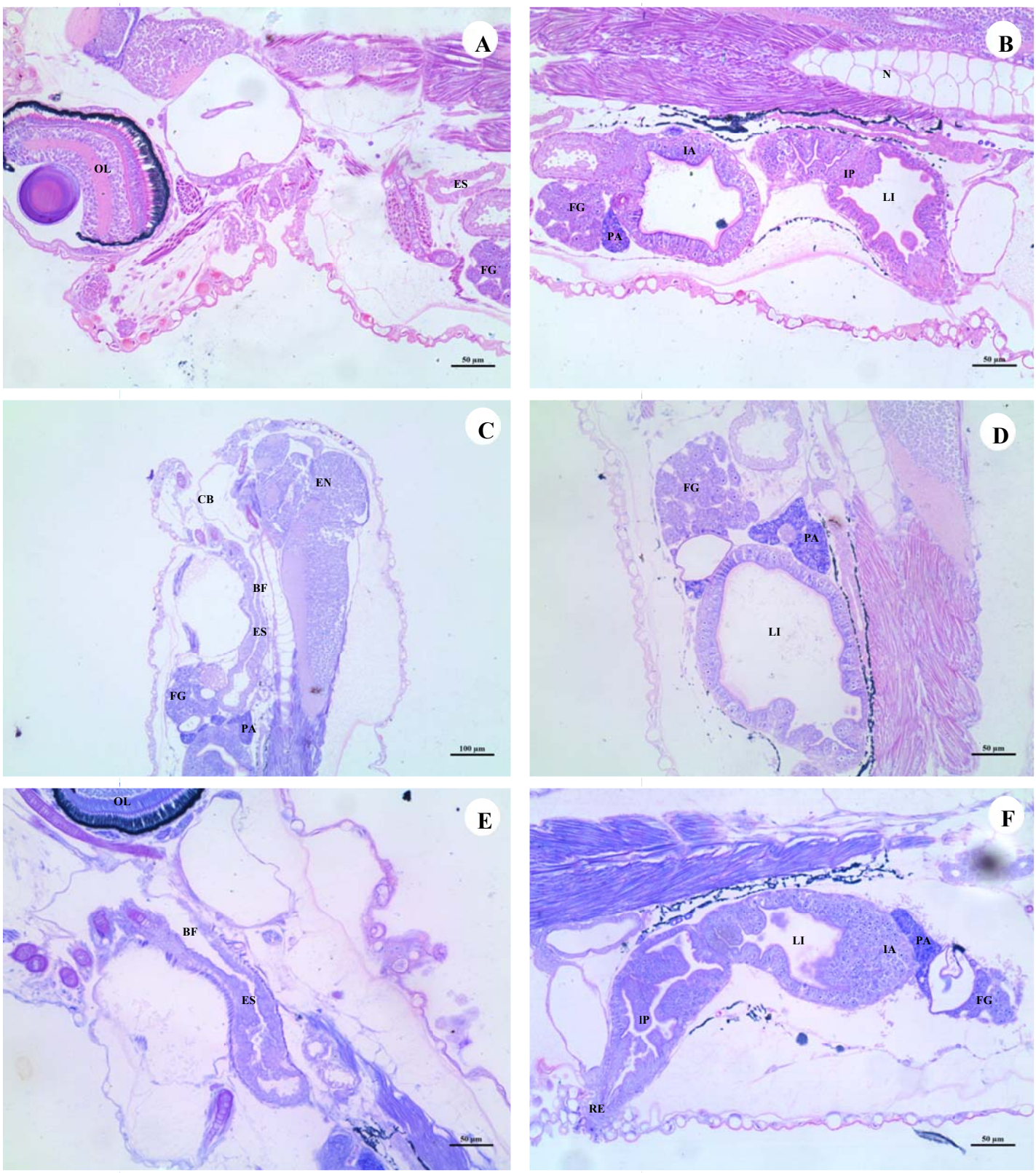

A
OL
ES
FG
50 µm
B
N
IA
IP
LI
FG
PA
50 µm
C
EN
CB
BF
ES
FG
PA
100 µm
D
FG
PA
LI
50 µm
E
OL
BF
ES
50 µm
F
LI
IA
PA
FG
IP
RE
50 µm

Figura 3. Histologia do trato digestório das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*). **A)** Larva com 5 dias após a eclosão (DAE), evidenciando olhos (OL), esôfago (ES), fígado (FG); **B)** Larva com 5DAE, evidenciando fígado (FG), pâncreas (PA), intestino anterior (IA), intestino posterior (IP), lúmen intestinal (LI) e notocorda (N); **C)** Larva com 5DAE, evidenciando encéfalo (EN), cavidade bucal (CB), cavidade bucofaríngea (BF), esôfago (ES),pâncreas (PA) e fígado (FG); **D)** Larva com 5DAE, evidenciando fígado (FG), pâncreas (PA) e lúmen intestinal (LI); **E)** Larva com 6DAE, evidenciando olhos (OL), cavidade bucofaríngea (BF) e esôfago (ES); **F)** Larva com 6DAE, evidenciando fígado (FG), pâncreas (PA), intestino anterior (IA), lúmen intestinal (LI), intestino posterior (IP) e reto (RE).

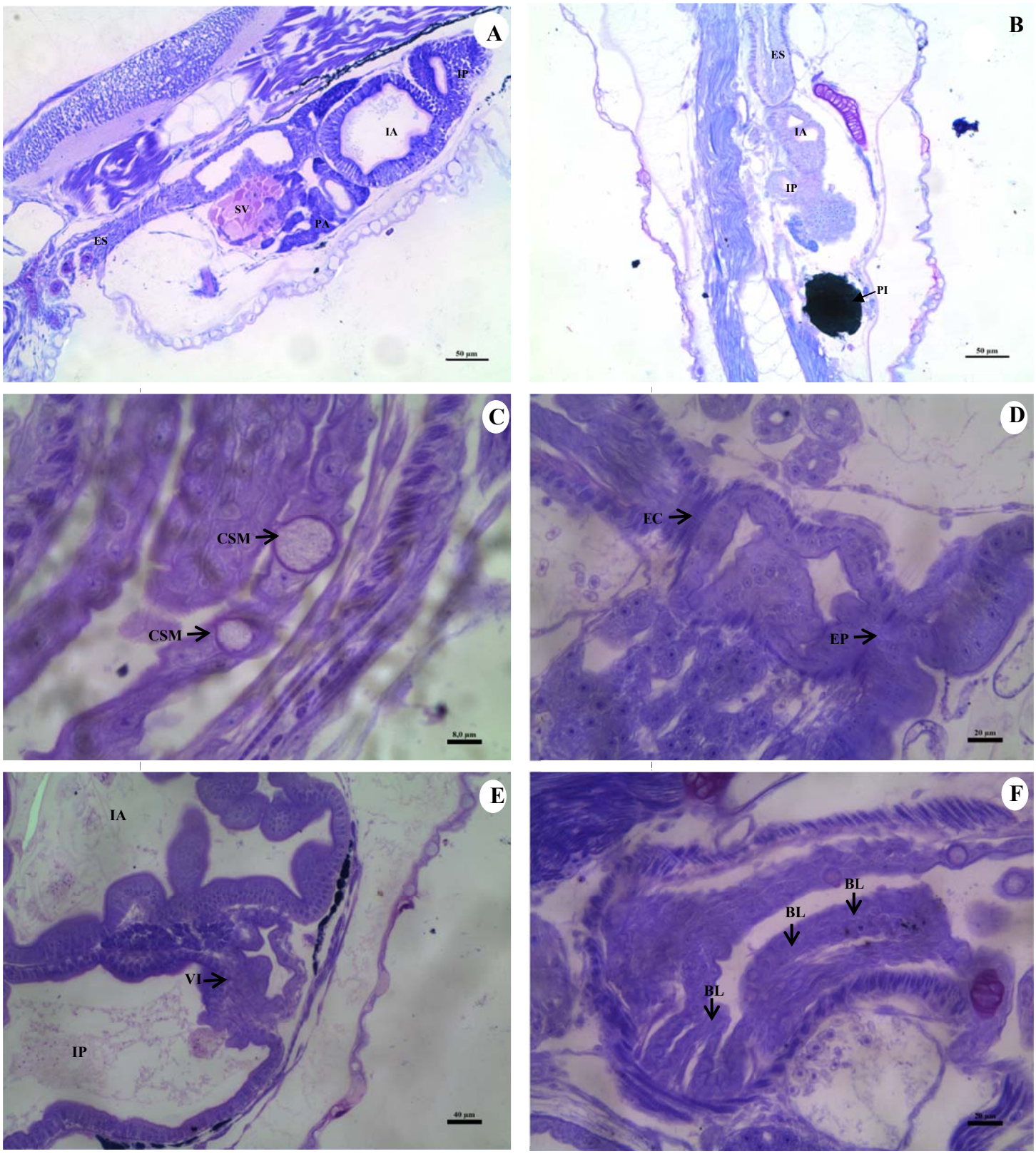

A
IP
IA
SV
PA
ES
50 µm
B
ES
IA
IP
PI
50 µm
C
CSM
CSM
8,0 µm
D
EC
EP
20 µm
E
IA
VI
IP
40 µm
F
BL
BL
BL
20 µm

Figura 4. Histologia do trato digestório das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*). **A)** Larva com 7 dias após a eclosão (DAE), evidenciando esôfago (ES), pâncreas (PA), intestino anterior (IA) e intestino posterior (IP); **B)** Larva com 8DAE, evidenciando esôfago (ES), intestino anterior (IA), intestino posterior (IP) e pigmentação (PI); **C)** Larva com 10DAE evidenciando as células secretoras de muco (CSM) presentes no esôfago; **D)** Larva com 10DAE evidenciando o esfíncter cardíaco (EC) e pilórico (EP); **E)** Larva com 10DAE evidenciando a válvula íleo retal (VI) (seta preta), além de intestino anterior (IA) e posterior (IP); **F)** Larva com 12DAE evidenciando as bolsas longitudinais (BL) (setas pretas) do esôfago.

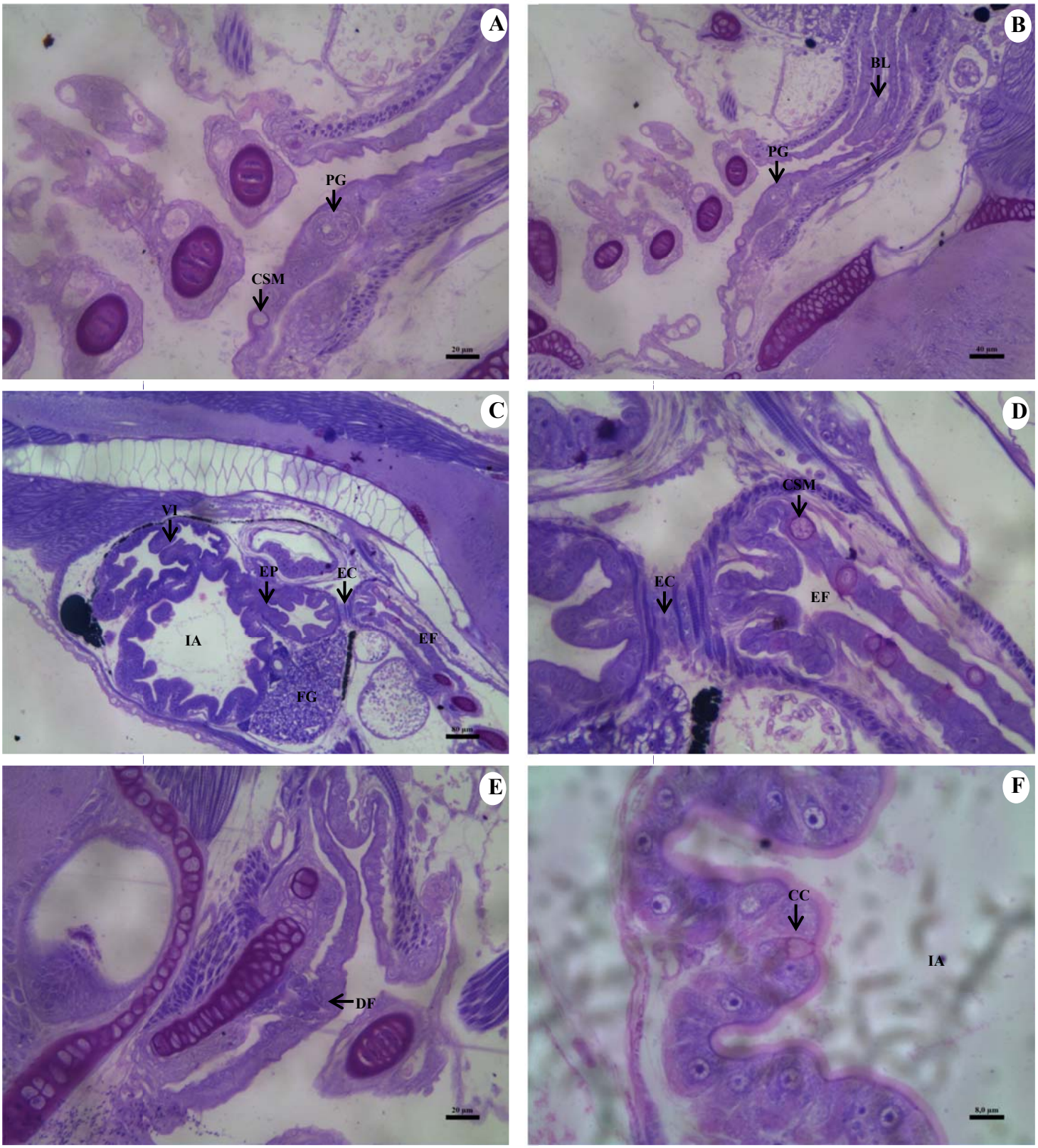

A
PG
CSM
20 µm
B
BL
PG
40 µm
C
VI
EP
EC
IA
EF
FG
80 µm
D
CSM
EC
EF
E
DF
20 µm
F
CC
IA
8,0 µm

Figura 5. Histologia do trato digestório das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*). **A)** Larva com 13DAE (DAE – dias após a eclosão) evidenciando as células secretoras de muco (CSM) e papilas gustativas (PG); **B)** Larva com 13DAE evidenciando papilas gustativas (PG) e bolsas longitudinais (BL); **C)** Larva com 16DAE evidenciando esôfago (EF), esfíncter cardíaco (EC), esfíncter pilórico (EP), intestino anterior (IA), válvula ileoretal (VI) e fígado (FG); **D)** Larva com 16DAE evidenciando esfíncter cardíaco (EC) e células secretoras de muco (CSM) do esôfago; **E)** Larva com 16DAE evidenciando os dentes faríngeos (DF); **F)** Larva com 16DAE evidenciando as células caliciformes (CC) e intestino anterior (IA).

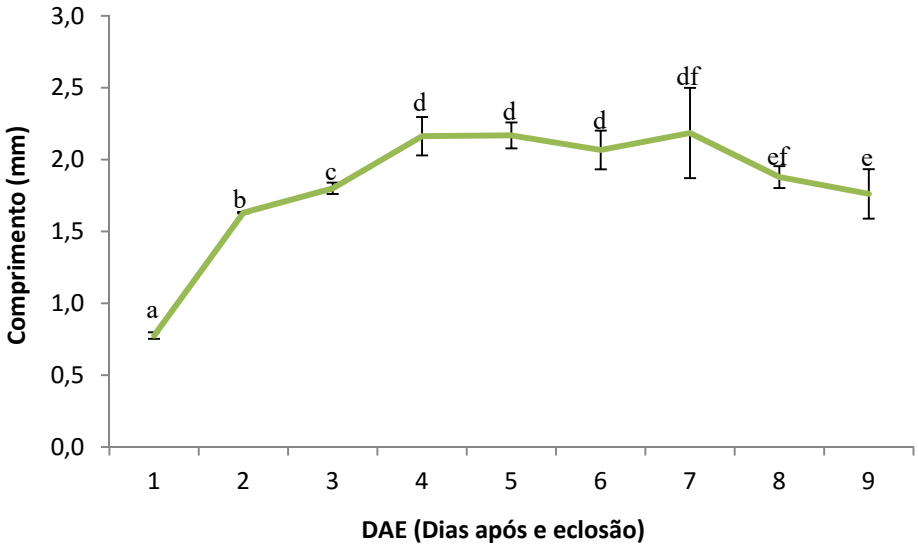


Figura 6. Comprimento larval (mm) ao longo dos dias de larvicultura (dias após a eclosão) da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*).

abcdef - Letras diferentes significam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) entre os DAE.

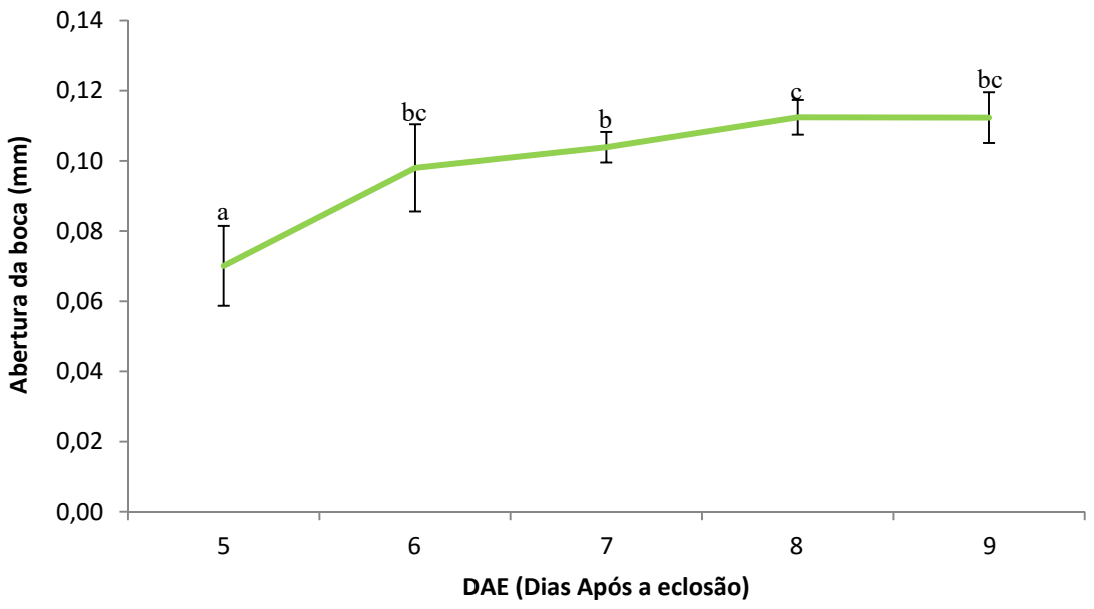


Figura 7. Abertura da boca (mm) das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) durante os dias de larvicultura.

abcdef Letras diferentes significam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) entre os DAE.

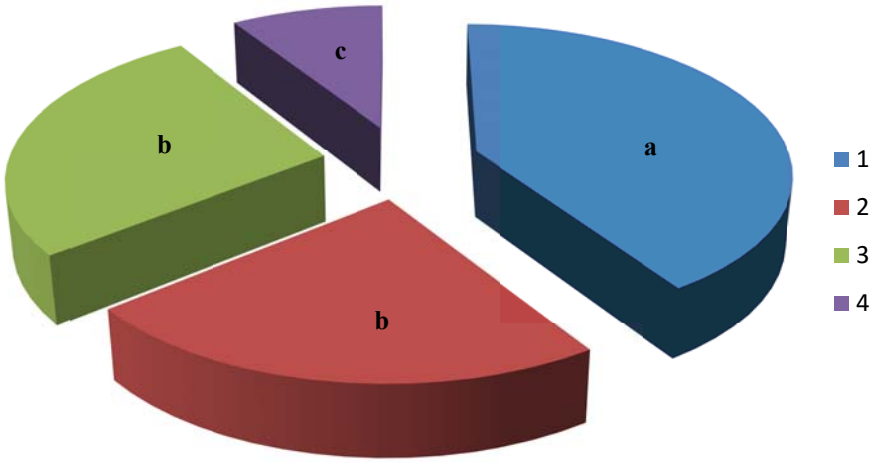


Figura 8. Área do saco vitelínico (macroscopicamente medida) (mm^2) ao longo dos dias de larvicultura da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*).

abcdef - Letras diferentes significam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) entre os DAE.

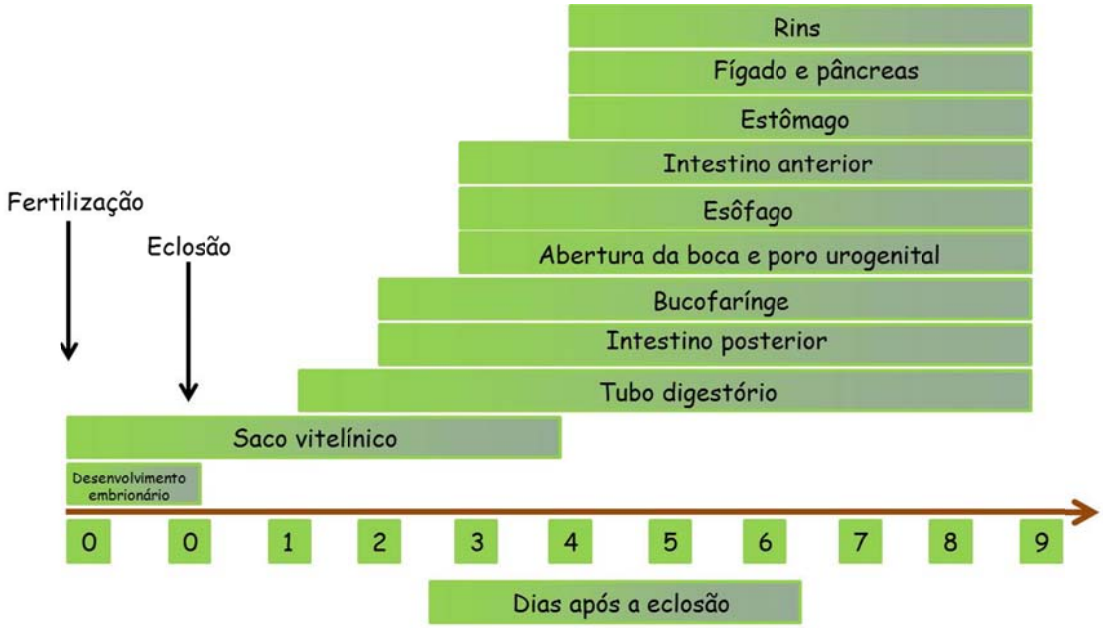


Figura 9. Principais eventos morfológicos com enfoque nas principais estruturas digestórias e glândulas anexas ao longo da larvicultura da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*).

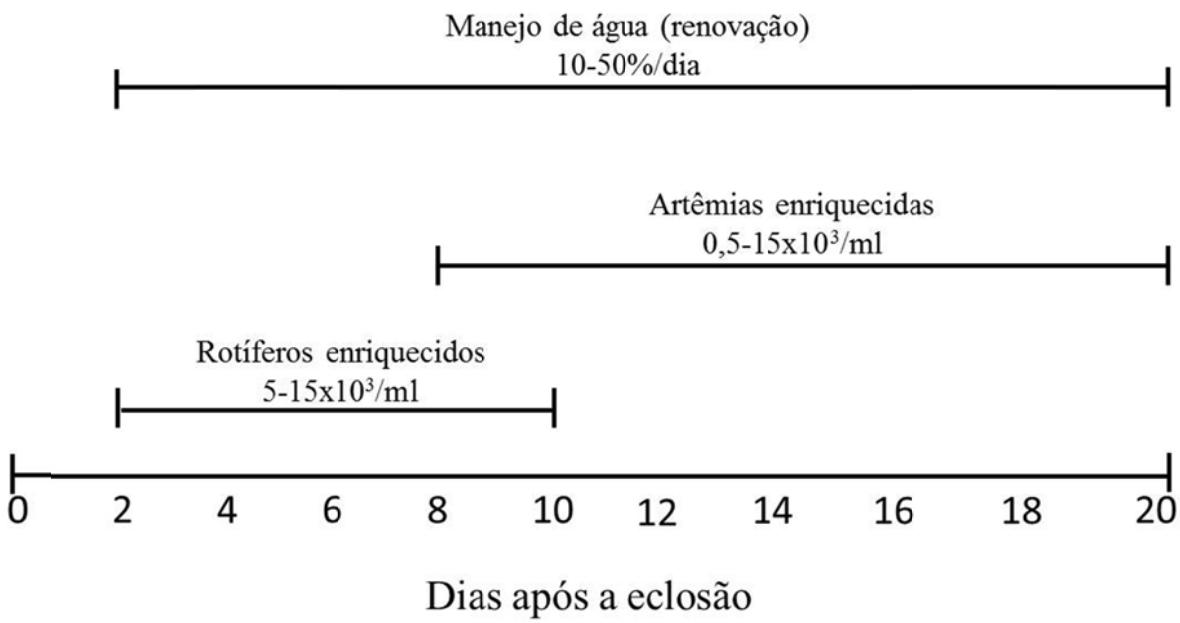


Figura 10. Manejo alimentar e de renovação de água ao longo do período experimental da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus*.

Dias após a eclosão (DAE)	**0**	**2**	**4**	**6**	**8**	**10**	**12**	**14**	**16**
Saco vitelínico	▬	▬	▬	▬					
Bucofaríngе									
Abertura da boca		●							
Papilas gustativas								●	
Dentes faríngeos									
Esôfago									
Bolsas esofágicas							●		
Células secretoras de muco						●			
Estômago						●			
Esfincter cardíaco						●			
Esfincter pilórico									
Glândulas gástricas									
Intestino									
Corpos supranucleares IM									
Células caliciformes IM							●		
Células caliciformes IP									
Válvula ileoretal				●					
Corpos supranucleares IP									
Abertura do ânus		●							
Fígado			●						
Pâncreas			●						

Figura 11. Resumo dos principais eventos morfológicos com enfoque nas principais estruturas digestórias e glândulas anexas ao longo da larvicultura das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*)**.** * IM – Intestino médio; IP – Intestino posterior.

Tabela 1. Dados morfométricos das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*). (Média ± Erro padrão).

Dias após a eclosão	Principais eventos	Comprimento Total (mm) ± DP	Área do saco vitelínico (mm^2) ± DP	Comprimento da boca (mm) ± DP
1	Eclosão	$0,77 \pm 0,02^{a}$	$0,35 \pm 0,01^{a}$	
2	Alimentação Endógena	$1,63 \pm 0,00^{b}$	$0,20 \pm 0,00^{b}$	
3	Alimentação Endógena	$1,80 \pm 0,03^{c}$	$0,23 \pm 0,03^{b}$	
4	Abertura da boca	$2,16 \pm 0,13^{d}$	$0,07 \pm 0,00^{c}$	
5	Alimentação Exógena	$2,16 \pm 0,08^{d}$		$0,07 \pm 0,01^{a}$
6	Alimentação Exógena	$2,06 \pm 0,13^{d}$		$0,09 \pm 0,01^{bc}$
7	Alimentação Exógena	$2,18 \pm 0,31^{df}$		$0,10 \pm 0,00^{b}$
8	Alimentação Exógena	$1,87 \pm 0,07^{ef}$		$0,11 \pm 0,00^{c}$
9	Alimentação Exógena	$1,76 \pm 0,17^{e}$		$0,11 \pm 0,00^{bc}$

abcdef Letras diferentes significam valores significativamente diferentes ($p<0,05$) entre os DAE.

Capítulo 3

Ácidos graxos como uma ferramenta de investigação metabólica durante a ontogenia das larvas da garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (Teleostei: Serranidae)

Paulo H. Mello[1,2]; Bruno C. Araújo;[1,2]; Mariana F. Campos;[1,2]; Jandyr A. Rodrigues-Filho[1,2]; Carlos E.O. Garcia[1,2]; Renata G. Moreira[1,2].

[1]- Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, São Paulo, Brasil. phmello@usp.br

[2] - Universidade de São Paulo, Centro de Biologia Marinha, São Sebastião, Brasil.

Resumo

O presente projeto analisou o perfil dos ácidos graxos dos ovos e das larvas da garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* durante os primeiros dias de desenvolvimento. Durante a fase embrionária a principal classe de AG nos ovos de garoupa foram os SFA e MUFA com maiores porcentagens em relação aos PUFAs. As principais classes de AG na fração neutra durante as fases de oócito e ovo fertilizado na garoupa (*E. marginatus*) foram os SFA e MUFA com maiores porcentagens em relação aos PUFAs. Na fração polar dos oócitos, encontramos dentre os SFA, o C16:0 com o maior percentual, dentre os PUFAs, o C22:6n3 com maior percentual, e dentre os MUFAs, o C18:1n9 foi o principal AG. Os ovos da garoupa verdadeira são compostos por elevados percentuais de PUFA nos fosfolipídios e quando passam pelo processo de eclosão utilizam preferencialmente os SFA dos fosfolipídios para este processo. O principal PUFA encontrado nos triglicerídeos durante todos os estágios da primeira fase foi o C22:6n3 (DHA). Além disso, os PUFA da série n3 sobrepõe-se aos da série n6, principalmente o DHA, que apresentaram valores elevados em comparação com outras

espécies marinhas tanto nos fosfolipídios quanto nos triglicérides nos três primeiros dias de desenvolvimento, evidenciando que estes AG são relevantes em *E. marginatus*, talvez até em maiores proporções que em outras espécies marinhas.

Palavras-chave: Larva, ácidos graxos, metabolismo, larvicultura, garoupa verdadeira.

Abstract

This project analyzed the fatty acid profile of dusky grouper *Epinephelus marginatus* eggs and larvae during the early days of development. During embryonic phase the main FA class of the groupers eggs were the SFA and MUFA with higher percentages in relation to the PUFAs. The major classes of FA in neutral fraction during the stages of oocyte and egg of dusky grouper were SFA and MUFA with higher percentages of PUFAs. In the polar fraction of oocytes, among the SFA, the C16:0 was the main FA among the PUFAs, C22:6n3 was present in the highest percentage, and among the MUFAs, C18: 1n9 was the main FA. The dusky grouper eggs are composed by high percentages of PUFA in the phospholipids and when they preferably uses the SFA from phospholipids for hatching. The main PUFA found in triglycerides during all stages of the first phase was C22:6n3 (DHA). Additionally, the n3 series PUFAs overlaps the n6 series, especially DHA, which exhibited higher percentages compared to other marine species, both in the phospholipids and triglycerides during the first three days of development, indicating that these FA are relevant for *E. marginatus*, perhaps in higher proportions than in other marine species.

Keywords: Larvae, fatty acid, metabolism, hatchery, dusky grouper.

1. Introdução

Desde a fase de embrião (ovo fertilizado) até a fase adulta, os peixes teleósteos passam por uma sequência de fases durante o desenvolvimento, e para alguns autores, passam por um período no qual as larvas se diferenciam até chegar ao plano adulto. A metamorfose em peixes requer uma série de transformações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além de apresentar um elevado custo energético para o seu desenvolvimento, completando, assim o desenvolvimento para o fenótipo definitivo (Balon, 1975).

A única fonte de nutrição das larvas de teleósteos durante a embriogênese e fase de nutrição endógena são os nutrientes contidos no vitelo que é formado durante o processo de vitelogênese (Abi-Ayad *et al*., 2004). Ao longo dessa fase, os lipídios do vitelo, além de atuarem como fonte de energia metabólica através da oxidação dos ácidos graxos presentes nos triglicerídeos (Bromage, 1995), ainda atuam como fonte de ácidos graxos essenciais e como transportadores de certos nutrientes não lipídicos e de vitaminas lipossolúveis (Sargent, 1995).

Os ácidos graxos podem estar presentes nos triglicerídeos (TG) e também nos fosfolipídios (PL), e em ambas as formas lipídicas desempenham um papel importante. Os ácidos graxos dos fosfolipídios juntamente com os esteróis são os principais componentes das membranas biológicas, e são muito importantes para inúmeras funções biológicas (Nelson e Cox, 2005) como para o crescimento e aumento da sobrevivência durante os períodos larval e juvenil (Azarm *et al*., 2012), além de atuarem como precursores de eicosanoides (Abi-Ayad *et al*., 2004). De maneira geral, as três principais funções dos ácidos graxos durante o período larval são (1) fornecer energia metabólica, (2) componentes estruturais dos fosfolipídios e (3) precursores de moléculas biologicamente ativas (Sargent *et al*., 1999a; Tocher, 2003).

Durante os períodos embrionário e larval a composição bioquímica dos animais se modifica intensamente (Tocher *et al*., 1985a, b; Dabrowsky *et al*., 1991). O metabolismo das larvas de peixes varia entre as espécies e estas utilizam diferentes substratos durante essa fase, no entanto, entre os substratos metabólicos, os lipídios e os ácidos graxos fornecem a maior fonte de energia para os peixes (Abi-Ayad *et al*., 2004).

Para entender os recursos energéticos e os processos fisiológicos nas larvas de peixes diversos estudos têm abordado a composição bioquímica dos animais durante a fase embrionária e larval (Chu e Ozkilzic, 1995). A quantidade de lipídios, assim como as classes de lipídios que são catabolizadas, variam de acordo com as espécies (Cetta e Capuzzo, 1982; Tocher *et al*., 1985; Fraser *et al*., 1988; Falk-Petersen *et al*., 1989; Finn, 1994), e os outros substratos energéticos também são utilizados durante essa fase. Needham (1931) foi o primeiro a sugerir que existe uma sucessão no consumo dos substratos energéticos durante o período embrionário e larval. Diversos trabalhos investigam quais substratos são consumidos durante essa fase e cada espécie apresenta uma sequência de consumo dos substratos metabólicos (Terner, 1968; Kimata, 1982; Finn, 1994; Kimata, 1983; Rainuzzo *et al*., 1992; Tocher *et al*., 1985).

Diante da importância que os lipídios e ácidos graxos desempenham durante a fase embrionária e larval nas espécies de peixes, o presente estudo teve como objetivo investigar as alterações do perfil de ácidos graxos na garoupa verdadeira durante essas fases visando entender como as larvas utilizam esse importante substrato metabólico nessa fase contribuindo assim com informações sobre o metabolismo desses animais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta das amostras

Após a inversão do sexo, indução à reprodução e fertilização (Garcia *et al*., 2013), que foi conduzida em três fêmeas, os ovos fertilizados foram acondicionados em tanques de $2m^3$. Os tanques foram mantidos sem fluxo de água durante os primeiros quatro dias após a fertilização (DAF) somente com aeração bem suave distribuída com difusores de ar de madeira a fim manter um pequeno fluxo de água dentro da caixa e evitar choque mecânico dos ovos e larvas com a parede da caixa.

Os ovos e as larvas coletados para as análises do perfil de ácidos graxos foram coletados com auxílio de uma rede e posteriormente as amostras foram lavadas com água salgada esterilizada com a finalidade de evitar a contaminação com outros animais ou mesmo com o alimento vivo fornecido.

Como a ontogenia é um processo dinâmico, as coletas inicialmente seriam divididas em duas etapas principais. A primeira que incluiria os quatro primeiros dias após a fertilização, e as coletas seriam realizadas com intervalo de 6 horas, com a primeira coleta antes da fertilização (oócitos), totalizando 16 coletas ao longo dos 4 primeiros dias do desenvolvimento. No entanto, como a quantidade de larvas foi muito baixa, o tamanho das larvas é muito reduzido, o protocolo de coletas foi alterado de forma a minimizar as coletas excessivas que acabavam por prejudicar o cultivo e aumentavam a mortalidade das larvas. Com isso, optamos por fazer uma coleta por dia até o 7ºDAF. Para cada desova foram coletados três amostras de ovos e larvas a cada dia de coleta, ou seja, para cada fêmea realizamos três amostragens por dia.

As amostras de ovos e/ou larvas inteiras foram coletados com rede, lavados em água salgada para evitar contaminação e acondicionadas em tubos criogênicos e congelada em nitrogênio líquido. Posteriormente foram transferidas para o Laboratório

de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Departamento de Fisiologia da Universidade de São Paulo até o processamento.

Os resultados dos ácidos graxos são apresentados referentes à fração neutra (triacilgliceróis ou triglicerídeos) e a fração polar (fosfolipídios) separadamente. O perfil de ácidos graxos das coletas até o 8ºDAF (dias após a fertilização) e as amostras apresentadas refere-se aos dias de desenvolvimento. Sendo assim: G0 - somente oócitos (antes da fertilização), G1- 24 horas após fertilização (1DAF), G2 - 48 horas após fertilização (2DAF), G3 - 72 horas após a fertilização (3DAF), G4 - 96 horas após a fertilização (4DAF), G5 - 120 horas após a eclosão (5DAF), G6 - 144 horas após a fertilização (6DAF), G7 - 168 horas após a fertilização (7DAF).

As fases de desenvolvimento também foram analisadas separadamente, sendo de 0 até 3DAF correspondente ao período de nutrição endógena terminal, possibilitando a avaliação da influência das fontes endógenas no metabolismo dos lipídios nos animais. A segunda etapa compreende as amostras 4DAF até 7DAF, período no qual os animais já se encontravam aptos a se alimentar exógenamente.

2.2. Lipídios Totais

A extração dos lipídios totais dos ovos e larvas foi realizada com uma mistura de clorofórmio: metanol: água (Folch *et al*., 1957) e os mesmos foram quantificados pelo método colorimétrico de Frings *et al*. (1972).

2.3. Perfil de ácidos graxos

Os ovos e as larvas tiveram seus lipídios totais extraídos pelo método acima e em seguida o extrato foi submetido a uma atmosfera de N_2 para evaporação do solvente sem oxidação dos ácidos graxos. Em seguida, o extrato contendo as diferentes classes

de lipídios foi separado em lipídios polares e neutros utilizando uma coluna de sílica ativada (Yang, 1995). Os extratos de lipídios polares (fosfolipídios) e neutros (triglicérides) foram metilados com cloreto de acetila (5% de HCl em metanol) (para a formação dos metil ésteres) (Christie, 2003). Os metil ésteres foram analisados em cromatógrafo gasoso (Varian, modelo 3900), acoplado a um ionizador de chama (FID) e o perfil de ácidos graxos foi determinado com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se um padrão de ácidos graxos (Supelco 37 components, Sigma-Aldrich e Mixture Me93, Qualmix PUFA fish M, e Menhaden Oil, Larodan) com tempo de retenção conhecido. Os ácidos graxos foram analisados em uma coluna capilar CP Wax 52 CB, 0,25 µm de espessura, 0,25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento. O hidrogênio foi utilizado como gás carreador a uma velocidade linear de 22 cm/s. O programa de temperatura foi: 170ºC durante 1 minuto, seguido de uma rampa de 2,5ºC /minuto até 240ºC, e um tempo de espera final de 5 minutos. No injetor e no detector de ionização de chama (FID), as temperaturas foram 250 e 260ºC, respectivamente.

2.3. Análise dos resultados - Análise Estatística

Os valores de cada dia amostral foram comparados entre os diferentes dias do desenvolvimento usando o teste de análise de variância *one way* ANOVA no programa estatístico Sigma Stat (Version 3.10 Copyright©). Teste de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados e, quando cumpriam os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados seguidos do teste de Student-Newmann-Keuls (SNK). Para os dados que não cumpriram esses requerimentos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 0,05.

3. Resultados

3.1. Ácidos graxos

3.1.1. Fração Neutra

Nenhuma diferença significativa foi observada na composição dos ácidos graxos da fração neutra da garoupa (figuras 1A e 3A). Uma pequena tendência de diminuição no percentual dos MUFA do 2ºDAF para o 3ºDAF, mas que não se confirma em diferença significativa (*P* = 0,192) (figura 1A e tabela 1), além da elevação percentual de n3, principalmente pelo C22:6n3, do momento 0 (somente oócitos) para o 1ºDAF, mas que também não apresentou diferença significativa (*P* = 0,089) (Tabela 1).

Na segunda fase do desenvolvimento observou-se diminuição significativa no percentual de SFA do 4º para o 5º e 6ºDAF (*P* = 0,035 e *P* = 0,004) (figura 1B), sendo o C16:0 o ácido graxo mais representativo pela diminuição (tabela 2). Observou-se um aumento significativo do 6º para 7ºDAF (*P* = 0,001) (figura 1B), também representado em maiores percentuais pelo C16:0 (tabela 2). Uma tendência de aumento no percentual de saturados também é observada do 6º para o 7ºDAF, no entanto, sem diferenças significativas (*P* = 0,100) (figura 1B e tabela 2).

Nos MUFA (figura 1B), verifica-se uma diminuição percentual com diferença significativa do 4º para o 5ºDAF (*P* = 0,009) e 6ºDAF (*P* = 0,003) (tabela 2), sendo o C18:1n9 o principal ácido graxo que teve sua porcentagem reduzida. Em contrapartida a esta diminuição, verifica-se um aumento no percentual dos MUFA do 6ºDAF para o 7º DAF(*P* = 0,001), sendo o mesmo ácido graxo (C18:1n9) a apresentar elevação percentual nesse período (figura 1B e tabela 2).

Já em relação aos PUFA da fração neutra (figura 1B) podemos verificar elevação do percentual no 5º e 6ºDAF em relação ao 4ºDAF (*P* = 0,011 e *P* = 0,002

respectivamente), sendo as principais elevações referentes aos C20:4n3, C20:2n6, C22:5n6 e C22:2n6 (tabela 2), e em seguida um diminuição no 7ºDAF em relação ao 5º e 6ºDAF (P = 0,044 e P = 0,001 respectivamente), com C18:4n3, C18:2n9, C20:4n3, C20:2n6 e C22:2n6 (tabela 2) como principais diminuições percentuais.

Abordando os PUFAs das séries n3 e n6 na fração neutra dos lipídios, somente foram encontradas diferenças significativas na segunda fase do desenvolvimento (figura 3B). Nos PUFAs da série n3 somente no 7DAF foi observada uma diminuição percentual com diferença significativa em relação aos outros dias (figura 3B). Nos PUFAs da série n6, ocorreu um pico em 5DAF em relação ao 4DAF, seguido de uma diminuição percentual nos dias seguintes (6 e 7DAF), diferente significativamente no 7ºDAF (figura 3B). Já a relação DHA/EPA, aumentou significativamente no 7ºDAF em relação aos outros dias (figura 3B).

3.1.2. Fração Polar

Na fração polar dos lipídios, os MUFA e PUFA mantiveram-se com percentuais sem variação durante a primeira fase de desenvolvimento (figuras 2A e 4A). Os SFA apresentaram uma diminuição percentual dos oócitos em relação ao 1ºDAF e permaneceram estáveis a partir desse dia (figura 2A). Além disso, a fração polar dos lipídios dos oócitos (G0) da garoupa foi composta principalmente de PUFAs e SFAs, com cerca de 40%, e menores percentuais de MUFAs, em torno de 10% (figura 2A e tabela 3). Não foram observadas diferenças nos PUFAs das séries n3 e n6, e os PUFAs da fração polar dos lipídios dos oócitos foram principalmente compostos por AG da série n3 (figura 4A e tabela 3).

Na segunda fase de desenvolvimento na fração polar houve um aumento significativo somente nos SFA do 7ºDAF em relação ao 5ºDAF (P = 0,044),

principalmente devido às variações observadas nos AG C18:0 e C16:0, que apresentaram elevação do 6º para 7ºDAF, embora sem diferença significativa nos AGs (figura 2B e tabela 4). Em relação aos PUFAs da série n3 e n6, houve um pico dos PUFAs n3 no 6ºDAF seguido de uma diminuição significativa no 7ºDAF (figura 4B). Outra diferença significativa foi observada na relação DHA/EPA, que foi maior em 7DAF em comparação ao 4º e 5ºDAF (figura 4B).

4. Discussão

4.1. Ácidos graxos

Durante o período embrionário, a principal reserva metabólica e estrutural provém do vitelo, que é composto principalmente de proteínas e lipídeos, cerca de 79 e 19 % respectivamente. Dentre os lipídios, mais especificamente os triglicerídeos (fração neutra) são compostos principalmente por dois ácidos graxos de cadeia saturada e monoinsaturada (cerca de 80%), e uma cadeia central polinsaturada (Bell *et al*., 1986). Corroborando essas informações, durante a fase embrionária a principal classe de ácidos graxos presente nos ovos de garoupa (*E. marginatus*) foram os ácidos graxos saturados (SFA – do inglês *saturated fatty acids*) e monoinsaturados (MUFA – do inglês *monounsaturated fatty acids*) com maiores porcentagens em relação aos ácidos graxos polinsaturados (PUFA – do inglês *polyunsaturated fatty acids*).

4.1.1. Fração Neutra

Através do perfil de AG durante a embriogênese e larvicultura da garoupa verdadeira, foi possível entender de que forma os AG dos triglicerídeos e dos fosfolipídios são utilizados durante as fases iniciais do desenvolvimento, etapa crítica para a sobrevivência de teleósteos marinhos. As larvas da garoupa-verdadeira utilizaram

preferencialmente os SFA dos fosfolipídios para o processo de eclosão. Os PUFA n3 sobrepõe-se aos n6, principalmente o DHA, que apresentaram valores elevados em comparação com outras espécies marinhas como *Morone saxatilis* (Chu e Ozkizilcik, 1995) tanto nos fosfolipídios quanto nos triglicérides (nos 3 primeiros dias de desenvolvimento), evidenciando que estes AG sejam relevantes em *E. marginatus*, talvez até em maiores proporções que em outras espécies.

Nos triglicerídeos dos ovos da garoupa verdadeira são encontrados principalmente os SFA, com o C16:0 apresentando maior porcentagem, seguidos pelos MUFA, representados principalmente pelo C18:1n9 e por último, pelos PUFA com maior percentual encontrado do C22:6n3. Em algumas espécies como *Gadus morhua*, *Clupea harengus*, *Melanogrammus aeglefinus (*Tocher e Sargent, 1984), *Hippoglossus hippoglossus* (Falk-Peteresen *et al*., 1986), *Morone saxatilis* (Chu e Ozkizilcik, 1995) e *Dipodus sargus* (Cejas *et al*., 2004) o C16:0 também foi encontrado em maiores quantidades e parece ser o principal AG responsável em prover energia metabólica durante esta fase do desenvolvimento.

Com relação aos MUFA a tendência de diminuição do 2º para o 3ºDAF pode ter relação com aumento de gasto energético, uma vez que, essa fase de transição de alimentação endógena para futura alimentação exógena exige um gasto energético muito elevado pelas larvas. É importante lembrar que durante essa fase as larvas estão na transição da alimentação endógena para exógena, ou seja, darão início ao processo de abertura da boca e do poro urogenital, mas ainda possuem pequena quantidade de suas reservas vitelínicas, e terão pouco tempo para completar tal transição e se alimentar ativa e exclusivamente de alimento exógeno. Como não observamos alimento no sistema digestório das lavas, esta diminuição percentual pode ter sido acentuada, pois possivelmente os animais ainda não estavam se alimentando. Segundo Bromage e

Roberts (1995), os principais gastos metabólicos são fomentados principalmente com SFA e MUFA principalmente provenientes dos triglicerídeos dos adipócitos, ou seja, esta possível diminuição dos percentuais nesse período pode estar relacionada a este gasto metabólico nesta transição que envolve este gasto energético intenso.

O principal PUFA encontrado nos triglicerídeos durante todos os estágios da primeira fase foi o C22:6n3 (DHA), que segundo Bromage e Roberts (1995) são armazenados tanto nos fosfolipídios, quanto nos triglicerídeos, devido ao seu papel relevante tanto na fluidez das membranas quanto no fornecimento de energia metabólica para as larvas. Observamos também que os oócitos e larvas de garoupa em estágios iniciais de desenvolvimento são principalmente compostos de PUFA n3, com uma relação DHA/EPA, em torno de 3,0, o que nos permite inferir que as larvas de garoupa apresentam uma reserva elevada desses AG em forma de triglicerídeos, e que possivelmente estão estocadas para futura utilização na organogênese. Vale lembrar que embora essa fase seja de intensa transformação das larvas, essas não apresentaram variações significativas nos AG de seus triglicérides e com isso, presume-se que outros substratos possam ser a fonte de energia durante essa fase de intensa transformação morfológica e metabólica, como os aminoácidos livres, já relatados para outras espécies de teleósteos (Finn e Fyhn, 2010) e para *Epinephelus tauvina* (Dayal *et al*., 2013).

A razão n3/n6 e DHA/EPA encontrada nos oócitos das garoupas pode indicar que a espécie apresenta percentual próximo a sua necessidade nutricional nas fases iniciais do desenvolvimento uma vez que as fêmeas são provenientes do ambiente natural, apresentavam condições normais, com oócitos de boa qualidade (análise macroscópica) e aptas à reprodução. No entanto, estudos relacionados à necessidade nutricional desses animais na fase larval são necessários para avaliar a real necessidade nutricional destes AG, mas, esse percentual pode ser um ponto de partida para tais

experimentos. Alguns estudos apontam que a razão n3/n6 encontrada para a maioria dos teleósteos marinhos está em torno de 2, percentual próximo ao encontrado para as larvas de garoupa, e utilizado para primeira alimentação em algumas espécies marinhas (Sargent *et al*., 1997).

Os dados mostram claramente que durante toda a primeira fase (G0 até o 3ºDAF) e o início da segunda (4DAF), a relação n3/n6 apresenta valores superiores a 1. Estes são inclusive mais elevados na primeira fase, chegando próximos a 4 e são acentuadamente reduzidos para 1,79 no estágio G4, que corresponde a fase de início da alimentação exógena. A partir do 5ºDAF, a relação n3/n6 atinge valores abaixo de 1, indicando que a porcentagem de PUFA n6 excede a de n3, o que ocorre no 5º e 6ºDAF principalmente devido aos AG n6 de cadeia longa. Já no 7ºDAF, esta relação se mantém abaixo de 1 porque os AG n3 e n6 são reduzidos a valores próximos a 10%. Em larvas de bijupirá durante os 3 primeiros DAE, Falk e Holt (2005) encontraram a relação n3/n6 que partia de valores próximos a 10 no 3ºDAE, no entanto, no 7ºDAE esse número se reduziu para valores próximos a 5, mesmo com as larvas sendo alimentadas com diferentes percentuais de AG, sugerindo que durante os primeiros dias as larvas da garoupa possuam uma necessidade mais elevada da relação desses ácidos graxos em comparação ao bijupirá (Faulk e Holt, 2005). Quando alimentadas com dietas específicas que variavam o percentual de determinados PUFAs, as larvas de bijupirá atingiram valores elevados da relação DHA/EPA que chegaram a atingir 8% no 7ºDAE (Faulk e Holt, 2005). Abi-Ayad *et al*. (2000) trabalhando com *Perca fluviatis* encontraram valores da relação n3/n6 entre 2,0 e 4,2 durante os primeiros dias de desenvolvimento em larvas alimentadas e em jejum, valores estes próximos aos apresentados pelas larvas da garoupa.

Na segunda fase do desenvolvimento, SFA e MUFA apresentam um comportamento similar, com uma diminuição percentual do 4º, 5º até o 6ºDAF que pode estar relacionada com o consumo energético elevado que pode ter sido acelerado pela ausência de alimento no trato digestório das larvas, que vez que esses AG têm um papel central, pois é a principal fonte de energia metabólica durante o desenvolvimento larval (Rainuzzo *et al*., 1997). Alguns estudos têm investigado de que forma os teleósteos utilizam os AG durante a fase larval e o uso destes no metabolismo é espécie-específica (Farkas *et al*., 2000; Sargent *et al*., 2002; Tocher *et al*., 2008; Tocher. 2010; Mello *et al*., 2011). No caso da garoupa verdadeira, os dados aqui obtidos sugerem que as larvas utilizaram preferencialmente os SFA e MUFA em contrapartida a uma elevação dos PUFAs nesse período.

A elevação percentual dos SFA e MUFA no 7ºDAF pode estar relacionada à nutrição das larvas e posterior acúmulo dessas classes de lipídios nos triglicerídeos de seus tecidos em contrapartida a uma diminuição dos PUFAs. A oxidação dos PUFAs é comum em outras espécies de peixes marinhos, e muitos estudos também relatam o consumo dos HUFAs, principalmente o DHA, como observado em larvas de *Gadus morhua* (Finn *et al*., 1995), nos linguados *Hippoglossus hipoglossus* (Ronnestad *et al*., 1995), e *Solea senegalensis* (Vázquez *et al*., 1994) e *Dentex dentex* (Mourente *et al*., 1999). Na garoupa verdadeira, o DHA apresentou uma leve variação na fase 2, e os PUFAs C18:4n3, C18:2n9, C20:4n3, C20:2n6 e C22:2n6 tiveram seus percentuais significativamente reduzidos neste período, sugerindo que esses AG sejam importantes para o metabolismo, preservando o DHA. Ou podem indicar ainda que as larvas obtiveram esses AG no alimento vivo ingerido, que possuem cerca de 37% de DHA (*Reed Mariculture*).

Durante o 5º e 6ºDAF foi observada elevação dos percentuais de PUFA nos triglicerídeos, principalmente PUFAs n6 sugerindo que nesses dias esses AG foram mantidos nos triglicerídeos e foram utilizados apenas a partir do 7ºDAF como fonte energética. Os PUFAs n3 se mantiveram estáveis durante a maior parte do período, sendo reduzidos na fase 2, quando as larvas apresentaram um padrão de utilização dos SFA e MUFA e aumento dos PUFA, invertendo essa condição no 7ºDAF, mostrando um possível consumo dos PUFAs nesse dia, tanto n3 quanto n6, uma vez que nos fosfolipídios não houve aumento desses AG. Ou ainda, mostrando já alguma influência da alimentação exógena nestas variações. A baixa presença dos HUFAs nos triglicerídeos das larvas da garoupa pode indicar ainda a baixa ingestão de alimento uma vez que as quantidades de HUFAs contidos no alimento vivo são elevadas, DHA 38%, EPA 10% e ARA 2% somando 50% do total de AG fornecidos.

4.1.2. Fração Polar

Abordando a fração polar dos oócitos, encontramos dentre os SFA o C16:0 com o maior percentual, dentre os PUFAs o C22:6n3 com maior percentual, e dentre os MUFAs o C18:1n9 foi o principal AG. Percentuais elevados de AG da série n3 são encontrados nos fosfolipídios dos ovos das espécies marinhas (Sargent *et al*., 1999; Sargent *et al*., 2002; Tocher *et al*., 2008; Tocher, 2010), incluindo o C22:6n3 que, juntamente com o C20:5n3, são os principais AG altamente insaturados (HUFA) em espécies marinhas (Tocher e Sargent, 1984; Falk-Petersen *et al*., 1989; Parrish *et al*., 1993; Rainuzzo *et al*., 1997). Ainda segundo Sargent *et al*. (2002) estes SFAs, MUFAs e PUFAs supracitados são os principais AG que compõem os fosfolipídios das membranas celulares nos peixes, sendo estes últimos os responsáveis pela manutenção da fluidez e permeabilidade das membranas biológicas e observando o perfil de AG das

garoupa estes também são os mais representativos nos fosfolipídios dos ovos e larvas da garoupa. É importante lembrar que nesta fase, as larvas são ainda mais dependentes desta propriedade das membranas, pois, segundo Kamler (2008) durante essa fase, quando as larvas são sistemas fechados, os processos fisiológicos são dependentes dessa fluidez e permeabilidade das membranas e do córion, no caso dos ovos, como trocas gasosas, trocas de calor e água, além da absorção de algumas partículas como sais, glicose, aminoácidos livres, etc (Ronnestad e Fyhn, 1993) e das células da epiderme durante a fase larval.

Sargent *et al*. (2002) relatam que os PUFAs são os AG com maior representatividade nos fosfolipídios chegando a representar entre 60 a 80% de sua composição. Os fosfolipídios das larvas de garoupa também apresentaram maiores percentuais de PUFAs em relação aos MUFAs em praticamente todos os estágios de desenvolvimento, e em alguns casos, mais elevados que os SFAs, embora as porcentagens de PUFAs encontradas tenham variado em torno de 40% na primeira fase e 30-40% na segunda fase, com percentuais inferiores aos relatados por estes autores.

Durante os 7 primeiros dias de desenvolvimento, que inclui tanto a fase dos oócitos, embrionária e larval, a garoupa apresentou maior percentual de SFA e PUFA nos fosfolipídios, e na maior parte deste tempo de desenvolvimento representados pelos AG C16:0 e C22:6n3 respectivamente. Sugere-se que a redução de SFA, especificamente o C16:0 entre os momentos G0 e 1DAF possa estar relacionando a utilização deste AG na intensa movimentação da larva e para o posterior processo de eclosão, pois embora nos fosfolipídios, os SFA podem ser utilizados em funções metabólicas, principalmente nessa fase de elevada demanda energética (Sargent *et al*., 2002). Por outro lado, MUFAs e PUFAs não se alteraram significativamente na primeira fase do desenvolvimento, permanecendo os PUFAs com maiores percentuais

em relação aos outros AG, sendo o C22:6n3 o mais representativo. Elevados percentuais de DHA, são fundamentais na formação do tecido neural, principalmente o cerebral e a retina onde se depositam nos cones e bastonetes influenciando diretamente na acuidade visual (Sargent *et al*., 2002; Tocher *et al*., 2008; Tocher, 2010; Izquierdo e Koven, 2011).

O papel dos fosfolipídios na ontogenia dos teleósteos tem sido foco de diversos estudos nas últimas décadas (Rainuzzo, 1997; Tocher *et al*., 2008; Tocher, 2010; Izquierdo e Koven, 2011). Na garoupa, a porcentagem dos PUFAs da série n3 foi mais representativa em relação aos PUFAs da série n6, seguindo o padrão encontrado para larvas de peixes marinhos (Sargent *et al*., 1999; Izquierdo e Koven, 2011). Por suas inúmeras funções estes AG podem ter apresentado elevações percentuais evidenciando sua importância durante o processo de desenvolvimento larval.

Conforme citado anteriormente a relação DHA/EPA também foi elevada atingindo valores em torno de 6,0 na primeira fase (chegando até cerca de 8 no 1ºDAF) o que indica um papel imprescindível de DHA durante a larvicultura, pois para muitas espécies, como *Scophthalmus maximus*, *Sparus aurata*, *Dentex dentex*, *Pagrus pagrus*, este valor está entre 1,0 e 2,0 (Sargent *et al*., 1999; Izquierdo e Koven, 2011). Os valores elevados da relação desses AGs parecem indicar um papel determinante no sucesso das larvas de garoupa, haja vista a importância já relatada em diversos processos fundamentais no desenvolvimento (Izquierdo e Koven, 2011). Em experimento testando dietas com diferentes percentuais de AG, Falk e Holt (2005) encontraram na relação DHA/EPA valores próximos a 5 no 3ºDAE, no entanto, no 7ºDAE esse número variou entre 4 e 8 nas diferentes dietas. Mesmo com as larvas sendo alimentada com diferentes percentuais de AG, sugerindo que durante os primeiros

dias as larvas da garoupa possuam uma necessidade maior da relação desses ácidos graxos em comparação ao bijupirá (Faulk e Holt, 2005).

Na segunda fase do desenvolvimento, assim como ocorre nos triglicerídeos, os SFA se elevam entre o 5º e 7ºDAF, possivelmente devido a um maior recrutamento desses AG, para posterior mobilização e utilização para o metabolismo, uma vez que os principais AG que variaram foram C16:0, seguido pelo C18:0. Nesse período as larvas realizam atividades intensas como natação e captura de presas, que em geral apresentam uma alta demanda metabólica, sugerindo, maior utilização desta classe de AG.

Os PUFAs n3, especificamente o DHA, após elevação percentual até o 6ºDAE, fase de pigmentação dos olhos e desenvolvimento da acuidade visual, desenvolvimento principalmente células dos cones e bastonetes, retomando os valores iniciais em 7DAF, período no qual (entre o 4º e o 7ºDAF) aumenta a razão DHA/EPA. Segundo Tocher *et al*. (2008) todos os AG podem ser mobilizados e metabolizados para produção de energia, incluindo também AG considerados de maior importância como é o caso do DHA. Ronnestad *et al*. (1995) relatam percentuais de cerca de 40% desse AG, sendo utilizado como fonte metabólica em larvas de uma espécie de linguado, *H. hippoglossus*. Estes PUFAs que são mobilizados ou metabolizados da fração polar podem ser realocados na fração neutra que mantém este recurso importante, no entanto, caso sejam metabolizados podem acarretar em prejuízos uma vez que se trata de um substrato importante (Tocher *et al*., 2008). No caso da garoupa a diminuição do percentual destes AG da fração polar não se refletiu em um aumento do percentual na fração neutra, indicando que possivelmente este AG foi utilizado. Assim como nos triglicerídeos isto pode nos indicar baixa ingestão do alimento vivo fornecido que continha elevada porcentagem desses HUFAs na dieta.

Embora tenham sido observadas algumas flutuações dos valores durante o desenvolvimento das larvas da garoupa, o perfil dos AG segue um padrão claro com maiores percentuais de SFA e PUFAs, que segundo Sargent *et al*. (2002) são os principais AG que compõem os fosfoglicerídeos das membranas lipídicas nos peixes, sendo estes últimos, os grandes responsáveis pela manutenção da fluidez e permeabilidade das membranas biológicas. Estes AG são necessários em grandes quantidades durante essa fase de intensa morfogênese e organogênese, e com isso, imprescindíveis para o crescimento e metabolismo das larvas de peixes, e neste caso, da garoupa (Tocher *et al*., 2008; Sargent *et al*., 2002).

Estes resultados podem orientar futuras pesquisas relacionadas ao aporte de AG necessários durante essa etapa do ciclo de vida da espécie, gerando conhecimentos sobre a utilização destes AG ao longo dos diferentes processos durante a ontogenia. Assim como os triglicerídeos, o estudo da composição dos AG fosfolipídios durante a larvicultura é fundamental para direcionar futuros trabalhos voltados para a nutrição e crescimento desses animais. Somente conhecendo como o animal utiliza seus substratos metabólicos se torna possível elaborar dietas e protocolos específicos de nutrição e cultivo visando tanto a produção comercial ou a conservação através do repovoamento uma vez que se trata de uma espécie ameaçada de extinção.

Nossos resultados mostraram que o conhecimento do perfil de AGs é uma ferramenta útil para a investigação metabólica em estudos que enfocam a embriogênese e desenvolvimento larval contribuindo para entender de forma mais minuciosa de que forma as larvas de *E. marginatus* utilizam esse substrato durante esse período. Além disso, os resultados sugerem que *E. marginatus* utilizou preferencialmente SFA dos fosfolipídios para o processo de eclosão e durante o desenvolvimento larval os PUFAs da série n3, principalmente DHA são importantes, assim como para a maioria das larvas

das espécies de peixes marinhos. Além disso, a relação DHA/EPA apresentou valores elevados em comparação com outras espécies marinhas, e tais valores supracitados podem ser utilizados como referência para futuros estudos que abordem a elaboração de dietas e protocolos alimentares específicos para a espécie. No entanto, tais resultados ainda precisam de outros estudos complementares enfocando os requerimentos lipídicos e de que forma os animais utilizam esses substratos visando alavancar o cultivo em cativeiro e contribuir com informações para a conservação e produção desta espécie.

5. Conclusão

Os ovos da garoupa verdadeira são compostos por elevados percentuais de PUFA nos fosfolipídios e quando passam pelo processo de eclosão utilizam preferencialmente os SFA dos fosfolipídios para este processo. Além disso, os PUFA da série n3 sobrepõem-se aos da série n6, principalmente o DHA, que apresentaram valores elevados em comparação com outras espécies marinhas tanto nos fosfolipídios quanto nos triglicérides nos três primeiros dias de desenvolvimento, evidenciando que estes AG são relevantes em *E. marginatus*, talvez até em maiores proporções que em outras espécies marinhas.

Estes resultados podem orientar futuras pesquisas relacionadas ao aporte de AG necessários durante essa etapa do ciclo de vida da espécie, gerando conhecimentos sobre a utilização destes AG ao longo dos diferentes processos durante a ontogenia. Assim como os triglicerídeos, o estudo da composição dos AG dos fosfolipídeos durante a larvicultura é fundamental para direcionar futuros trabalhos que explorem a nutrição e crescimento desses animais. Somente conhecendo como o animal utiliza seus substratos metabólicos se torna possível elaborar dietas e protocolos específicos de

nutrição e cultivo visando tanto à produção comercial quanto a conservação através do repovoamento uma vez que a garoupa verdadeira é uma espécie ameaçada de extinção.

6. Referências Bibliográficas

Abi-Ayad, S.M.E.A.; Boutiba, Z.; Mélard, C.; Kestemont, P. 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30:129-136.

Azarm, H.M.; Kenari, A.A.; Hedayati, M. 2012. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture Research*, 1-11.

Balon, E.K. 1975. Terminology of intervals in fish development. *Journal of the Fisheries Resources Board of Canada*, 32:1663-1670.

Bell, M.V.; Henderson, R.J.; Sargent, J.R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 83:711-719.

Bromage, N.R.; Roberts, R.J.1995. Broodstock management and egg and larval quality. Univ. Press. Cambridge.

Cejas, J.R.; Almansa, E.; Je´rez, S.; Bolaños, A.; Felipe, B.; Lorenzo, A. 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, B*, 139:209-216.

Cetta, C.M.; Capuzzo, J.M. 1982. Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Marine Biology*, 71:327–337.

Christie, W.W. 2003. Lipids analysis. The Oily Press, Bridgwater.

Chu, F.L.E.; Ozkizilcik, S. 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 11:665-674.

Dabrowski, K.; Culver, D.A.; Brooks, C.L.; Voss, A.C. 1991. Biochemical aspects of the early life history of yellow perch (*Perca flavescens*). *In*: Fish Nutrition in Practice. pp. 531-539. Edited by S.J. Kaushik.; P. Luquet. June 24-27, Biarritz (France).

Dayal, J.S.; Kailasam, M.; Thirunavukkarasu, A.R.; Ambasankar, K.; Ali, S.A. Free and total amino acids in eggs of greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, during embryogenesis, *Bamidgeh*, 65(856):1-7.

Falk, C.K.; Holt, G.J. 2005. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: Live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture*, 249:231-243.

Falk-Petersen, S.; Falk-Petersen, I.B.; Sargent, J.R.; Haug, T. 1986. Lipid class and fatty acid composition of eggs from the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 52:207-211.

Falk-Petersen, S.; Sargent, J.R.; Fox, C.; Falk-Petersen, I.B.; Haug, T.; Kjorsvik, E. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Marine Biology*, 101:553-556.

Farkas, T.; Kitajka, K.; Fodor, E.; Csengeri, I.; Lahdes, E.; Yeo, Y.K.; Krasznai. 2000. Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:6362-6366.

Finn, R.N. 1994. Physiological energetics of developing marine fish embryos and larvae. Thesis, University of Bergen, Bergen, Norway.

Finn, R.N.; Fyhn, H.J. 2010. Requirements for amino acids in ontogeny of fish. *Aquaculture Research*, 41:684-716.

Finn, R.N.; Henderson, J.R.; Fyhn, H.J. 1995. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). II. Lipid metabolism and enthalpy balance. *Marine Biology*, 124:371-379.

Folch, J.; Less, M.; Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226:497-503.

Fraser, A.J.; Gamble, J.C.; Sargent, J.R. 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Marine Biology*, 99:307-313.

Frings, C.S.; Fendly, T,W.; Dunn, R.T.; Quenn, C.A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*, 18:673-674.

Garcia, C.E.O.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Narcizo, A.M.; Rodrigues-Filho, J.A.; Medrado, A.T.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M.; Moreira, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex-change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, 192:170-180.

Izquierdo. M.; Koven, W. 2011. Lipids. In: Larval Fish Nutrition. Digestive Development and Nutrient Requirements. Holt, G.J. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Kamler, E. 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18:143-200

Kimata, M. 1982. Changes of chemical composition during early development of egg and larva in the half beak, *Hemiramphus sajori* (Temminck et Schelegel). *Bulletin of Japanese Society for the Science of Fishes*, 48:1663-1671.

Kimata, M. 1983. Changes of chemical composition during early development in the red sea bream *Crysophys major* (Temminck et Schelegel) egg and larva. *Bulletin of Japanese Society for the Science of Fishes*, 16:213-223.

Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Venturieri, R.L.L.; Moreira, R.G. 2011. Fatty acids as a tool to compare cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Siluriformes: Pimelodidae) and hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) larvae during early development. *Aquaculture International*, 20:1139-1160

Mourente, G.; Rodriguez, A.; Grau, A.; Pastor, E. 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecitotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiology and Biochemistry B*, 21:45-48

Needham, J. 1931. Chemical embryology. 3 vols. Cambridge University Press, London, New York.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2005. Lehninger: Principles of biochemistry. Freeman, New York, EUA, 1119 p.

Parrish, C.C.; Brown, J.A.; Daniel, E.S.; Somerton, D.C. 1993. Lipid composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs over the spawning season. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 93:35.

Rainuzzo, J.R.; Reitan, K.I.; Jorgensen, L. 1992. Comparative study on the fatty acid and lipid composition of four marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 103:21-26.

Rainuzzo, R.J.; Reitan, K.I.; Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155:103-115.

Ronnestad, I.; Finn, R.N.; Lein, I.; Lie, O. 1995. Compartmental changes in the contents of total lipid, lipid classes and their associated fatty acids in developing yolk sac larvae of Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *Aquaculture Nutrition*, 1:119-130.

Ronnestad, I.; Fyhn, H.J. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries and Science*, 1:239-259.

Sargent, J.R. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Ed. Bromage, N.R.; Roberts, R.R. Blackwell Science, Oxford.

Sargent, J.R.; McEvoy, L.A.; Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155:117-127.

Sargent, J.R.; Bell, J.G.; McEvoy, L.A.; Tocher, D.R.; Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 177:191-199.

Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds.). Fish Nutrition, 3rd ed, Academic Press, San Diego, USA.

Terner, C. 1968. Studies of metabolism in embryonic development I. The oxidative metabolism of unfertilized and embryonated trout ova. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 24:941-950.

Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Review in Fisheries and Science*, 11:107-184.

Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Resources*, 41:717-732.

Tocher, D.R.; Bendiksen, E.A.; Campbell, P.J.; Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280:21-34

Tocher, D.R.; Fraser, A.J.; Sargent, J.R.; Gamble, J.C. 1985. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20:69-74.

Tocher, D.R.; Sargent, J.R. 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids*, 19:492-499.

Vázquez, R.; González, S.; Rodríguez, A.; Mourente, G. 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture*, 119:273-286.

Yang, Z. 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis, Memorial University of Newfoundland St John´s, Newfoundland.

7. Figuras

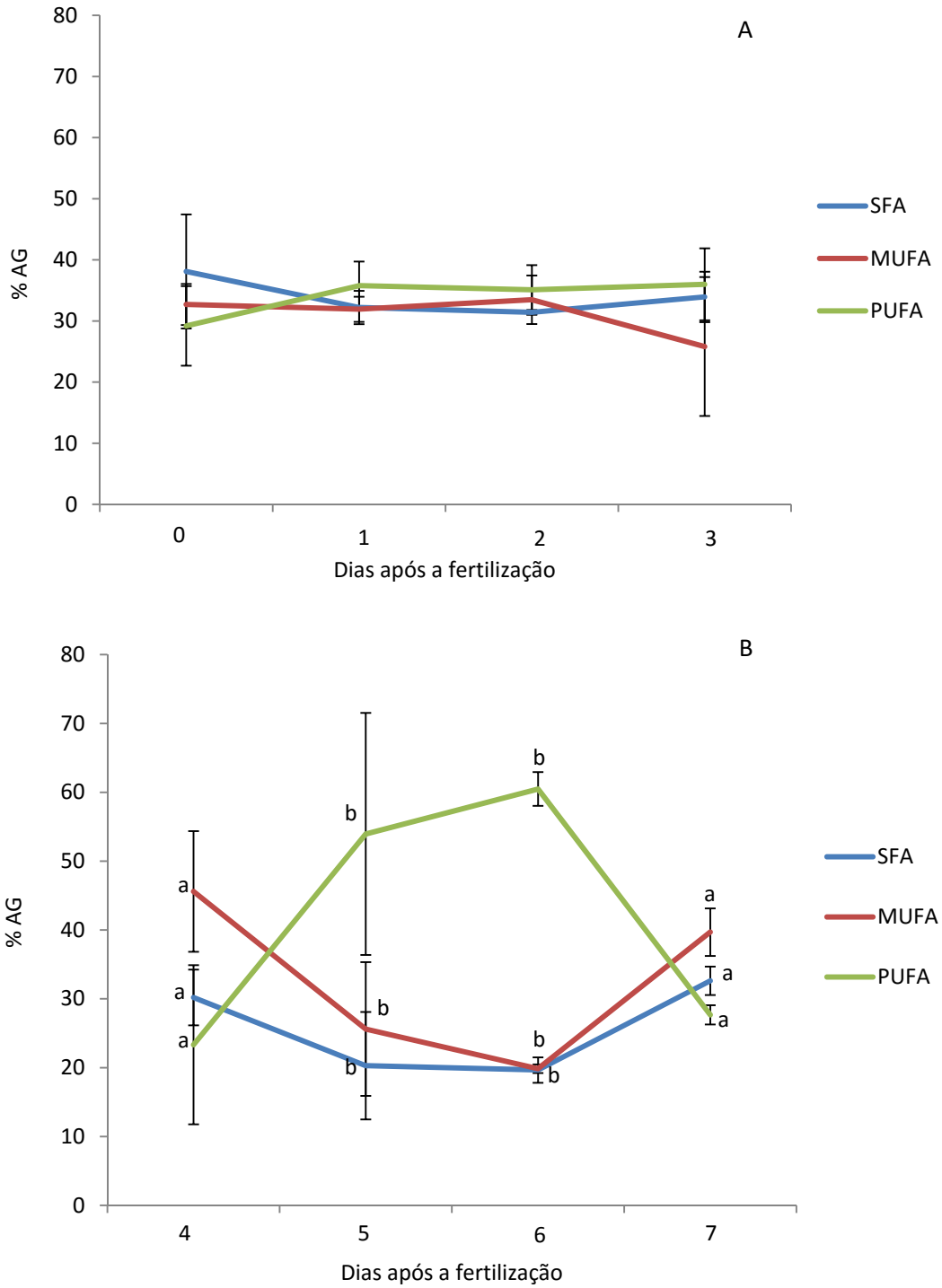


Figura 1. *Epinephelus marginatus*. Percentuais de ácidos graxos da fração neutra dos ovos e larvas. A) Fase 1 – 0, 1, 2 e 3 dias após a fertilização (DAF). B) Fase 2 – 4, 5, 6 e 7DAF. SFA - ácidos graxos saturados; MUFA - ácidos graxos monoinsaturados; PUFA - ácidos graxos polinsaturados. [ab] Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas entre os dias na mesma fase (P<0,05).

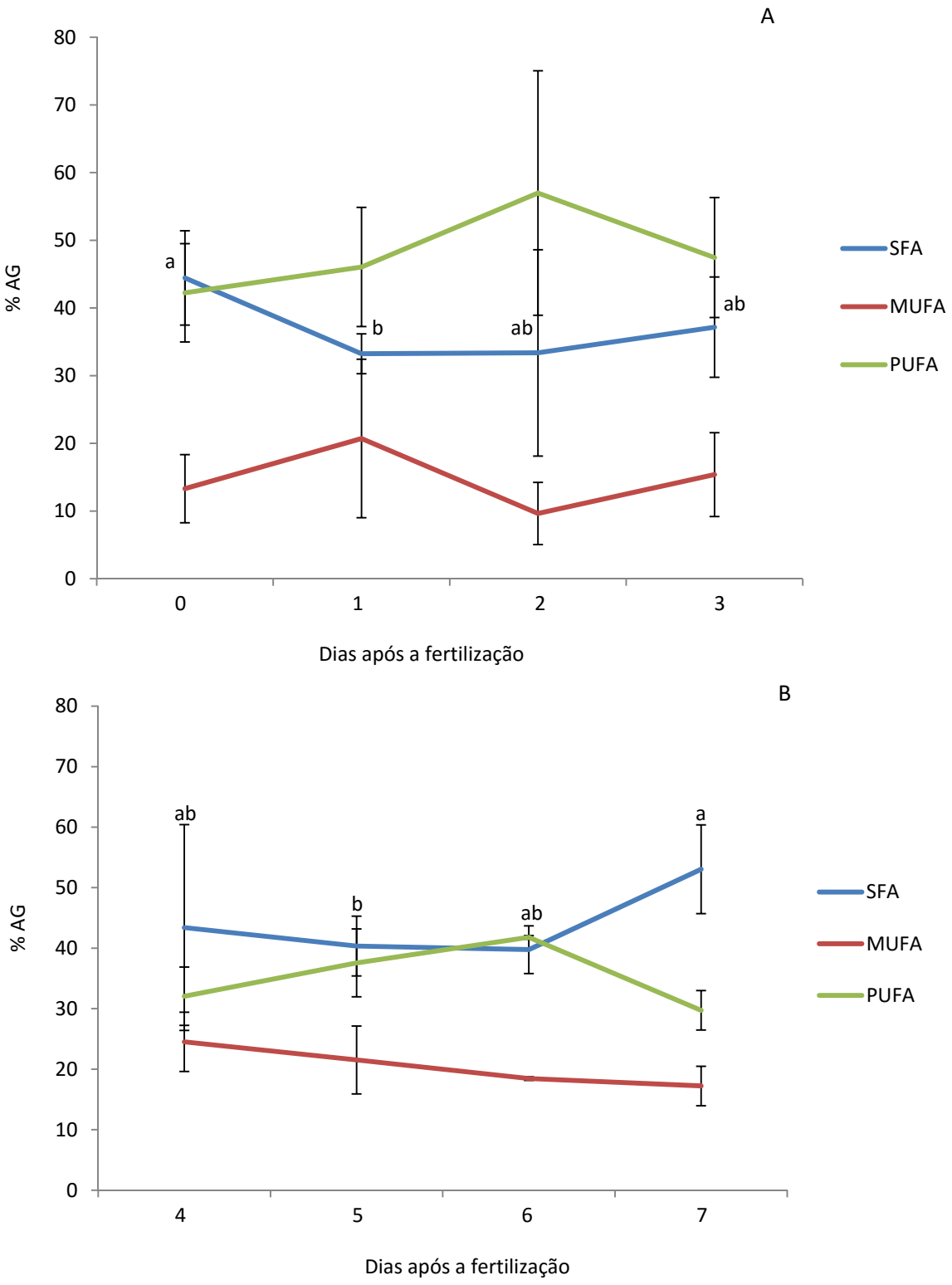


Figura 2. *Epinephelus marginatus*. Percentuais de ácidos graxos da fração polar dos ovos e larvas. A) Fase 1 – 0, 1, 2 e 3 dias após a fertilização (DAF). B) Fase 2 – 4, 5, 6 e 7DAF. SFA - ácidos graxos saturados; MUFA - ácidos graxos monoinsaturados; PUFA - ácidos graxos polinsaturados. [ab] Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas entre os dias na mesma fase (P<0,05).

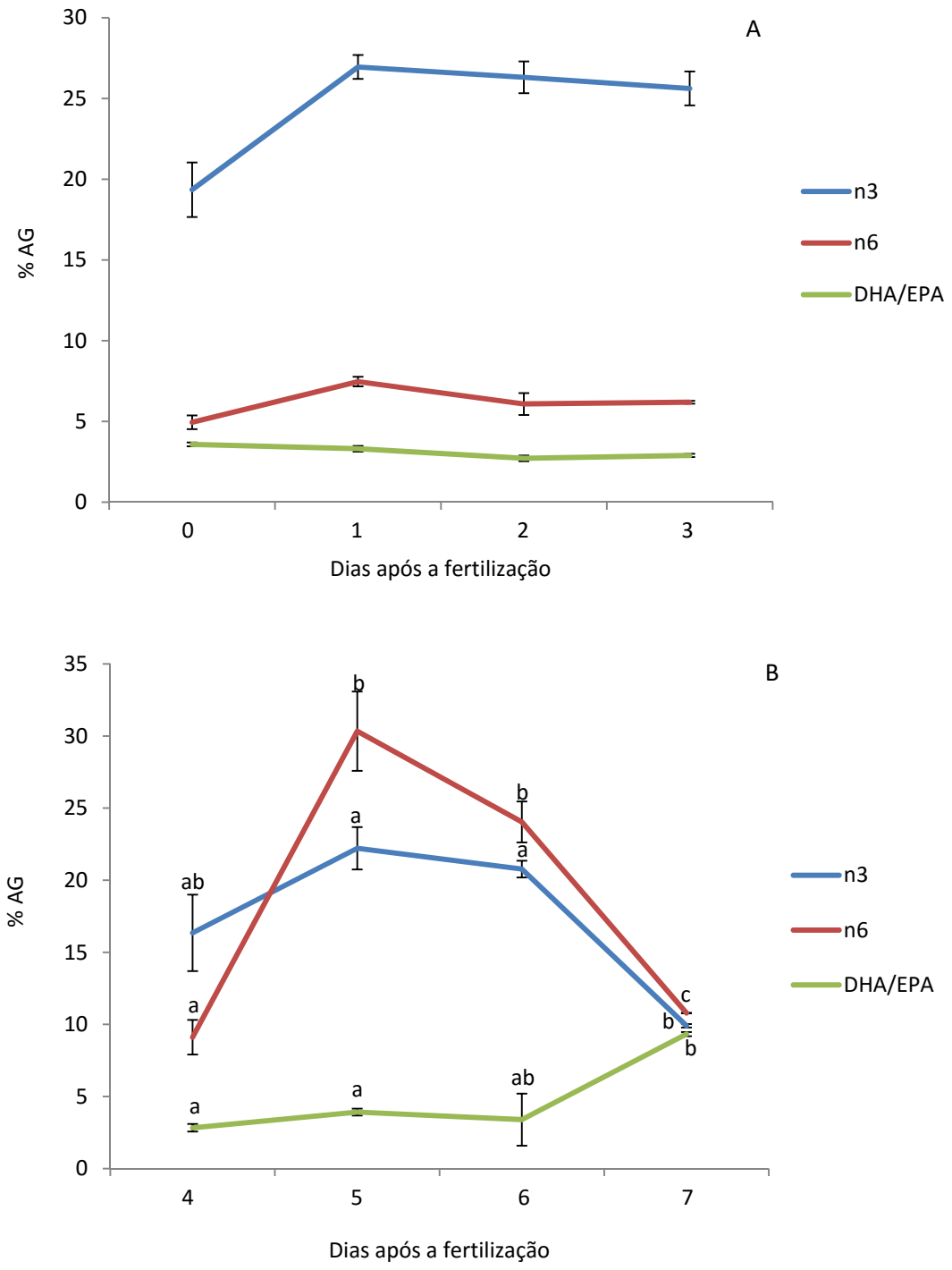


Figura 3. *Epinephelus marginatus.* Percentuais de ácidos graxos das séries n3 e n6 e relação DHA/EPA da fração neutra dos ovos e larvas. A) Fase 1 – 0, 1, 2 e 3 dias após a fertilização (DAF). B) Fase 2 – 4, 5, 6 e 7 DAF. n3 - ácidos graxos polinsaturados da série omega 3; n6 - ácidos graxos polinsaturados da série n6; DHA/EPA - razão entre o ácido docosahexanóico e eicosapentanóico. [abc] Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas entre os dias na mesma fase (P<0,05).

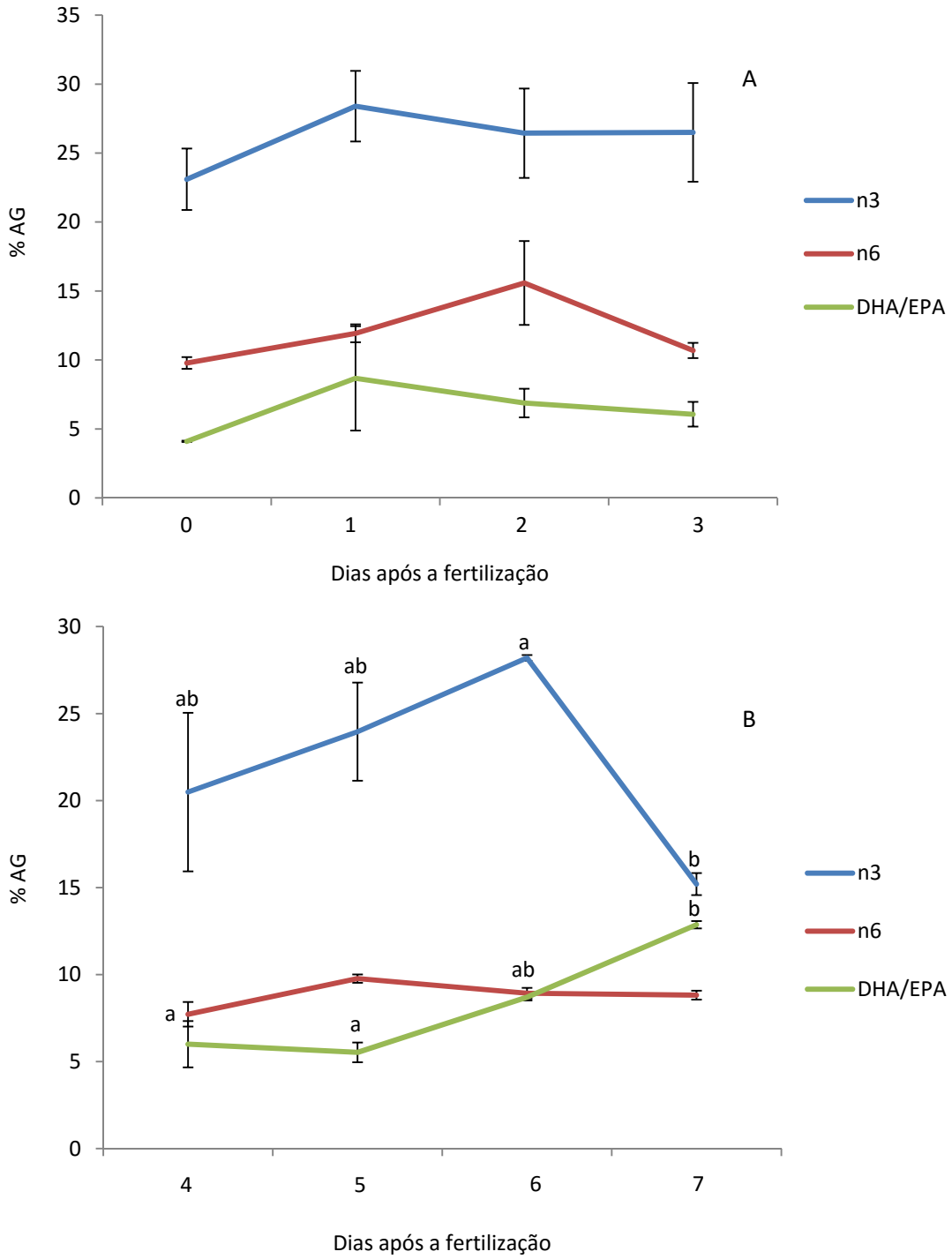


Figura 4. *Epinephelus marginatus.* Percentuais de ácidos graxos das séries n3 e n6 e relação DHA/EPA da fração polar dos ovos e larvas. A) Fase 1 – 0, 1, 2 e 3 dias após a fertilização (DAF). B) Fase 2 – 4, 5, 6 e 7 DAF. n3 - ácidos graxos polinsaturados da série omega 3; n6 - ácidos graxos polinsaturados da série n6; DHA/EPA - razão entre o ácido docosahexanóico e eicosapentanóico. [ab] Letras diferentes correspondem a diferenças estatísticas entre os dias na mesma fase (P<0,05).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos (%) da fração neutra dos oócitos e larvas de *E. marginatus* na fase 1: 0DAF, 1DAF, 2DAF e 3DAF. (Média ± EPM).

AG	0DAF	1DAF	2DAF	3DAF
C14:0	2,51 ± 0,80	1,61 ± 0,06	1,50 ± 0,19	1,96 ± 0,40
C15:0	1,12 ± 0,52	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,76 ± 0,14
C16:0	27, 04 ± 7,39	16,69 ± 1,35	17,25 ± 1,73	18,18 ± 0,74
C17:0	1,08 ± 0,27	0,70 ± 0,18	0,49 ± 0,05	1,18 ± 0,08
C18:0	6,82 ± 2,18	5,78 ± 0,56	6,12 ± 0,61	6,15 ± 0,15
C18:0iso	3,8 ± 1,47	5,04 ± 0,42	5,40 ± 0,31	4,85 ± 0,18
SFA	**38,10 ± 9,33**	**32,20 ± 2,72**	**31,41 ± 0, 39**	**33,93 ± 4,12**
C16:1n7	10,45 ± 2,96	9,32 ± 2,72	9,70 ± 3,03	9,96 ± 2,39
C18:1n9	16,82 ± 1,11	17,67 ± 0,23	19,47 ± 1,54	18,70 ± 0,83
C18:1n7	3,64 ± 0,79	4,12 ± 0,26	4,56 ± 0,65	4,51 ± 0,40
C20:1n9	0,80 ± 0,07	0,70 ± 0,05	0,93 ± 0,11	0,69 ± 0,06
MUFA	**32,69 ± 3,36**	**31, 91 ± 2,06**	**33,47 ± 3,97**	**25,81 ± 11,36**
C16:2n4	0,92 ± 0,00	0,85 ± 0,02	0,46 ± 0,23	0,25 ± 0,00
C16:3n4	1,0 ± 0,26	0,79 ± 0,41	0,89 ± 0,43	0,53 ± 0,34
C18:3n3	0,57 ± 0,16	0,60 ± 0,19	0,52 ± 0,07	0,31 ± 0,00
C18:4n3	1,96 ± 1,31	2,73 ± 1,64	3,91 ± 0,88	4,11 ± 0,60
C18:2n6t	1,45 ± 0,15	1,66 ± 0,28	1,79 ± 0,21	1,90 ± 0,43
C18:2n9		1,17 ± 0,41	0,13 ± 0,00	0,34 ± 0,00
C20:4n3	0,75 ± 0,08	1,27 ± 0,29	1,31 ± 0,36	0,77 ± 0,53
C20:5n3	3,09 ± 0,70	4,50 ± 0,84	4,78 ± 0,99	4,68 ± 0,67
C20:2n6	0,68 ± 0,32	1,04 ± 0,38	0,37 ± 0,07	0,57 ± 0,17
C20:4n6	1,70 ± 0,82	2,94 ± 0,39	3,00 ± 0,40	2,91 ± 0,10
C22:5n3	1,92 ± 1,02	2,96 ± 0,36	2,81 ± 0,26	2,19 ± 0,55
C22:6n3	11,06± 2,51	14,89 ± 1,80	12, 98 ± 1,27	13,56 ± 1,31
C22:2n6	0,43 ± 0,09	0,92 ± 0,05		
C22:5n6	0,60 ± 0,20	0,91 ± 0,13	0,92 ± 0,24	0,81 ± 0,08
PUFA	**29,20 ± 6,51**	**35,78 ± 3,94**	**35,10 ± 4,04**	**35,99 ± 5,89**
n3	19,35 ± 1,69	26,95 ± 0,74	26,31 ± 0,98	25, 62 ± 1,05
n6	4,95 ± 0,43	7,47 ± 0,30	6,08 ± 0,68	6,19 ± 0,09
n3/n6	3,90 ± 0,21	3,60 ± 0,11	4,32 ± 0,33	4,13 ± 1,39
DHA/EPA	3,57 ± 0,12	3,30 ± 0,18	2,71 ± 0,18	2,89 ± 0,10

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) da fração neutra das larvas de *E. marginatus* na fase 2: 4DAF, 5DAF, 6DAF, 7DAF. (média ± EPM).

AG	4DAF	5DAF	6DAF	7DAF	Estatística
C14:0	1,14 ± 0,08	0,77 ± 0,37	1,03 ± 0,09	1,12 ± 0,21	
C15:0 anteiso	0,79 ± 0,11	0,38 ± 0,07	0,59 ± 0,00	1,62 ± 1,03	
C16:0	15, 76 ± 1,57a	11,25 ± 5,40b	10,81 ± 0,81ab	19,30 ± 0,16ab	p<0,05
C18:0	5,75 ± 0,32	4,09 ± 1,45	5,90 ± 0,12	6,43 ± 0,57	
C18:0iso	2,04 ± 2,57	1,68 ± 0,00		2,96 ± 0,30	
SFA	**30,27 ± 4,05a**	**20,28 ± 7,80b**	**19,65 ± 1,84b**	**32,62 ± 2,06a**	**p<0,05**
C16:1n7	7,24 ± 4,08	5,87 ± 5,68	3,38 ± 0,04	5,28 ± 0,08	
C18:1n9	27,73 ± 7,47b	13, 94 ± 4,32a	14,14 ± 0,47ab	28,10 ± 3,52b	p<0,05
C18:1n7	3,92 ± 0,83	2,52 ± 2,02	2,32 ± 0,10	3,89 ± 0,12	
MUFA	**45,59 ± 8,76a**	**25,61 ± 9,71b**	**19,85 ± 0,62b**	**39,68 ± 3,46a**	**p<0,05**
C16:4n1	1,83 ± 0,14	3,09 ± 0,30	5,16 ± 0,08	2,64 ± 0,06	
C16:2n4	1,43 ± 0,29	1,63 ± 1,13	3,61 ± 0,20	1,83 ± 0,21	
C18:4n3	2,97 ± 0,27a	5,09 ± 4,40ab	7,66 ± 0,42b	2,53 ± 0,03b	p<0,05
C18:2n6t	2,54 ± 0,91	2,33 ± 0,88	3,97 ± 0,76	3,75 ± 0,31	
C18:2n9	2,56 ± 1,39a	5,03 ± 0,48ab	6,84 ± 0,07b	2,47 ± 0,47ab	p<0,05
C20:3n3	0,40 ± 0,00	0,70 ± 0,31	1,52 ± 0,10	1,53 ± 0,39	
C20:4n3	3,04 ± 1,66b	8,91 ± 6,96ab	7,42 ± 0,30a	2,02 ± 0,18b	p<0,05
C20:5n3	2,33 ± 1,51	1,34 ± 0,00	0,95 ± 0,91	0,37 ± 0,00	
C20:2n6	1,76 ± 0,05a	12,94 ± 0,68b	8,15 ± 0,97b	2,40 ± 0,44a	p<0,05
C20:4n6	1,52 ± 1,15	1,15 ± 0,00	1,74 ± 0,67	1,75 ± 0,09	
C22:6n3	6,59 ± 6,48	5,25 ± 0,06	3,22 ± 0,11	3,45 ± 0,32	
C22:2n6	1,08 ± 0,34a	7,67 ± 0,42b	6,70 ± 3,55b	1,47 ± 0,33a	p<0,05
C22:5n6	1,29 ± 0,50	6,24 ± 4,77	3,48 ± 0,47	1,42 ± 0,17	
PUFA	**23,33 ± 11,56a**	**53,95 ± 17,57b**	**60,48 ± 2,46b**	**27,68 ± 1,40**	**p<0,05**
n3	16,35 ± 2,65ab	22,21 ± 1,47a	20,77 ± 0,53a	9,90 ± 0,12b	p<0,05
n6	9,11 ± 1,21a	30,33 ± 2,75b	24,04 ± 1,42b	10,79 ± 0,01c	p<0,05
n3/n6	1,79 ± 0,50	0,73 ± 0,04	0,86 ± 0,08	0,91 ± 0,03	
DHA/EPA	2,82 ± 0,26a	3,91 ± 0,24a	3,38 ± 1,81	9,32 ± 0,14b	p<0,05

[abc] - Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro da mesma fase ao longo dos dias de desenvolvimento (p<0,05).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar dos oócitos e larvas de *E. marginatus* na fase 1: 0DAF, 1DAF, 2DAF e 3DAF. (Média ± EPM).

AG	0 DAF	1DAF	2DAF	3DAF	Estatística
C14:0	1,88 ± 0,20	0,56 ± 0,18	0,73 ± 0,41	0,79 ± 0,43	
C15:0	1,54 ± 0,27	0,10 ± 0,00	0,51 ± 0,35	0,48 ± 0,17	
C16:0	29,14 ± 3,54a	15,92 ± 1,03b	17,03 ± 7,93ab	18,84 ± 2,62b	p<0,05
C16:0iso	1,12 ± 0,12	1,50 ± 0,05	1,65 ± 0,07	1,09 ± 0,50	
C17:0	1,29 ± 0,37	0,78 ± 0,10	0,93 ± 0,53	1,21 ± 0,31	
C18:0	14,80 ± 1,17	12,80 ± 0,45	11,57 ± 4,55	13,17 ± 2,37	
SFA	**44,44 ± 6,96a**	**33,23 ± 2,94b**	**33,36 ± 15,24ab**	**37,16 ± 7,41ab**	**p<0,05**
C16:1n7	3,99 ± 0,65	2,15 ± 0,14	2,59 ± 1,52	3,07 ± 0,45	
C18:1n9	7,56 ± 7,17	15, 75 ± 12,35	5,35 ± 3,39	10,00 ± 5,98	
C18:1n7	1,10 ± 0,00	2,85 ± 0,35	0,90 ± 1,24	1,97 ± 0,45	
MUFA	**13,30 ± 5,03**	**20,71 ± 11,71**	**9,64 ± 4,59**	**15,38 ± 6,20**	
C16:2n4	1,31 ± 0,17	0,51 ± 0,10	0,47 ± 0,28	0,21 ± 0,00	
C18:4n3	1,03 ± 0,11	0,56 ± 0,04	0,61 ± 0,44	1,29 ± 0,50	
C18:2n6t	1,54 ± 0,10	1,41 ± 0,24	1,44 ± 0,37	2,63 ± 1,68	
C18:2n9	0,65 ± 0,00	0,80 ± 0,28	9,92 ± 7,95	0,93 ± 0,15	
C20:5n3	4,33 ± 0,00	2,88 ± 0,00	3,28 ± 0,00	3,57 ± 0,00	
C20:4n6	6,56 ± 0,75	8,42 ± 2,31	7,52 ± 1,86	6,79 ± 2,37	
C22:6n3	17,74 ± 0,00	24,96 ± 0,00	22,55 ± 2,70	21,64 ± 4,88	
C22:2n6			6,09 ± 0,00		
C22:5n6	0,83 ± 0,09	1,43 ± 0,51	1,70 ± 0,07	1,27 ± 0,14	
PUFA	**42,24 ± 7,27**	**46,06 ± 8,81**	**56,98 ± 18,06**	**47,45 ± 8,86**	
n3	23,01 ± 2,23	28,4 ± 2,56	26,44 ± 3,24	26,5 ± 3,58	
n6	9,78 ± 0,42	11,93 ± 0,65	15,58 ± 3,04	10,69 ± 0,55	
n3/n6	2,36 ± 0,13	2,38 ± 0,09	1,69 ± 0,37	2,47 ± 0,43	
DHA/EPA	4,09 ± 0,04	8,66 ± 3,78	6,87 ± 1,04	0,06 ± 0,89	

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar das larvas de *E. marginatus* na fase 2: 4DAF, 5DAF, 6DAF e 7DAF. (Média ± EPM).

AG	4DAF	5DAF	6DAF	7DAF	Estatística
C14:0	1,22 ± 0,78	1,14 ± 0,47	0,90 ± 0,15	1,49 ± 0,21	
C16:0	24,60 ± 12,75	20,34 ± 1,73	18,21 ± 1,78	25,69 ± 2,43	
C16:0iso	1,10 ± 0,68	0,99 ± 0,16	1,66 ± 0,22	1,09 ± 0,07	
C17:0	0,37 ± 0,00	1,41 ±0,52	1,83 ± 0,47	1,94 ± 0,25	
C18:0	13,16 ± 2,24	15,13 ± 2,07	15,20 ± 1,10	17,27 ± 1,84	
SFA	**43,41 ± 17,00ab**	**40,35 ± 4,93b**	**39,75 ± 3,94ab**	**53,04 ± 7,34a**	**p<0,05**
C16:1n7	3,92 ± 1,04	3,38 ± 0,66	2,07 ± 0,24	4,02 ± 0,49	
C16:1n9	16,60 ± 4,03b	13,54 ± 4,56b	12,36 ± 0,89b	9,91 ± 2,41b	
C18:1n7	2,23 ± 0,31	3,98 ± 1,50	2,99 ± 0,02	2,03 ± 0,00	
MUFA	**24,52 ± 4,89**	**21,53 ± 5,61**	**18,45 ± 0,29**	**17,22 ± 3,26**	
C18:4n3	1,38 ± 0,76	1,93 ± 1,19	1,78 ± 0,71	1,19 ± 0,16	
C18:2n6t	2,75 ± 1,66	2,26 ± 0,96	2,19 ± 0,07	2,19 ± 0,21	
C18:2n9		1,12 ± 0,40	1,52 ± 0,00		
C20:5n3	2,53 ± 2,82	3,18 ± 0,64	2,54 ± 0,13	0,96 ± 0,19	
C20:4n6	4,97 ± 1,14	7,51 ± 1,84	6,74 ± 0,25	6,63 ± 0,93	
C22:5n3	1,40 ± 1,59	1,26 ± 0,41	1,77 ± 0,45	0,70 ± 0,18	
C22:6n3	15,18 ± 3,44b	17,59 ± 6,28ab	22,11 ± 0,39a	12,35 ± 1,82b	p<0,05
C22:5n6			1,15 ± 0,00	1,20 ± 0,38	
PUFA	**32,06 ± 4,81**	**37,57 ± 9,11**	**41,79 ± 3,65**	**29,73 ± 2,98**	
n3	20,49 ± 4,56ab	23,96 ± 2,82ab	28,20 ± 0,17[a]	15,20 ± 0,63b	p<0,05
n6	7,72 ± 0,71	9,77 ± 0,24	8,93 ± 0,31	8,82 ± 0,26	
n3/n6	2,65 ± 0,34	2,45 ± 0,21	3,15 ± 0,05	1,72 ± 0,02	
DHA/EPA	6,00 ± 1,33a	5,53 ± 0,57a	8,70 ± 0,19ab	12,86 ± 0,21b	p<0,05

[ab] **-** Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes dentro do mesmo grupo ao longo das fases do desenvolvimento. (p<0,05).

Discussão Geral

O presente trabalho descreveu os principais eventos morfológicos durante as fases iniciais da garoupa verdadeira, *E. marginatus*, além de aspectos relacionados ao metabolismo de ácidos graxos destes animais. Os oócitos maduros e ovulados da garoupa verdadeira medem em torno de 990µm, são transparentes com uma gota de lipídio de tonalidade amarela, são compostos principalmente por SFA na fração neutra e principalmente por PUFA na fração polar. Os oócitos da garoupa verdadeira podem ser muito variáveis em diâmetro e já foram descritos em diversos países do Mediterrâneo como, por exemplo, na Espanha onde Zabala (1997) encontrou oócitos de *E. marginatus* medindo cerca de 750µm em águas da Andalúcia, no Mar Adriático diâmetros de 836µm descritos por Skaramuca *et al*. (1989) e na Itália com maiores diâmetros com 888µm descrito por Spedicato (1995).

Durante os dois primeiros dias de vida, as larvas de *E. marginatus* são frágeis e pequenas, o que, aliado ao manejo durante a larvicultura, dificulta o cultivo desta espécie, características que vêm sendo relatadas para outras espécies do gênero *Epinephelus* (Glamuzina *et al*., 1998; Jagadis *et al*., 2006; Leu *et al*., 2005; Soyano *et al*., 2005). Assim como no trabalho realizado por Glamuzina *et al*. (1998) para a mesma espécie, em nosso experimento as larvas abriram a boca e o poro urogenital aos 3DAE, no entanto, não observamos a captura de nenhum alimento, bem como não verificamos alimento no trato digestório das larvas. A partir do 4ºDAE consideramos que a boca estivesse funcional, assim como Glamuzina *et al*. (1998) que também observaram a boca funcional a partir do 4DAE na mesma espécie. Desta forma, assim como Kohno *et al*. (1997) que relata a ossificação tardia de elementos da boca, sugerimos que exista um período ou um tempo mínimo necessário para o amadurecimento do aparato bucal que

varia entre 24 horas entre abertura da boca e completa funcionalidade que permita a captura de presas para algumas espécies deste grupo.

Outra característica importante foi o desenvolvimento das nadadeiras que permitiu aos animais se distribuírem por toda a coluna de água, sugerindo que estes estavam aptos a capturar presas, além de percepção de movimentos dentro da água indicando que os animais embora ainda muito frágeis, são capazes de executar diversas funções vitais para sua sobrevivência. Muitos fatores afetam o controle dessas funções vitais como, por exemplo, desenvolvimento dos olhos e órgãos sensoriais para localização das presas, formação e desenvolvimento do pedúnculo e da nadadeira caudal para o deslocamento, abertura da boca e funcionalidade do órgão para captura de presas, desenvolvimento do sistema digestório, além de atividade enzimática para digestão do alimento ingerido (Yúfera e Darias, 2007). No entanto, Goçalo (2015) observou que as larvas de *E. marginatus* eram capazes de controlar sua natação, movimentos e interagir com o meio já aos 3DAE, informação que corroboramos.

Outras estruturas importantes foram descritas, como o esôfago que foi visualizado aos 3DAE, conectando a região posterior da faringe partindo do último arco branquial e se conectando ao intestino médio como um tubo morfologicamente não diferenciado. Durante essa fase o esôfago liga diretamente a faringe ao intestino posterior, uma vez que o estômago ainda não estava diferenciado. Já aos 12DAE podemos visualizar as bolsas longitudinais e células secretoras de muco que já caracterizam a diferenciação histológica do esôfago, sendo estas estruturas que permitirão maior distensão do órgão além da produção de muco para facilitar a passagem do alimento (Lazo *et al*., 2011).

Com o início da compartimentalização da região estomacal aos 4DAE, visualizamos o aparecimento dos esfíncteres pilóricos e cardíaco, caracterizado por

epitélio cúbico simples. Abaixo dos esfíncteres, inicia-se o intestino, que é uma das primeiras estruturas a se diferenciar nas larvas de teleósteos e também é a mais longa das porções do trato digestório, ocupando quase toda cavidade da região abdominal (Lazo *et al*., 2011). O intestino posterior bem como o reto já foi visualizado no 3ºDAE, mostrando que este órgão apresenta um crescimento dinâmico e ativo, pois desempenha um papel de suma importância nos processos de digestão e absorção dos nutrientes.

Também a partir do 4ºDAE, podemos observar que ocorre a formação de bolsas e dobramento do tecido intestinal, pois, o intestino vai aumentando em comprimento e ocupando cada vez maiores volumes na cavidade abdominal, com vistas a aumentar a superfície de digestão e absorção uma vez que a quantidade de alimento vai aumentando com o desenvolvimento das larvas (Lazo *et al*., 2011). As glândulas anexas também foram identificadas já no 4ºDAE, como o fígado e o pâncreas que desempenham papel determinante no metabolismo dos nutrientes, bem como conversão de substratos e envio desses metabólitos para tecidos periféricos.

Abordando o perfil dos ácidos graxos foi possível observar que as larvas da garoupa-verdadeira utilizaram preferencialmente os SFA dos fosfolipídios para o processo de eclosão. Os PUFA n3 apresentaram percentuais mais elevados de n6, principalmente DHA, que ainda apresentaram valores mais elevados quando comparados com outras espécies marinhas sugerindo que estes AG sejam relevantes em *E. marginatus*, talvez até em maiores proporções que em outras espécies. Dentre as classes de ácidos graxos, encontramos percentuais mais elevados de SFA nos triglicerídeos dos ovos da garoupa verdadeira, com o C16:0 apresentando maior porcentagem, seguidos pelos MUFA, representados principalmente pelo C18:1n9 e por último, pelos PUFA com maior percentual encontrado do C22:6n3.

Já nos fosfolipídios encontramos dentre os SFA, o C16:0 com o maior percentual, dentre os PUFAs, o C22:6n3 com maior percentual, e dentre os MUFAs, o C18:1n9 foi o principal AG. Grandes percentuais de AG da série n3 são encontrados nos fosfolipídios dos ovos das espécies marinhas (Sargent *et al*., 1999; Sargent *et al*., 2002; Tocher *et al*., 2008; Tocher, 2010), incluindo grandes percentuais de C22:6n3 que juntamente com o C20:5n3, são os principais AG altamente insaturados (HUFA) em espécies marinhas (Falk-Petersen *et al*., 1989; Parrish *et al*., 1993; Rainuzzo *et al*., 1997; Tocher e Sargent, 1984). Sargent *et al*. (2002) relatam que estes SFAs, MUFAs e PUFAs supracitados são os principais AG que compõem os fosfolipídios das membranas celulares nos peixes, sendo os PUFAs os grandes responsáveis pela manutenção da fluidez e permeabilidade das membranas biológicas. As larvas de peixes durante essa fase são sistemas fechados e regulam muitos de seus processos fisiológicos com base na fluidez e permeabilidade das membranas do córion, no caso dos ovos, como trocas gasosas, trocas de calor e água, além da absorção de algumas partículas como sais, glicose, aminoácidos livres, etc (Ronnestad e Fyhn, 1993) e das células da epiderme durante a fase larval.

Outro dado muito relevante do presente trabalho foi a razão n3/n6 e DHA/EPA nos triglicerídeos dos oócitos das garoupas que pode indicar que a espécie apresenta percentual próximo a sua necessidade nutricional nas fases iniciais do desenvolvimento, uma vez que alguns estudos apontam que a razão n3/n6 encontrada para a maioria dos teleósteos marinhos está em torno de 2, percentual próximo ao encontrado para as larvas de garoupa, e utilizado para primeira alimentação em algumas espécies marinhas (Sargent *et al*., 1997). Com isso, podemos utilizar esse percentual como um ponto de partida para estudos nutricionais durante as fases de larvicultura.

Em contrapartida a esse elevado percentual nos três primeiros dias (G0 a G3) chegando próximos a 4, e em seguida, ocorre uma diminuição acentuada para 1,79 no 4ºDAF, que corresponde a fase de início da alimentação exógena. A partir do 5ºDAF, a relação n3/n6 atinge valores abaixo de 1, indicando que a porcentagem de PUFA n6 excede a de n3, o que ocorre nos 5º e 6ºDAF principalmente devido aos AG n6 de cadeia longa. No entanto, sugerimos que seja fornecido na dieta valores superior a 2,0 na relação n3/n6 e DHA/EPA, uma vez que esses valores foram encontrados durante a fase de nutrição endógena, período no qual, o desenvolvimento e sobrevivência foram satisfatórios. Por outro lado, a partir da abertura da boca e alimentação exógena, os valores diminuíram para 1,0 ou menos, período no qual, a mortalidade foi elevada e durou até atingir 100% de mortalidade nos primeiros dias de desenvolvimento (máximo de 16 dias).

Assim como nos triglicerídeos, nos fosfolipídios, a porcentagem dos PUFAs da série n3 foi mais representativa em relação aos PUFAs da série n6, seguindo o padrão encontrado para larvas de peixes marinhos (Izquierdo e Koven, 2011; Sargent *et al*., 1999). Além disso, a relação DHA/EPA também foi elevada atingindo valores em torno de 6,0 na primeira fase (chegando até cerca de 8 no 1ºDAF) o que indica um papel imprescindível de DHA durante a larvicultura, considerando que, para muitas espécies como *Scophthalmus maximus*, *Sparus aurata*, *Dentex dentex*, *Pagrus pagrus*, este valor está entre 1,0 e 2,0 (Izquierdo e Koven, 2011; Sargent *et al*., 1999). Os valores elevados da relação desses AGs parecem indicar um papel determinante no sucesso das larvas de garoupa, pois em ambas as classes de lipídios e período do desenvolvimento essa relação se destaca com valores elevados.

Com tudo que foi exposto, concluímos que os dados gerados já podem ser aplicados em cultivos futuros, pois permitiram descrever como os embriões se dividem,

eclodem e desenvolvem suas principais características até o final da fase de alimentação endógena, e descrever como se desenvolve o seu trato digestório ao longo dos primeiros 16 dias de desenvolvimento, além de como utilizam os AG durante os primeiros 8 dias de desenvolvimento. Os resultados deste trabalho demonstraram que as larvas da garoupa apresentam desenvolvimento relativamente lento de suas estruturas digestórias, no entanto, estas são capazes de capturar, ingerir e digerir presas já a partir do 4ºDAE. Apresentam uma elevada necessidade dos HUFAs DHA/EPA, e sugerimos a utilização de alimento vivo de tamanho reduzido (náuplios de copépodes ou "*SS strain*" *Brachionus rotundiformes*) enriquecidos com esses HUFAs em razões acima de 2,0. Consideramos de suma importância a continuidade dos estudos morfológicos e fisiológicos no desenvolvimento larval, destacando que são necessários mais tempo e investimento no conhecimento desta espécie, a fim de entender completamente seu desenvolvimento larval até a fase de juvenil, contribuindo assim para a domesticação desta espécie no cativeiro.

Desta forma, esperamos que os resultados gerados possam ser aplicados nas fases de embriogênese e larvicultura contribuindo para alavancar sua produção em cativeiro e elaborar futuramente um programa de repovoamento desta espécie ameaçada e contribuir para sua conservação.

Referências Bibliográficas

Abi-Ayad, S.M.E.A.; Boutiba, Z.; Mélard, C.; Kestemont, P. 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30:129-136.

Andrade, A.B.; Machado, L.F.; Hostim-Silva, M.; Barreiros, J.P. 2003. Reproductive Biology of the Dusky Grouper *Epinephelus marginatus* (LOWE, 1834). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46:373-381.

Asia Pacific Aquaculture, 2012. Groupers in Asia. 8:(2). p.5.

Azarm, H.M.; Kenari, A.A.; Hedayati, M. 2012. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture Research*, 1-11.

Balon, E. 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses. *Environmental Biology of Fishes*, 56:17-38.

Barreiros, J.P. 1995. Aspectos do comportamento e reprodução do mero *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) nos Açores. Angra do Heroísmo. Dissertação, Universidade dos Açores.

Boglione, C.; Marino, G.; Giganti, M.; Longobardi, Ç.D.; Kamaci, O.; Saka, S.; Firat, K.; Alpbaz, A. 2011. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1934) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture*, 291:48-60.

Bromage, N.R.; Roberts, R.J. 1995. Broodstock management and egg and larval quality. Univ. Press. Cambridge.

Bruslé, J. 1985. Exposé synoptique des données biologiques sur les mérous, *Epinephelus aeneus* (G. St-Hilaire, 1809) et *E. guaza* (Linné, 1758) de l'Océan Atlantique et de la Méditerranée. FAO, Synopsis sur les peches, 129:1-64.

Chauvet, C. 1981. Calcul par otolithométrie de la relation log.-Td'Epinephelus guaza (Linné, 1758) de la côte nord de la Tunisie. Rapp. P.V. *Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Méditerranée*, 27(5):103-106.

Chu, F.L.E.; Ozkizilcik, S. 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 11:665-674.

Cornish, A.; Harmelin-Vivien, M. 2004. *Epinephelus marginatus*. IUCN 2007. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.

Doi. M.; Munir, M.N.; Razali N.L.N.; Zulkiffi, T. 1991. Artificial propagation of the grouper, *Epinephelus suillus* at the marine finfish hatchery in Tanjong Demongo Terrengganu, Malaysia. Kertas Pengembangan Perikanan, 167:41pp.

Falk-Petersen, S.; Sargent, J.R.; Fox, C.; Falk-Petersen, I.B.; Haug, T.; Kjorsvik, E. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Marine Biology*, 101:553-556.

Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2014.

Garcia, C.E.O.; Mello, P.H.; Araújo, B.C.; Narcizo, A.M.; Rodrigues-Filho, J.A.; Medrado, A.T.; Zampieri, R.A.; Floeter-Winter, L.M.; Moreira, R.G. 2013. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex-change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. *General and Comparative Endocrinology*, 192:170-180.

Glamuzina, B.; Skaramuca, B.; Glavic, N.; Kozul, V. 1998. Preliminary studies on reproduction and early stage rearing trial of dusky grouper. *Aquaculture Research*, 29:769-771.

Goçalo, C.G. 2015. Análise do comportamento natatório de larvas de peixes marinhos com técnicas de imageamento de alte frequência. Tese de Doutorado. 121p.

Gurr, M.I.; Harwood, J.L. 1991. Lipid Biochemistry. Chapman & Hall. Fourth Edition.

Hall, B.K.; Wake, M.H. 1999. Introduction: Larval development, evolution, and ecology. In: The origin and evolution of larval forms. Hall, B.K.; Wake, M.H. (eds), p.1-19. Academic Press, San Diego, CA.

Heemstra, P.C.; Anderson Jr, W.D.; Lobel, P.S. 2003. Serranidae. In Carpenter K.E. (ed). The living marine resources of the Western Central Atlantic. Volume 2: Bonny fishes part 1 (Ascipenseridae to Grammatidae). FAO species identification guide for fisheries purposes and American Society of Ichthyologists and Herpetologists Special Publication Nº5. Rome: FAO, pp. 1308-1369.

Heemstra, P.C.; Randall, J.E. 1993. FAO Species Catalogue, 16. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species known to date. p.522.

Heming, T.A.; Buddington, R.K. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In Fish Physiology, vol. XIA (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 407-446. New York: Academic Press.

Hoehne-Reitan, K.; Kjorsvik, E. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas. *American Fisheries Society*, 40:9-36.

Holt, G.J. 2011. Larval Fish Nutrition. In: Digestive Development and Nutrient Requirements. Lipids. Izquierdo. M.; Koven, W. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Irigoyen, A.J.; GALVA, D.E.N.; VENERUS, L.A. 2005. Occurrence of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) in gulfs of northern Patagonia, Argentina, *Journal of Fish Biology*, 67:1741-1745.

Izquierdo. M.; Koven, W. 2011. Lipids. In: Larval Fish Nutrition. Digestive Development and Nutrient Requirements. Holt, G.J. Wiley-Blackwell. First Edition. p. 47-80.

Jagadis, I.; Ignatius, B.; Kandasami, D.; Khan, M.A. 2006. Embryonic and larval development of honeycomb grouper *Epinephelus merra* Bloch. *Aquaculture Resources*, 37:1140-1145.

Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, 45:261-279.

Kohno, H.; Diani, S.; Sunyoto, P.; Slamet, B.; Imanto, P.T. 1990. Early developmental events associated with changeover of nutrient sources in the grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, larvae. *Fisheries Resources Bulletin (Indonesia)*. Special Edition, 1:51-64.

Kohno, H.; Ordonio-Aguilar, R.; Ohno, A.; Taki, Y. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Resources*, 44:267-274.

Lazo, J.P.; Darias, M.J.; Gisbert, E. 2011. Ontogeny of the digestive tract. In: Holt, G.J. *Larval Fish Nutrition*. First edition, Ed. John Wiley &Sons. pp. 5-46.

Leu, M.Y.; Liou, C.H.; Fang, L.S. 2005. Embryonic and larval development of the malabar grouper, *Epinephelus malabaricus* (Pisces: Serranidae). *Journal of Marine Biology*, 85:1249-1254.

Liao, I.C.; Leaño, E.M. 2008. The Aquaculture of Groupers. Ed. Asian Fisheries Society, Phillipines. p. 241.

Mazurais, D.; Darias, M.; Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Canadian Journal of Zoology*, 89(7):599-611.

Mylonas, C.C.; Zohar, Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10:463-491.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. 2005. Lehninger: Principles of biochemistry. Freeman, New York, EUA, 1119 p.

Nelson, J.S. Fishes of the world. 4ª edição. New York: John Wiley & Sons. 601p. 2006.

Ozkizilcik, S.; Chu, F.L.E.; Place, A.R. 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in Striped Bass (*Morone saxatilis*). Comparative Biochemistry and Physiology, 113B(3):631-637.

Parrish, C.C.; Brown, J.A.; Daniel, E.S.; Somerton, D.C. 1993. Lipid composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs over the spawning season. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 93:35.

Rainuzzo, J.R.; Reitan, K.I.; Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. *Aquaculture*, 155:103-115.

Rodrigues-Filho, J.A.; Sanches, E.G.; Garcia, C.E.O.; Sebastini, E.F.; Pannuti, C.V.; Moreira, R.G. 2009. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, 85:301-302.

Ronnestad, I.; Fyhn, H.J. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. *Reviews in Fisheries and Science*, 1:239-259.

São Paulo, 2008. Decreto Estadual no 53494-2008 de 02 de outubro de 2008. Diário Oficial do Estado de São Paulo 118(187). Secretaria do Meio Ambiente.

Sargent, J.R.; Bell, J.G.; McEvoy, L.A.; Tocher, D.R.; Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 177:191-199.

Sargent, J.R.; McEvoy, L.A.; Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155:117-127.

Sargent, J.R.; Tocher, D.R.; Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds.). Fish Nutrition, 3rd ed, Academic Press, San Diego, USA.

Sheridan, M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 107:495-508.

Skaramuca, B.D.; Musin, V.; Onofri,; Carie, M. 1989. A contribution to the knowledge of the spawning time of the dusky grouper (*Epinephelus guaza* L.). *Ichthyologia*, 21:79-85.

Soyano, K.; Sakakura, Y.; Hagiwara, A. 2005. Reproduction and larviculture of seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* in Japan. In: Liao, I.C. and Leaño E.M. (Eds). The Aquaculture of groupers. pp. 1-28.

Spedicato, M.T.; Lembo, G.; Di Marco, P.; Marino, G. 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cahiers Options Mediterraneennes*, 16:131-148.

Tocher, D.R. 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Resources*, 41:717-732.

Tocher, D.R.; Bendiksen, E.A.; Campbell, P.J.; Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280:21-34.

Tocher, D.R.; Sargent, J.R. 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. *Lipids*, 19:492-499.

Yúfera, M.; Darias, M.J. 2007. The onset of feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268:53-63.

Zabala, M.; Garcia-Rubies, A.; Louisy, P.; Sala, E. 1997. Spawning behavior of the Mediterraneam dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces: Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). *Scientia Marina*, 61(1):65-77.

Zambonino-Infante, J.L.; Cahu, C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268:98-105.

Zambonino-Infante, J.L.; Gisbert, E.; Sarasquete, C.; Navarro, I.; Gutierrez, J.; Cahu, C.L. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fishes*. Ed. Cyrino, J.E.P.; Bureau, B.; Kapoor, B.G. Taylor & Francis Group. pp.281-348.