



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AQUICULTURA

PROTEASES ALCALINAS E MANEJO ALIMENTAR NA
LARVICULTURA DO NEON GOBI (*Elacatinus figaro*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, CCA – UFSC, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

Orientadora: Mônica Yumi Tsuzuki
Co-orientadora: Juliet Kiyoko Sugai

MARIA FERNANDA DA SILVA SOUZA

Florianópolis
2012

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

Souza, Maria Fernanda da Silva

Proteases alcalinas e manejo alimentar na larvicultura do neon gobi
(*Elacatinus figaro*) [dissertação] / Maria Fernanda da Silva Souza ;
orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki.; coorientadora, Mônica Juliet Kiyoko
Sugai - Florianópolis, SC, 2012.

63 p. 21 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Enzima digestiva. 3. Protease. 4. Peixe ornamental. 5.
Manejo alimentar. I. Tsuzuki, Mônica Yumi. II. Juliet Kiyoko Sugai. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

**Proteases alcalinas e manejo alimentar na larvicultura do neon gobi
(*Elacatinus figaro*)**

Por

MARIA FERNANDA DA SILVA SOUZA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Mônica Yumi Tsuzuki – *Orientadora*

Dra. Anita Rademaker Valença

Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dr. Marcelo Borges Tesser

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos á todos aqueles que fizeram deste trabalho possível, em especial:

Á minha orientadora, professora Mônica, que sempre me deu direcionamento em momentos de dúvida e se mostrou presente e interessada, contribuindo de forma positiva com meu trabalho;

Á minha co-orientadora, professora Juliet, que com sua sabedoria me proporcionou ensinamentos essenciais para a realização desse trabalho, estando sempre disposta a me ajudar;

Á minha mãe, a pessoa que tornou possível a minha realização profissional e sempre acreditou em mim, me apoiando incondicionalmente...você é o motivo dessa conquista!

Ao meu namorado, Kauli, cujo astral otimista e determinação incessante me inspiraram a lutar pelos meus objetivos positivamente, sendo acima de tudo meu amigo e incentivador,

Ao pessoal do Lapmar 2: Sayão, Ane, Raquel, Giovani, Dayane, Karine, Wesley, Cris e Sassá, que me ajudaram muito com as atividades rotineiras, tornando o dia a dia mais divertido;

Ao Jonas e todo o pessoal da Neotropical, pelo conhecimento proporcionado;

Ás professora Débora Fracalossi e Aimê Rachel, pelo empréstimo de equipamentos, além de conselhos iluminadores,

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

RESUMO

Endêmico da costa brasileira, o neon gobi (*Elacatinus figaro*) é um peixe que apresenta interesse para a o mercado ornamental pelo seu pequeno tamanho e fácil adaptação em cativeiro. Devido à captura excessiva, encontra-se inserido na lista de espécies ameaçadas extinção. Com intuito de incrementar a produção intensiva do neon gobi, e compreender melhor os aspectos nutricionais, o presente estudo buscou compreender o potencial digestório da espécie através da determinação das proteases alcalinas totais. A atividade enzimática foi medida em peixes com 3, 22, 41 e 180 DAE, através da hidrólise da azocaseína. As proteases alcalinas da Artemia e rotífero foram determinadas para avaliar possíveis contribuições de enzima exógenas. Além disso, o protocolo alimentar comumente utilizado na larvicultura da espécie foi modificado, realizando-se um novo protocolo antecipando-se a oferta de Artemia em 6 dias em relação ao protocolo alimentar comumente usado, onde a atividade enzimática, o crescimento e a metamorfose das larvas foram avaliados em ambos os protocolos. A atividade das proteases alcalinas foi estatisticamente semelhante nos três estágios (3,22 e 41 DAE) da espécie, com um aumento evidente apenas na fase adulta (180 DAE). A contribuição de proteases alcalinas exógena no trato digestório do neon gobi foi de 2% do rotífero e 67,9 % da Artemia. A antecipação do fornecimento da Artemia demonstrou incrementar o crescimento e antecipar a metamorfose das larvas, porém a atividade enzimática das proteases alcalinas foi menor nesse protocolo do que o comumente utilizado, demonstrando-se benéfica do ponto de vista produtivo uma vez que alcançou o tamanho comercial mais cedo, e permaneceu menos tempo dependente da alimentação com a Artemia, o que reduz os custos de produção.

Palavras-chave:enzima digestiva; protease; ornamental; gobídeo; Artemia, manejo alimentar

ABSTRACT

Endemic to Brazilian coast, barber goby (*Elacatinus figaro*) is an ornamental trade interest species owing to its small size and easy adaptation to captivity. It is included to the threatened species list due to overfishing, being the exploitation prohibited. Aiming to contribute with the intensive production of the species, the actual study focused on understanding barber goby's digestive capacity through total alkaline proteases determination. The enzymatic activity was measured in fishes with 3, 22, 41 and 180 days after hatch (DAH), through azocasein hydrolysis. Total alkaline protease of *Artemia* and rotifer was also determined to evaluate possible exogenous contributions. Furthermore, the feeding protocol commonly used in the species larviculture was modified by anticipating *Artemia* offer and comparing with the feeding protocol commonly used, where the enzymatic activity, the growth and metamorphosis in the juveniles were evaluated, intending to confirm exogenous digestive contribution on barber goby with 41 DAE. Alkaline proteases activities were similar during species the three first stages (3, 22 e 41 DAH), with a clear increase in the adult phase. The exogenous contribution from digestive enzymes from rotifer was near 2% and from *Artemia*, 67,9 %. The *Artemia* offer anticipation increased growth and anticipated metamorphosis on neon goby juvenile, however the protease alkaline activity was lower in this protocol than in that commonly used. However, it demonstrated to be profitable since it reached the commercial size earlier and become a shorter period depending on *Artemia* feeding, which reduces the production costs.

Keywords: digestive enzyme; protease; ornamental; gobidae; *Artemia* feeding protocol

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO: **PROTEASES ALCALINAS E MANEJO ALIMENTAR NA LARVICULTURA DO NEON GOBI (*Elacatinus figaro*)**

Figura 1 – Protocolo (A) alimentar de larvicultura do neon gobi (*E. figaro*) com oferta de Artemia aos 12 DAE 33

Figura 2 – Protocolo (B) alimentar de larvicultura do neon gobi (*E. figaro*) com oferta de Artemia aos 18 DAE 34

Figura 3 – Crescimento em comprimento médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP; n=3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05)..... 38

Figura 4 – Crescimento em peso úmido médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP; n=3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05)..... 38

Figura 5 - Perfil da atividade enzimática média das proteases alcalinas totais do neon gobi *Elacatinus figaro* (Média \pm DP; n= 3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão)..... 39

Figura 6 – Atividade específica das proteases alcalinas totais em neons gobi (*Elacatinus figaro*) de 41 DAE (Média \pm DP; n= 10) nas larviculturas com início de oferta de Artemia em 12 e 18 DAE (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05)..... 42

Figura 7 – Crescimento (aos 41 DAE) em peso úmido médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP; n= 10) nas larviculturas com início de oferta de Artemia aos 12 e 18 DAE (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) 42

Figura 8 –Dia de início e fim da metamorfose do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP; n= 10) nas larviculturas com início

de oferta de Artemia aos 12 e 18 DAE (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$)43

ANEXO

Anexo 1 – Estágios de desenvolvimento do neon gobi (*E. figaro*): A – com 3 DAE; B – com 22 DAE; C – com 41 DAE e D – com 180 DAE63

LISTA DE TABELAS

Artigo científico: Proteases alcalinas e manejo alimentar na larvicultura do neon gobi (*Elacatinus figaro*)

Tabela 1 – Composição centesimal das rações utilizadas durante a larvicultura do neon gobi *E. figaro* 30

Tabela 2 -Relação dos alimentos oferecidos em cada uma das idades de amostragem do neon gobi (*E. figaro*)..... 31

Tabela 3 – Quantidade de animais utilizados (*E. figaro*), por réplica, em cada uma das idades de amostragem 32

Tabela 4– Revisão da atividade específica de proteases alcalinas de espécies com diferentes hábitos alimentares 40

Tabela 5 -Diferença entre as atividades enzimáticas do neon gobi com 3 e 22 DAE e seus respectivos alimentos vivos: rotífero e *Artemia*..... 41

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
ARTIGO CIENTÍFICO: PROTEASES ALCALINAS E MANEJO ALIMENTAR NA LARVICULTURA DO NEON GOBI (<i>Elacatinus figaro</i>)	25
1.Introdução	26
2.Materiais e métodos	28
2.1.Origem do material biológico e condições de manutenção dos reprodutores.....	30
2.2.Desenho experimental.....	29
2.2.1.Experimento 1 – Quantificação das proteases alcalinas durante o desenvolvimento do neon gobi (<i>Elacatinus figaro</i>)	29
2.2.2.Experimento 2 – Antecipação da oferta de náuplios de Artemia no protocolo de alimentação na larvicultura do neon gobi <i>Elacatinus figaro</i> e sua influência no crescimento e produção de proteases digestiva	32
3.Resultados	37
4.Discussão	43
5.Conclusão	48
6.Referências bibliográficas	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	56
ANEXO	63

INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura ornamental

O setor de peixes ornamentais é uma componente global do mercado internacional da aquicultura. Desde 1985, o valor do comércio internacional de exportação de ornamentais tem aumentado a uma taxa de cerca de 14% ao ano, contribuindo com o crescimento econômico dos países envolvidos (FAO, 2005). Além do mais, com o declínio da produção proveniente da pesca, aumenta-se a procura por outros meios de se beneficiar da biodiversidade aquática (FAO, 2005).

O comércio de organismos aquáticos ornamentais, paralelamente aos equipamentos e acessórios associados à esse mercado, tornou-se uma indústria multibilionária (MOORHEAD; ZENG, 2010). Embora seja uma atividade bastante antiga, o comércio de peixes ornamentais em escala global teve início na década de 1930, no Sri Lanka. Em 1950, com a inovação tecnológica da aviação comercial, em virtude da Segunda Guerra Mundial, houve uma expansão desse mercado, ganhando maior reconhecimento e importância comercial (WOOD, 1985).

De cerca de 1500 a 1600 espécies de peixes ornamentais comumente comercializadas, aproximadamente metade é marinha (OLIVIER, 2003; WITTINGTON; CHONG, 2007). Os peixes marinhos diferem evidentemente daqueles de água doce quanto ao volume e valor dos espécimes vendidos, onde em termos de volume as espécies marinhas compõem menos de 10% do total comercializado, entretanto, devido ao seu alto valor unitário, a proporção é maior quando estimada em percentagem do valor total comercializado mundialmente (MOORHEAD; ZENG, 2010).

Outra grande diferença entre os peixes ornamentais marinhos e de água doce é a sua procedência. Ao contrário dos de água doce, que são em sua maioria provenientes da aquicultura (cerca de 90%), estima-se que entre 90 à 99% das espécies marinhas sejam coletadas diretamente do ambiente natural (CALADO, 2006; OLIVIER, 2003; TISSOT; HALLACHER, 2003). Entretanto, vêm-se realizando esforços para criar e domesticar muitas das espécies marinhas de alto valor (FAO, 2005).

A indústria ornamental em sua maioria depende fortemente da exportação e importação de espécies introduzidas, levando órgãos ambientais a investirem em educação direcionada ao manejo apropriado desses recursos a fim de evitar riscos ambientais causados por

introdução de espécies não nativas (FAO, 2005). Portanto, investir na aquicultura de espécies ornamentais autóctones pode ser uma alternativa de usufruir da exploração sustentável dos recursos aquáticos com segurança.

A situação da aquicultura ornamental no Brasil

O Brasil é um país reconhecido pela riqueza de sua biodiversidade que engloba espécies com uma variedade imensa de formas e cores chamativas, bastante atrativas ao comércio de organismos para fins ornamentais e à aquariofilia. No ambiente marinho destacam-se as espécies recifais e estuarinas, principalmente os peixes, que têm sido cobiçados por esse mercado (SAMPAIO; NOTTINGHAM, 2008). A captura de peixes marinhos para esse fim surgiu no país no final dos anos 70, e na década seguinte observou-se um crescimento acentuado desta atividade que continua até hoje (IBAMA, 2003).

No Brasil, a situação da atividade é preocupante, pois todos os peixes marinhos nativos utilizados para a aquariofilia são capturados na natureza (NOTTINGHAM et al., 2000). Além disso, a maioria dos peixes capturados é jovem, e, portanto, ainda não atingiram a maturidade sexual ou período de recrutamento, o que pode comprometer a manutenção dos estoques (BARRETO, 2002). O país é um reconhecido exportador de peixes ornamentais, tendo exportado entre os anos de 2005 e 2008, segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), uma média anual de 30 milhões de exemplares, gerando mais de 5 milhões de dólares anuais para o Brasil (PINHEIRO, 2008).

O ordenamento da exploração de peixes ornamentais marinhos no Brasil conta com uma lista de 136 espécies que são permitidas à captura e ao comércio, com cotas anuais de exportação por empresa; e espécies raras e endêmicas das ilhas oceânicas vedadas de exploração (PINHEIRO, 2008).

O neon gobi

Por permanecer por mais de 20 anos no mercado de peixes ornamentais, observou-se uma queda nos estoques naturais do neon gobi (*Elacatinus figaro*) no ano de 2004, e por este motivo a espécie veio a ser incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção, estando,

portanto, proibidos a sua captura e o seu comércio (GASPARINI et al., 2004).

O neon gobi é um pequeno peixe endêmico da costa brasileira, ocorrendo do Ceará até Santa Catarina (CARVALHO-FILHO, 1999). A espécie, assim como a maioria dos gobídeos, apresenta interesse para o mercado da aquariorfilia, especialmente pelo seu pequeno tamanho, coloração, agilidade e comportamento ativo, sendo resistente e de fácil adaptação ao cativeiro (SAZIMA et al., 1999). Além disso, representa um importante papel nos ambientes de recifes, atuando como uma espécie limpadora, comportamento simbiótico de limpeza de peixes e invertebrados (SAZIMA et al., 1996).

De acordo com Gasparini et al. (2005), entre as espécies recifais, o neon gobi foi a 6ª mais exportada pelo Brasil, e a 1ª mais exportada pelo estado da Bahia entre os anos de 1999 e 2001. O estado possui uma grande representação na exploração destas espécies, sendo um dos pioneiros na extração de organismos marinhos para fins ornamentais no país. Segundo Sampaio; Rosa (2003), em tal local, a atividade de coleta do neon se caracteriza por apresentar equipamentos e locais de capturas próprios para a espécie, onde apesar de serem realizadas com auxílio de embarcações, as profundidades de coleta não são superiores a 4 metros; são realizadas em recifes de corais dominados por *Montastrea cavernosa*, que tipicamente concentra grandes cardumes desse pequeno peixe; são comumente capturados através de sacos plásticos transparentes, arrastados no substrato em que se encontram e forçados a entrar por um segundo mergulhador. Por apresentarem íntimas associações com recifes de corais, o atrito do saco plástico e o apoio das mãos dos coletores sobre as colônias promovem um impacto sobre os tecidos desses organismos.

Complementarmente, coletas contínuas de peixes limpadores, como observado no Brasil, podem causar um desequilíbrio nas associações interespecíficas recifais, onde, por exemplo, a baixa ocorrência do neon gobi pode diminuir a biodiversidade nos locais de captura dessa espécie, uma vez que os peixes que se beneficiam da limpeza passarão a não mais frequentar o local (GRUTTER et al., 2003).

A aquicultura de peixes ornamentais marinhos poderia representar uma importante ferramenta a ser utilizada para ajudar na conservação das espécies e no desenvolvimento sustentável do aquarismo marinho (CORTÊS, 2009).

Estudos com o neon gobi já foram realizados focando em diversas áreas do seu cultivo e biologia: descrição da biologia

reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval da espécie (MEIRELLES et al., 2009; SHEI, 2008), produção de juvenis (SHEI et al., 2011), produção e utilização de diferentes fontes de alimento vivo na fase inicial de larvicultura (CÔRTEZ, 2009), aspectos reprodutivos em animais selvagens e de cultivo e aspectos de sanidade da espécie (TAKEUTI, 2009) e interação de limpeza em cultivo (SOUZA, 2010) e na natureza (CAMPOS; SÁ-OLIVEIRA, 2011; SAZIMA, et al., 2000). Através das informações obtidas a partir desses trabalhos, atualmente, já se consegue executar todo o ciclo reprodutivo do neon gobi, além das etapas essenciais de cultivo como larvicultura e engorda de juvenis. Entretanto, ainda há a necessidade da compreensão das capacidades nutricionais durante as diferentes fases de vida da espécie.

Desenvolvimento e potencial nutricional

A produção intensiva do neon gobi em cativeiro pode ser uma das medidas para minimizar a pressão sobre os estoques naturais. Contudo, atualmente, desenvolver um protocolo para aquicultura ornamental oferece inúmeros desafios relacionados com processos de produção (AVELLA et al., 2007), o que torna o número de espécies marinhas que podem ser economicamente produzidas em cativeiro extremamente limitado. O futuro da piscicultura ornamental depende da habilidade de produzir ovos seguramente, manter um grande número de larvas, transferi-las para juvenis e produzir reprodutores (HOLT, 2003).

Os primeiros estágios de vida permanecem como a fase crítica na produção da maioria dos ornamentais marinhos (CÔRTEZ, 2009), encontrando-se entre as questões prioritárias o conhecimento de suas exigências nutricionais e qual o manejo alimentar é o mais adequado para o seu crescimento (PEZZATO, 1997).

Ainda que já se produzam grandes quantidades de larvas de muitas espécies de peixes, as taxas de sobrevivência são muitas vezes baixas ou variáveis. Existem problemas de qualidade (por exemplo: deformações no esqueleto, anomalias de pigmentação) e o potencial de crescimento nem sempre é aproveitado ao máximo (CONCEIÇÃO et al., 2009). Estes problemas são causados, pelo menos em parte, por deficiências nutricionais, pois mesmo para as espécies melhor estudadas existem ainda muitas lacunas acerca das necessidades e capacidades nutricionais das larvas de peixes (BELL et al., 2003, CAHU et al., 2003; TAKEUCHI, 2001).

Para entender as capacidades nutricionais nas várias fases do ciclo produtivo deve-se conhecer o desenvolvimento dos sistemas

envolvidos na digestão, na absorção e no aproveitamento dos nutrientes em cada uma destas fases (ZIMMERMANN; JOST, 1998). Os primeiros estágios de vidas de um peixe são caracterizados por processos de diferenciação funcional e morfológica que incluem modificações nos órgãos dos sentidos, no sistema respiratório e enzimático, bem como na fisiologia digestiva, levando a mudanças na exigência de nutrientes (SEGNER et al., 1993, BROMAGE; ROBERTS, 2001).

Enzimas digestivas

As enzimas são proteínas globulares, que agem como catalisadores biológicos, portanto, aumentam a velocidade das reações químicas no organismo (NELSON; COX, 2011).

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

A proteína é o nutriente que se apresenta em maior quantidade em dietas para larvas de peixe, e, portanto, um grande número de estudos tem sido orientado para a caracterização da atividade enzimática das proteases (FERNANDEZ et al., 2000; HOFER, 1981). Análises das atividades de proteases em larvas de várias espécies de peixes já foram realizadas com intuito de desenvolver uma dieta efetiva para cultivo intensivo (ALVAREZ-GONZÁLEZ et al., 2008, CHONG et al., 2002, ENGROLA et al., 2009, HANZA et al., 2009, SHAN et al., 2008).

Proteínas são grandes complexos moleculares constituídas de vários aminoácidos que são componentes essenciais na estrutura e funcionamento de todos os seres vivos. Os peixes ornamentais de cativeiro precisam utilizar a proteína das dietas com a maior eficiência possível uma vez que um dos produtos do seu catabolismo (principalmente a amônia) vão diretamente poluir o seu ambiente

(SALES; JANSSENS, 2003). Glass et al. (1989) afirmaram que entender as propriedades, as funções e as condições ótimas para a hidrólise de proteínas através das proteases digestivas em peixes permite uma quantificação mais precisa da digestibilidade destas por uma espécie em particular. Além disso, o grau de digestibilidade dos nutrientes que compõem a dieta de espécies ornamentais ainda não é bem estabelecida. A determinação desses valores não apenas resultaria em uma formulação de dieta com menor custo, mas também seria uma valiosa ferramenta para reduzir a poluição do ambiente de cultivo (SALES; JANSSENS, 2003).

As proteases são classificadas em endopeptidases (proteínases) e exopeptidases, dependendo do sítio de ação. Quando a hidrólise ocorre nas ligações peptídicas localizadas no centro da cadeia polipeptídica, as proteases são do tipo proteínases, e quando atuam nas ligações peptídicas de resíduos de aminoácidos terminais (extremidades N-terminais e C-terminais) são do tipo exopeptidases (GARCIA-CARREÑO; NAVARRETE, 1997). Por outro lado, as proteases digestivas da fauna marinha também podem ser classificadas de acordo com sua sensibilidade ao pH (ácido, neutro ou alcalino), mesmo critério utilizado para outros animais, plantas ou microorganismos (GARCÍA-CARREÑO et al., 2002).

Em peixes, na primeira alimentação, o sistema digestório nem sempre é totalmente funcional. Na maioria das espécies marinhas, antes de formação do esfíncter pilórico, a válvula intestino-retal é a única constrição ao longo do tubo digestivo antes da abertura anal. Sem um estômago, a digestão do alimento ingerido ocorre no intestino larval, onde o pH se mantém alcalino e a atividade proteolítica é realizada principalmente por proteases alcalinas (WALFORD; LAM, 1993). As proteases alcalinas mais importantes, principalmente a tripsina e a quimotripsina, são sintetizadas pelo pâncreas e as aminopeptidases pelo intestino (CARA et al., 2002; ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 2007).

Alimento vivo e as enzimas digestivas

Alguns autores afirmam que as larvas podem aproveitar as enzimas digestivas do próprio alimento vivo, o que facilitaria os processos de digestão na larva até seu sistema digestório estar totalmente desenvolvido, diferenciado e funcional (LAUFF; HOFER, 1984, GALVÃO et al., 1997). Por outro lado, outros autores constataam que a contribuição das enzimas digestivas provenientes do alimento vivo pouco influenciam no aproveitamento do alimento (SEGENER et al.,

1993; KIM et al., 2001, CARA et al., 2002), o que torna necessário o estudo das enzimas digestivas do alimento vivo utilizado na larvicultura em paralelo com as das larvas em cultivo (DABROWSKI, 1984).

Já se sabe que as larvas de peixes marinhos iniciam a alimentação exógena quando seu sistema digestório ainda encontra-se em um estágio rudimentar de desenvolvimento (GUERREIRO et al., 2010). Nos protocolos alimentares de rotina comumente utilizados nas larviculturas de peixes marinhos, o rotífero é o primeiro alimento, seguido de *Artemia* (NAZ, 2008). Ao contrário do ambiente natural, na piscicultura marinha, a oferta de presas às larvas de peixes é limitada, sendo que um dos principais entraves encontrados na larvicultura consiste em oferecer um alimento vivo de tamanho apropriado, e, ao mesmo tempo, que supra a demanda nutricional nesses primeiros estágios de vida (CAHU; ZAMBONINO INFANTE, 2001).

Uma vez que o alimento é a principal fonte de energia e nutrientes para o crescimento e desenvolvimento larval, o protocolo alimentar tem forte influência sobre o desenvolvimento, capacidade digestiva e de assimilação das larvas de peixes (GUERREIRO et al., 2010). Segundo Côrtes (2009), a oferta antecipada de um alimento vivo, como a *Artemia*, inadequado, ou mais adequado, pode alterar a digestão e o aproveitamento alimentar, afetando a sobrevivência e o crescimento larval. Porém, se tal resultado é obtido devido à contribuição de enzimas digestivas exógenas provenientes desse alimento vivo é uma incógnita. Portanto, um método de confirmar precisamente tal contribuição seria observar o perfil da atividade das enzimas digestivas das larvas frente aos diferentes dias de início de oferta do alimento vivo (LEE et al., 1984, DABROWSKI, 1989; VEGA-VILLASANTE et al., 1995).

A contribuição de enzimas digestivas exógenas, provenientes do alimento vivo, poderia ser proveitosa do ponto de vista econômico onde, além de suprir as demandas nutricionais das larvas de peixes, o alimento vivo estaria aumentando o aproveitamento alimentar através do incremento da digestão realizada por enzimas digestivas adicionais.

Sendo assim, o presente estudo visa quantificar a atividade das proteases alcalinas totais do trato digestório do neon gobi *Elacatinus figaro* em diferentes idades e dietas que compõem o protocolo alimentar da espécie, bem como a quantificação da atividade dessas enzimas nos alimentos vivos oferecidos na larvicultura.

Adicionalmente, a fim de avaliar a contribuição dessas enzimas digestivas exógenas para as larvas de neon gobi, o presente estudo modificou o protocolo alimentar comumente utilizado na larvicultura da

espécie, antecipando a oferta de Artemia, e avaliou a atividade das proteases alcalinas totais dos animais cultivados nesses diferentes protocolos, bem como o crescimento e idade de início e fim da metamorfose.

O presente artigo será submetido à revista *Aquaculture Research* e está formatado conforme as normas da revista.

PROTEASES ALCALINAS E MANEJO ALIMENTAR NA LARVICULTURA DO NEON GOBI (*Elacatinus figaro*)

Maria Fernanda da Silva Souza*, Juliet Kiyoko Sugai**, Mônica Yumi Tsuzuki

*Laboratório de Piscicultura Marinha II, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, **Laboratório de Enzimologia Aplicada, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, Florianópolis, SC, 88040-970, Brasil. *nana.ssouza@hotmail.com*

Resumo

Endêmico da costa brasileira, o neon gobi (*Elacatinus figaro*) é um peixe que apresenta interesse para a o mercado ornamental pelo seu pequeno tamanho e fácil adaptação em cativeiro. Devido à captura excessiva, encontra-se inserido na lista de espécies ameaçadas de extinção. Com intuito de incrementar a produção intensiva do neon gobi, e compreender melhor os aspectos nutricionais, o presente estudo buscou compreender o potencial digestório da espécie através da determinação das proteases alcalinas totais. A atividade enzimática foi medida em peixes com 3, 22, 41 e 180 DAE, através da hidrólise da azocaseína. As proteases alcalinas da Artemia e rotífero foram determinadas para avaliar possíveis contribuições de enzima exógenas. Além disso, o protocolo alimentar comumente utilizado na larvicultura da espécie foi modificado, realizando-se um novo protocolo antecipando-se a oferta de Artemia em 6 duas em relação ao protocolo alimentar comumente usado, onde a atividade enzimática, o crescimento e a metamorfose das larvas foram avaliados em ambos os protocolos. A atividade das proteases alcalinas foi semelhante durante a larvicultura da espécie, com um aumento evidente apenas na fase adulta (180 DAE), onde a contribuição de enzimas digestivas exógena 2% do rotífero e 67,9 % da Artemia. A antecipação do fornecimento da Artemia demonstrou incrementar o crescimento e antecipar a metamorfose das larvas, porém a atividade enzimática das proteases alcalinas foi menor nesse protocolo do que o comumente utilizado, demonstrando-se benéfica do ponto de vista produtivo uma vez que alcançou o tamanho comercial mais cedo, e permaneceu menos tempo dependente da alimentação com a Artemia, o que reduz os custos de produção.

Palavras-chave:enzima digestiva; protease; ornamental; gobídeo; Artemia, manejo alimentar

Abstract

Endemic to brazilian coast, barber goby (*Elacatinus figaro*) is an ornamental trade interest species owing to its small size and easy adaptation to captivity. It is included to the threatened species list due to overfishing, being the exploitation prohibited. Aiming to contribute with the intensive production of the species, the actual study focused on understanding barber goby's digestive capacity through total alkaline proteases determination. The enzymatic activity was measured in fishes with 3, 22, 41 and 180 days after hatch (DAH), through azocasein hydrolysis. Total alkaline protease of Artemia and rotifer was also determined to evaluate possible exogenous contributions. Furthermore, the feeding protocol commonly used in the species larviculture was modified by anticipating Artemia offer and comparing with the feeding protocol commonly used, where the enzymatic activity, the growth and metamorphosis in the juveniles were evaluated, intending to confirm exogenous digestive contribution on barber goby of 41 DAH. Alkaline proteases activities were similar during the three first stages (3, 22 and 42 DAH), with a clear increase in the adult phase. The exogenous contribution from digestive enzymes from rotifer was near 2% and from Artemia, 67,9 %. The Artemia offer anticipation increased growth and anticipated metamorphosis on neon goby juveniles, however, the protease alkaline activity was lower is this protocol than in that commonly used. However, it demonstrated to be profitable since it reached the commercial size earlier and become a shorter period depending on Artemia feeding, which reduces the production costs.

Keywords: digestive enzyme; protease; ornamental; gobidae; Artemia feeding protocol

1. Introdução

O peixe ornamental marinho neon gobi (*Elacatinus figaro*), é um pequeno peixe endêmico da costa brasileira, ocorrendo do Ceará até Santa Catarina (Carvalho-Filho, 1999), que se encontra incluído na lista de espécies ameaçadas de extinção, estando, portanto, proibidos a sua captura e o seu comércio pelo Ministério do Meio Ambiente (Instrução Normativa Número 5 de 21 de maio de 2004) (Gasparini *et al.*, 2005). A

espécie, assim como a maioria dos gobídeos, apresenta interesse para o mercado da aquariorfilia, especialmente pelo seu pequeno tamanho, coloração, agilidade e comportamento ativo, sendo resistente e de fácil adaptação ao cativeiro (Sazima, Moura & Sazima, 1999), além de representar um importante papel nos ambientes de recifes, atuando como uma espécie limpadora (Sazima Moura; Rosa, 1996).

A produção intensiva do neon gobi em cativeiro pode ser uma das medidas para minimizar a pressão sobre os estoques naturais, e entre as dificuldades de sua produção encontra-se entre as questões prioritárias o conhecimento das exigências nutricionais e qual o manejo alimentar é o mais adequado para a espécie (Pezzato, 1997, Avella, Olivotto, Gioacchini, Maradonna & Carnevali, 2007).

Através da identificação das enzimas digestivas e quantificação de suas atividades relativas e mudanças durante a ontogênese, podem-se obter informações valiosas sobre o estado nutricional da larva. Os dados obtidos também podem ser relevantes para estabelecer o momento mais adequado para realizar a transição alimentar, além de auxiliar na adequada escolha de ingredientes e no desenvolvimento de estratégias alimentares apropriadas, baseadas na capacidade digestiva do peixe (Kuz'mina, 1996; Galvão, Yamanaka, Fenerich-Verani & Pimentel, 1997; Fernández, Moyano & Díaz, 2001; Cara, Moyano, Cardenas, Fernandez –Díaz & Yúfera, 2002).

A proteína é o nutriente que se apresenta em maior quantidade em dietas para larvas, e, portanto, um grande número de estudos tem sido orientado para a caracterização da atividade enzimática das proteases (Hofer, 1981; Fernandez *et al.*, 2001). Nas primeiras fases de vida, sem um estômago, a digestão do alimento ingerido ocorre no intestino larval, onde o pH se mantém alcalino e a atividade proteolítica é realizada principalmente por proteases alcalinas (Walford & Lam, 1993).

Alguns autores afirmam que as larvas podem aproveitar as enzimas do próprio alimento vivo, o que facilitariam os processos de digestão na larva até seu sistema digestório estar totalmente desenvolvido e diferenciado (Lauff & Hofer, 1984, Galvão *et al.*, 1997), tornando importante o estudo da atividade das enzimas digestivas do alimento utilizado na larvicultura em paralelo com as das larvas em cultivo (Dabrowski, 1989).

Uma vez que o alimento é a fonte de energia e nutrientes para o crescimento e desenvolvimento larval, o protocolo alimentar tem forte influência sobre o desenvolvimento, potencial digestivo e de assimilação das larvas de peixes (Guerreiro, Vareilles, Pousão-Ferreira, Rodrigues,

Dinis, & Ribeiro, 2010). Segundo Côrtes & Tsuzuki (2009), a oferta antecipada de um alimento vivo inadequado, ou mais adequado, pode alterar a digestão e o aproveitamento alimentar, afetando a sobrevivência e o crescimento larval.

Sendo assim, o presente estudo visou quantificar a atividade das proteases alcalinas totais do trato digestório no decorrer do desenvolvimento do neon gobi *Elacatinus figaro*, em cultivo, em relação às diferentes dietas que compõem o protocolo alimentar da espécie. Em um segundo experimento, o protocolo alimentar comumente utilizado na larvicultura da espécie foi modificado, com a antecipação da oferta de *Artemia* e avaliou-se a atividade das proteases alcalinas totais dos juvenis nesses diferentes protocolos, bem como o crescimento e idade de início e fim da metamorfose.

2. Materiais e métodos

2.1 Origem do material biológico e condições de manutenção dos reprodutores

As etapas de reprodução, larvicultura e engorda foram realizadas no Laboratório de Piscicultura Marinha II (LAPMAR II) da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram utilizados dois casais de reprodutores selvagens, originários do estado do Espírito Santo e capturados com a autorização para atividades com finalidade científica do SISBIO/ICMBio (Número: 22051-2, Data da Emissão: 10/08/2010).

O manejo dos reprodutores foi realizado de acordo com o descrito por Meirelles, Tsuzuki, Ribeiro, Medeiros & Diniz (2009), onde estes foram mantidos em tanques-redes (um casal por tanque-rede) dispostos em um tanque preto de fibra de vidro retangular com volume de 1000 L, em sistema de recirculação de água (com sistema de filtro UV, “skimmer”, filtro biológico composto por substratos de rocha viva e areação moderada) com renovação diária de cerca de cinco vezes o volume do tanque. A temperatura ($26 \pm 2^\circ \text{C}$; Média \pm Desvio padrão) foi controlada com auxílio de termostato-aquecedores, monitorada diariamente com termômetro de mercúrio, assim como a salinidade ($28 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$), medida com um refratômetro óptico (INSTRUTHERM, Brasil), precisão de 1 g L^{-1} . O pH da água foi registrado semanalmente, através de um kit comercial Test Lab Marine Aquarium (RED SEA, França) ($7,9 \pm 0,2$), assim como a amônia ($0,03 \pm 0,06 \text{ ppm}$), através de um kit comercial Amônia Tóxica (Labcon Test, Brasil). O fotoperíodo foi ajustado de forma a simular a estação do verão, com 14 horas luz e

10 horas de escuro, controlado com um timer analógico e com intensidade luminosa de 2.343 lux.

Os reprodutores foram alimentados até saciedade aparente, duas vezes ao dia (pela manhã e a tarde) com uma variada dieta composta de rações comerciais para peixes ornamentais marinhos MarineTetra (TETRA, Alemanha) e TetraVeggie (TETRA, Alemanha), ração para reprodutores Nrd (INVE Technologies, Bélgica), Artemia sp. enriquecida com emulsões comerciais de ácidos graxos, além de moluscos bivalves, lula, peixes frescos picados e camarão marinho. A sifonagem do fundo dos tanques foi realizada diariamente, após as alimentações.

A checagem das desovas de cada casal, através da observação do cano de PVC utilizado como substrato para desova em cada tanque-rede, foi feita diariamente, e assim foi calculado o dia que antecede a eclosão, a fim de transferir os ovos para os tanques de eclosão/larvicultura de 40 litros com as mesmas condições físico-químicas da água dos tanques onde estavam os pais, permitindo assim aos ovos a permanência máxima com estes, que exercem importante cuidado parental.

2.2 Desenho experimental

2.2.1 Experimento 1 – Quantificação das proteases alcalinas durante o desenvolvimento do neon gobi *Elacatinus figaro*

Nesse experimento, o protocolo alimentar dos animais de *E. figaro* foi realizado com base no descrito por Côrtes & Suzuki (2009) e Meirelles *et al.* (2009). Após a eclosão, as larvas foram mantidas em aquários previamente povoados com a microalga *Nannochloropsis oculata* na concentração de $0,5 - 1,0 \times 10^6$ células mL⁻¹ de água para alimentação dos rotíferos. As trocas parciais de água foram realizadas diariamente, com a retirada de aproximadamente 10% do volume do tanque, repostas com microalga. As laterais dos aquários foram cobertas com plástico preto para reduzir a incidência de luz. O fotoperíodo mantido nos tanques de larvicultura foi de 24 horas de luz durante as duas primeiras semanas e depois 12 horas de luz e 12 h de escuro, com intensidade luminosa em média de 461 lux.

Como primeira alimentação foi utilizada o rotífero *Brachionus rotundiformis*, na concentração de 20 indivíduos mL⁻¹ até o 25º DAE (Dia Após a Eclosão). A partir do 18º dia a alimentação da larva deixou de ser unicamente com rotíferos e passou a ser adicionado também náuplios e metanáuplios de Artemia. Sendo assim, entre o 18º e 21º

DAE, náuplios de *Artemia* não enriquecidos foram oferecidos na concentração de 0,5 indivíduos mL⁻¹, uma vez o dia, e durante o 21º e 29º DAE foram fornecidos, às larvas, náuplios de *Artemia* não enriquecidos e metanáuplios enriquecidos (razão de 1:1) na concentração de 1 indivíduo mL⁻¹ cada, sendo os metanáuplios fornecidos duas vezes ao dia. Após o 29º DAE até o 34º DAE foram ministrados apenas metanáuplios de *Artemia* enriquecidos, duas vezes ao dia. O desmame (transição da alimentação do alimento vivo para o inerte) teve início no dia em que se observou a primeira larva sofrer metamorfose, com o início da oferta da ração para desmame (Tabela 1) juntamente com metanáuplios de *Artemia*, duas vezes ao dia; e por fim unicamente ração para desmame, quando todas as larvas estivessem metamorfoseadas. Aos 90 DAE, a ração de desmame foi substituída por uma ração de engorda (Tabela1).

Foram utilizados rotíferos *Brachionus rotundiformis* (comprimento de lórica médio na faixa de 100 a 180 µm) e náuplios e metanáuplios de *Artemia*, conforme descrito por Meirelles *et al.* (2009). Os rotíferos foram cultivados à salinidade de 25 gL⁻¹ e a 26º C com microalga *Nannochloropsis oculata* (10⁴ a 15⁴ células de microalga por indivíduo).

Náuplios de *Artemia* provenientes de cistos (INVE Technologies, Bélgica) foram incubados, a 29 °C e à salinidade de 35 g L⁻¹. Os metanáuplios de *Artemia* foram mantidos nas mesmas condições, porém, após a eclosão, foram enriquecidos com ácido docosaexaenoico (DHA) Selco (INVE Technologies, Bélgica), 24 horas antes do fornecimento às larvas, a fim de aumentar a disponibilidade de ácido graxo.

Tabela 1 – Composição centesimal das rações utilizadas durante a larvicultura do neon gobi *E. figaro*

Composição (%)	Ração de desmame ^a	Ração de engorda ^b
Proteína	52	55
Lípido	12	9
Cinzas	15	19
Cálcio	2	0
Fibra	0	1,9
Fósforo	2	0

(a) Otohime TDO-A (REED MARICULTURE, Estados Unidos) – Grânulos, 250 µm; (b) NRD(INVE Technologies, Bélgica) – 500 - 800 µm).

2.2.1.1 Amostragem dos animais

Os neons gobi foram amostrados pela manhã, em jejum por 18 horas, antes da primeira alimentação do dia, em diferentes idades, cada qual correspondendo a um tipo de alimentação oferecido, conforme a tabela 2. Anteriormente à amostragem, o comportamento de natação e morfologia (coloração; formação de estruturas como olhos, boca e nadadeiras; tamanho da bexiga natatória) dos animais foram registrados, em suas respectivas idades.

Tabela 2 -Relação dos alimentos oferecidos em cada uma das idades de amostragem do neon gobi (*E. figaro*).

Idade (DAE)	Dieta
3	Rotífero
22	Artemia
41	Ração de desmame
180	Ração de engorda

Em cada idade amostral, os peixes foram capturados e imediatamente imersos em água com gelo, onde estes foram sacrificados através de choque térmico. Em seguida, foram secos com uma toalha de papel, medidos com auxílio de um paquímetro (precisão de 1 mm) e pesados em balança analítica (precisão de 0,00001 g). Por fim, foram devidamente acondicionados em papel alumínio, etiquetados e armazenados no congelador a - 18 °C para determinação da atividade enzimática das proteases alcalinas totais (descrita no item 2.2.3).

Cada amostra por idade foi composta por triplicatas (amostras de três unidades experimentais, ou seja, três aquários), onde o número de animais amostrados em cada réplica variou conforme a idade de amostragem, sendo determinado de acordo com o tamanho do animal, conforme a tabela 3. A densidade inicial foi de aproximadamente 100 larvas por aquário.

Para a obtenção dos homogenatos para as determinações enzimáticas, as larvas de 3 e 22 DAE foram utilizadas inteiras devido ao seu pequeno tamanho. Já nos animais com 41 DAE, desprezou-se a cauda e a cabeça, enquanto os animais com 180 DAE foram individualmente dissecados sobre o gelo, retirando-se o trato digestório.

Tabela 3 – Quantidade de animais utilizados (*E. figaro*), por réplica, em cada uma das idades de amostragem.

Idade (DAE)	Peso (g) úmido médio individual	Número de animais por réplica
3	0,001 ± 0,0007	100
22	0,005 ± 0,0005	20
41	0,023 ± 0,0004	10
180	0,395 ± 0,1358	3

Para quantificação da atividade das proteases alcalinas totais nos alimentos vivos oferecidos na larvicultura do neon gobi, amostras de quantidades conhecidas de rotífero e *Artemia* foram coletadas, separadamente, segundo o protocolo descrito por Gawlicka, Parent, Horn, Ross, Opstad & Torrissen (2000), e sifonadas sobre uma malha de 60 e 80 µm, respectivamente. A malha com a amostra foi imediatamente submersa em água com gelo, e seca, pelo lado externo à malha, com auxílio de um papel toalha, a fim de absorver o máximo do líquido. Por fim, o conteúdo retido foi homogeneamente dividido em três partes (100 000 náuplios de *Artemia* por réplica e 715 000 rotíferos por réplica) armazenadas para posterior determinação enzimática, citada posteriormente no item 2.2.3.

2.2.2 Experimento 2 – Antecipação da oferta de náuplios de *Artemia* no protocolo de alimentação na larvicultura do neon gobi *Elacatinus figaro* e sua influência no crescimento e na atividade de proteases digestivas dos juvenis.

Nesse experimento, foram realizados dois tratamentos compostos por dois diferentes protocolos alimentares aplicados na larvicultura do neon gobi. Para cada protocolo alimentar, foram realizados três aquários de larviculturas, com densidades iniciais de aproximadamente 100 larvas:

- **Protocolo alimentar A** (início de oferta de *Artemia* no 12º DAE), proposto por Cortês & Tsuzuki (2009): Como primeira alimentação foi utilizado o rotífero *Brachionus rotundiformis*, na concentração de 20 indivíduos mL⁻¹ até o 19º DAE. A partir do 12º DAE a alimentação da larva deixou de ser unicamente com rotíferos e passaram a serem adicionados também náuplios e metanáuplios de

Artemia. Sendo assim, entre o 12º e 15º DAE náuplios de Artemia não enriquecidos foram oferecidos na concentração de 0,5 indivíduos mL⁻¹, uma vez o dia, e durante o 15º e 23º DAE foram fornecidos às larvas náuplios de Artemia não enriquecidos e metanáuplios enriquecidos (1:1) na concentração de 1 indivíduo mL⁻¹ cada, sendo os metanáuplios fornecidos duas vezes ao dia. Após o 23º DAE até o dia 28 DAE foram ministrados metanáuplios de Artemia enriquecidos. O desmame teve início no dia em que foi observado a primeira larva a sofrer metamorfose, com a oferta paralela de ração para desmame (Otohime Tdo-a 250 µm, REED MARICULTURE, Estados Unidos) e Artemia, duas vezes ao dia; e por fim, unicamente, ração, quando todas as larvas estivessem metamorfosecadas (Fig. 1).

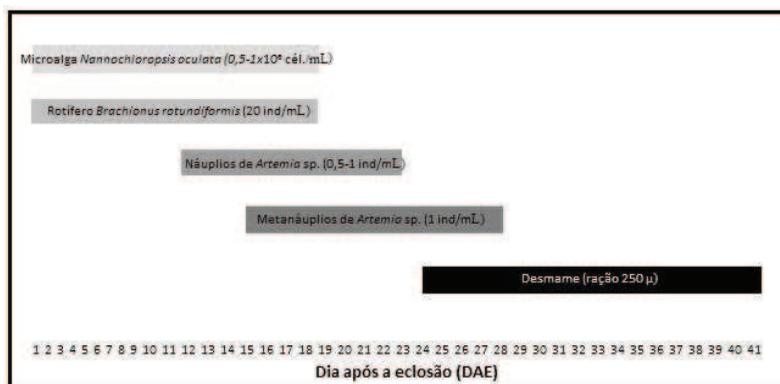


Figura 1 – Protocolo (A) alimentar de neons gobi (*E. figaro*) com oferta de Artemia aos 12 DAE.

- **Protocolo alimentar B** (início da oferta da *Artemia* sp. no 18º DAE): protocolo alimentar comumente utilizado para a espécie (Meirelles *et al.*, 2009), idêntico ao descrito no experimento 1 (Fig. 2).

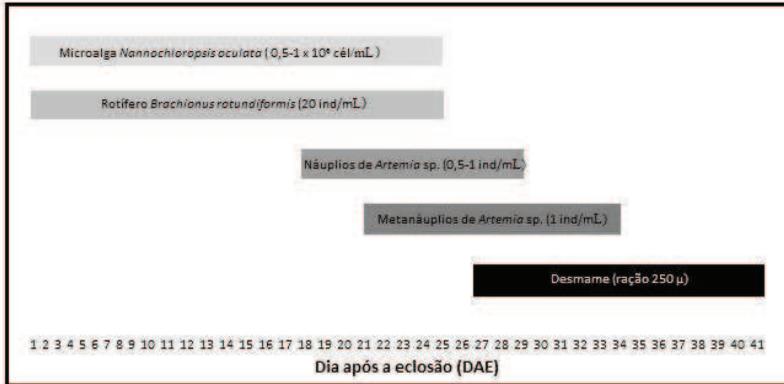


Figura 2 – Protocolo (B) alimentar de neons goby (*E. figaro*) com oferta de *Artemia* aos 18 DAE.

A temperatura ($26 \pm 2^\circ \text{C}$) foi controlada com auxílio de termostato-aquecedores, monitorada diariamente com termômetro de mercúrio, assim como a salinidade ($28 \pm 3 \text{ g L}^{-1}$), medida com um refratômetro óptico (INSTRUTHERM, Brasil), precisão de 1 g L^{-1} . O pH da água foi registrado semanalmente, através de um kit comercial Test Lab Marine Aquarium (RED SEA, França) ($7,9 \pm 0,2$).

2.2.2.1 Amostragem dos animais

Em cada um dos tratamentos, foram coletados 10 juvenis (41 DAE) por unidade experimental, com os quais foram realizadas biometrias e a quantificação das proteases alcalinas totais (conforme descrito para juvenis de 41 DAE no item 2.2.3). As larvas foram coletadas e armazenadas também conforme descrito no experimento anterior (item 2.2.1.1). Para a determinação enzimática, utilizou-se um “pool” destes 10 juvenis de cada unidade experimental para a obtenção de um único homogenato enzimático. Em cada unidade experimental, anotou-se a data de início e término da metamorfose das larvas (larvas assentadas, já pigmentadas).

2.2.3 Determinações enzimáticas

Toda essa etapa foi realizada no laboratório de Enzimologia Aplicada, Departamento de Bioquímica/CCB.

2.2.3.1 Obtenção de extratos enzimáticos

Cada réplica de amostras foi individualmente homogeneizada em água destilada gelada em uma proporção de 1:5, 1:8,5, 1:6 e 1:10 (tecido: líquido extrator, p:v) para animais de 3, 22, 41 e adulto de 180 DAE, respectivamente, e 1:5 e 1:0,5 para rotíferos e *Artemia*, respectivamente, através de um homogeneizador de van Potter durante 2,5 minutos (5 agitações de 30 segundos com intervalos de aproximadamente 5 minutos para resfriamento).

Em seguida, as amostras foram transferidas, cada qual para um tubo eppendorf, e centrifugadas (centrífuga EPPENDORF, Alemanha), a 15.550 x g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram transferidos individualmente para um tubo eppendorf e foram utilizados como extrato enzimático para a quantificação das enzimas digestivas. Durante toda a análise os extratos enzimáticos foram mantidos em banho de gelo e água.

2.2.3.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos foi realizada pelo método de Bradford (1976). As absorbâncias das amostras foram lidas em um espectrofotômetro (FEMTO 600, Brasil) usando albumina de soro bovino (BSA) (SIGMA-ALDRICH, Estados Unidos) como padrão.

2.2.3.1 Quantificação das proteases alcalinas totais

A atividade das proteases alcalinas totais foi medida segundo o método descrito por Garcia-Carreño & Haard (1993), através da hidrólise da azocaseína.

Para a quantificação da atividade enzimática, cada sistema de reação continha 180, 270, 390 e 45 µg de proteína dos extratos enzimáticos obtidos de amostras coletadas em animais com 3, 22, 41 e 180 DAE, respectivamente. O sistema de reação foi incubado por 60, 40, 40 e 20 minutos, à aproximadamente 21 °C. Para a quantificação das proteases alcalinas totais dos alimentos vivos, utilizou-se para o sistema de incubação 230 e 7 800 µg de proteína do homogenato de rotífero e

Artemia, respectivamente, e incubados por 60 e 5 minutos, do rotífero e Artemia, respectivamente.

A reação foi interrompida usando 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% (MERCK, Estados Unidos). Após 5 minutos de repouso em 4 °C, os conteúdos dos sistemas de reações foram centrifugados a 1 100 x g por 5 minutos e lida a absorbância em 366 nm contra branco de água destilada. Para cada quantificação enzimática das amostras foram feitas determinações de um controle, os quais foram subtraídos dos valores dos testes.

A atividade enzimática foi expressa como Unidade de enzima (U) mg proteína⁻¹ ou seja, atividade específica = $[Abs_{366nm} (\text{Teste} - \text{Controle}) \text{ min}^{-1} \text{ mL}^{-1}] \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

Seguindo o método descrito por Applebaum & Holt (2003), para a análise da contribuição da atividade enzimática atribuída ao alimento vivo no trato digestório das larvas, calculou-se o número médio das presas que podem estar presentes no trato digestório de cada larva (97 náuplios de Artemia ou 100 rotíferos em 1 larva de 22 ou 3 DAE, respectivamente). O número de alimento vivo no trato digestório de larvas de neon gobi foi estimado quantificando as presas consumidas na água de cultivo (residual) em um período de 24 horas em uma unidade experimental (em triplicata) dividido pelo número de larvas presentes no aquário (Kotani & Fushimi, 2011).

A atividade específica de proteases alcalinas encontrada em uma larva (3 ou 22 DAE) foi obtida dividindo o valor da atividade específica da protease alcalina por número de larvas presentes nas amostras homogeneizadas para a obtenção dos extratos enzimáticos (21 larvas com 22 DAE amostradas ou 100 larvas com 3 DAE amostradas).

A atividade específica das proteases alcalinas presente nos alimentos vivos (Artemias ou rotíferos) presentes no trato digestório de cada larva foi calculada dividindo o valor da atividade específica da enzima encontrada em cada alimento vivo pelo número desses alimentos vivos amostrados (100.000 náuplios de Artemia e 650.000 Rotíferos) para a obtenção dos extratos enzimáticos, e a seguir, multiplicado pelo número de presas consumidas por uma larva (3 DAE alimentadas com uma média de 100 rotíferos e 22 DAE com 97 náuplios de Artemias).

A porcentagem de contribuição das enzimas digestivas exógenas presentes no trato digestório de uma larva de neon gobi foi expressa, através do cálculo:

% de contribuição da atividade de proteases alcalinas exógenas nas larvas = $(a \cdot 100) \cdot b^{-1}$

Onde: (a) = atividade específica do alimento vivo consumido por uma larva; (b) = atividade específica encontrada em uma larva.

2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância a 5%. Quando presentes, as diferenças estatísticas foram medidas através do teste de Tukey. As análises estatísticas foram processadas através do software BioEstat 5.0. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

3. Resultados

3.1 Experimento 1 – Quantificação das proteases alcalinas durante o desenvolvimento do neon gobi *Elacatinus figaro*

3.1.1 Crescimento

Logo após a eclosão, as larvas de neon gobi já apresentam a boca aberta e saco vitelínico quase completamente reabsorvido, sendo muito ativas e nadando próximas à superfície. O saco vitelínico foi completamente consumido no 3º DAE, onde as larvas apresentaram olhos, boca e trato digestório bem evidentes. No 22º DAE, as larvas já estavam bem desenvolvidas, com nadadeiras subdivididas em dorsal, anal e caudal e melanóforos presentes na região ventral do corpo. Nesse estágio as larvas nadam incessantemente atrás das presas (*Artemia*), dando constantes impulsos para capturá-las. Nota-se o trato digestório constantemente repleto de alimento de cor alaranjada. Com 41 DAE, a bexiga natatória não estava mais presente, e a fase pelágica foi substituída pela bentônica em quase todos os animais. O corpo demonstrou-se completamente pigmentado de preto e listras laterais amareladas. Após passarem alguns dias de adaptação (co-alimentação de alimento vivo e ração para desmame), nesse estágio, as larvas já consomem unicamente o alimento inerte. Com 180 DAE, os animais já têm tamanho e forma adulta, e estão maduros sexualmente (desova observada em laboratório) (Anexo 1).

Os animais apresentaram um comprimento que variou de $0,2 \pm 0,0$ cm no 3º DAE, atingindo $3,2 \pm 0,1$ cm no 180º DAE (Fig. 3). Quanto ao peso, os animais apresentaram um incremento de 15 vezes do seu peso médio inicial (Fig.4).

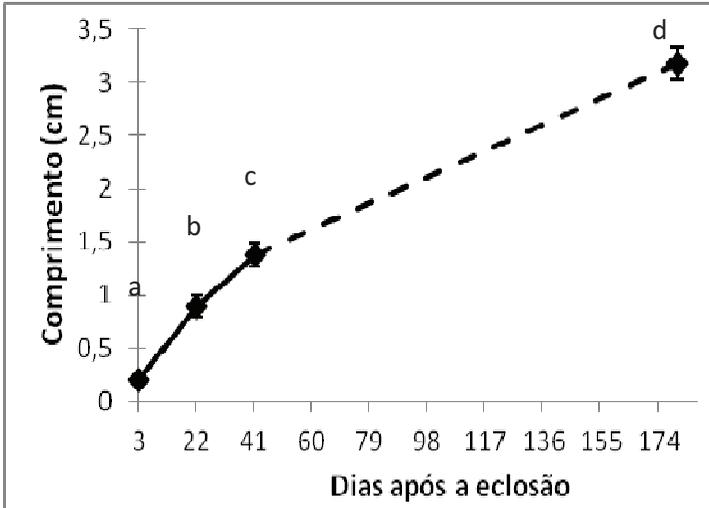


Figura 3. Crescimento em comprimento médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP, n=3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

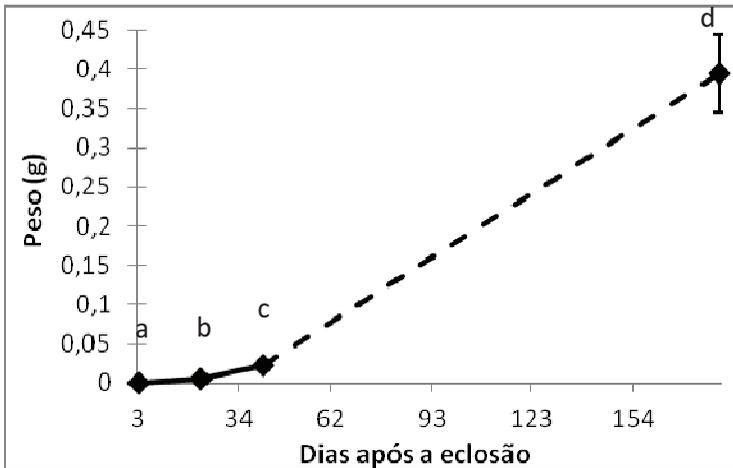


Figura 4. Crescimento em peso úmido médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP, n=3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

3.1.2 Atividade enzimática no neon gobi em função da idade

O perfil da atividade específica das proteases alcalinas do trato digestório do neon em função da idade (DAE) é mostrado na Fig. 5.

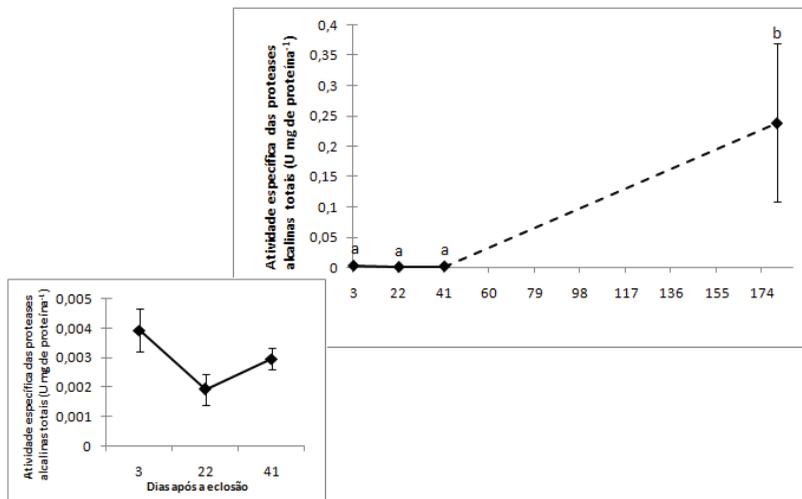


Figura 5. Perfil da média da atividade específica média das proteases alcalinas totais do neon gobi *Elacatinus figaro* (Média \pm DP, n=3-100) durante o período experimental (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

A atividade das proteases alcalinas totais apresentou um perfil semelhante nos três primeiros períodos de amostragem (3, 22 e 41 DAE), não sendo detectada diferença estatística entre si, apesar de ser observada uma tendência de oscilação entre os valores. O maior valor foi encontrado nos animais com 6 meses de vida (180 DAE), compreendendo $0,464 \pm 0,1358$ U mg de proteína⁻¹, valor 309 vezes superior ao menor valor encontrado, diferindo significativamente das atividades específicas das idades anteriores ($P < 0,05$). A atividade enzimática de adultos de neon gobi comparada á de adultos de outras espécies de peixes, com diferentes hábitos alimentares, pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4 – Atividade específica de proteases alcalinas encontrada em peixes adultos de espécies com diferentes hábitos alimentares

Espécie	Atividade específica (U mg de proteína⁻¹)	Hábito alimentar	Referência
“Discus fish” (<i>Symphysodon aequifasciata</i>)	0,7-0,9	carnívoro	Chong, Hasim, Yang & Ali, 2002
Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	0,8-1	carnívoro	Hidalgo, Urea & Sanz, 1999
“Spotted goatfish” (<i>Pseudupeneus maculatus</i>)	0,9	carnívoro	Souza, Amaral, Santo, Carvalho Jr & Bezerra, 2007
“Tench” (<i>Tinca tinca</i>)	0,28-0,45	onívoro	Hidalgo, Urea & Sanz, 1999
Neon gobi (<i>Elacatinus figaro</i>)	0,46	não definido	Presente estudo
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	0,3	onívoro	Chakrabarti, Gani, Chaki, Sur & Misra, 1995
Kinguio (<i>Carassius auratus</i>)	0,5	onívoro	Hidalgo, Urea & Sanz, 1999
Caracidae (<i>Brycon guatemalensis</i>)	0,02	herbívoro	Drewe, Hornm, Dickson & Gawlicka, 2003
<i>Aplodactylus punctatus</i>	<0,05	herbívoro	Ojeda & Cáceres, 1995
<i>Cebidichthys violaceus</i>	0,002	herbívoro	Chan, Horn, Dickson & Gawlicka, 2004

3.1.3 Atividade enzimática no alimento vivo

As atividades das proteases alcalinas detectadas no rotífero e *Artemia* amostrados nesse experimento, e a contribuição da atividade das proteases alcalinas desses alimentos vivos consumidos por uma larva de neon gobi, podem ser observadas na tabela 5.

Tabela 5 – Diferença entre as atividades específicas do neon gobi com 3 e 22 DAE* e seus respectivos alimentos vivos: rotífero e Artemia

Neon gobi	Atividade específica larva ⁻¹	Alimento vivo	Atividade específica alimento vivo ⁻¹	Contribuição alimento vivo (%)
3 DAE	$2,7 \cdot 10^{-5}$	Rotífero	$7,5 \cdot 10^{-9}$	2,7
22 DAE	$7,4 \cdot 10^{-5}$	Artemia	$4,8 \cdot 10^{-5}$	67,9

Cada larva de 3 DAE consumiu 100 rotíferos e 97 Artemias foram consumidas por larva de 22DAE.

A atividade enzimática do rotífero representou 2,7 % do valor encontrado por larva de 3 DAE. Por outro lado, cada larva de 22 DAE teve 67,9% de contribuição da atividade das proteases alcalinas totais proveniente da Artemia consumida pela larva de neon gobi.

3.2 Experimento 2: Antecipação da oferta de Artemia no protocolo de alimentação na larvicultura do neon gobi *Elacatinus figaro* e sua influência no crescimento e na atividade de proteases digestivas em juvenis da espécie.

O resultados da atividade específica das proteases alcalinas em juvenis de neon gobi com 41 DAE, cultivadas em diferentes dias de início de oferta da Artemia na alimentação, demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) (Fig.6).

Da mesma forma, o crescimento de juvenis de neon gobi demonstrou um padrão diferente nos dois tratamentos, porém as larvas da espécie com oferta antecipada da Artemia revelaram peso superior ($0,0370\text{g} \pm 0,001\text{g}$) do que aquelas que iniciaram o consumo de alimento vivo no 18º DAE ($0,0230 \pm 0,001\text{g}$) (Fig.7).

Semelhantemente, a idade onde ocorreu a metamorfose das larvas mostrou-se significativamente diferente entre os dois tratamentos, onde nas larvas com antecipação da Artemia observou-se o início e o término da transformação antecipados (24 e 34 DAE, respectivamente), quando comparado com aquelas que seguiram o protocolo de oferta de Artemia aos 18 DAE (34 e 41 DAE, respectivamente) (Fig.8).

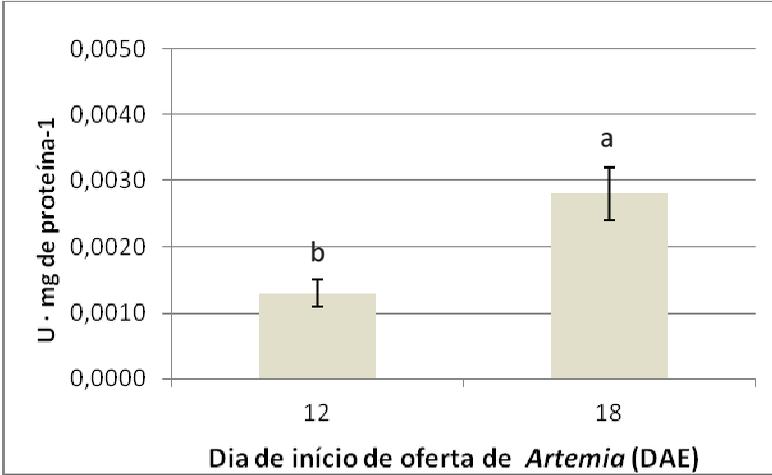


Figura 6 –Atividade específica das proteases alcalinas totais em neons gobi (*Elacatinus figaro*) de 41 DAE (Média \pm DP; n=10) nas larviculturas com início de oferta de *Artemia* em 12 e 18 DAE.

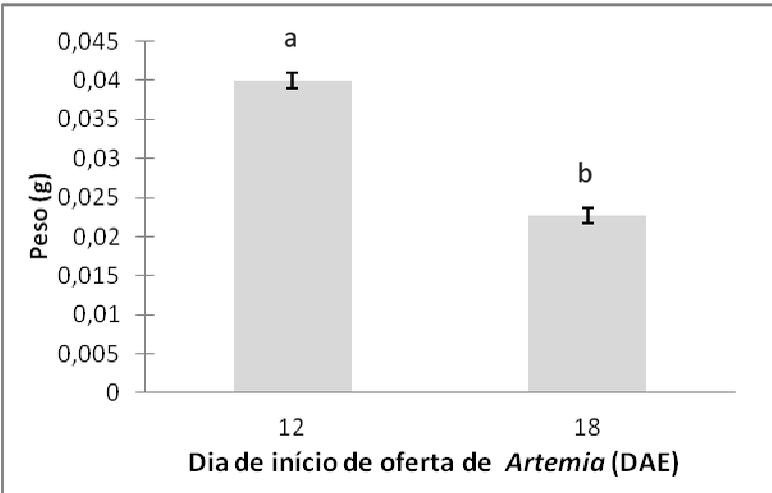


Figura 7– Crescimento (aos 41 DAE) em peso úmido médio do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média \pm DP; n=10) nas larviculturas com início de oferta de *Artemia* aos 12 e 18 DAE (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

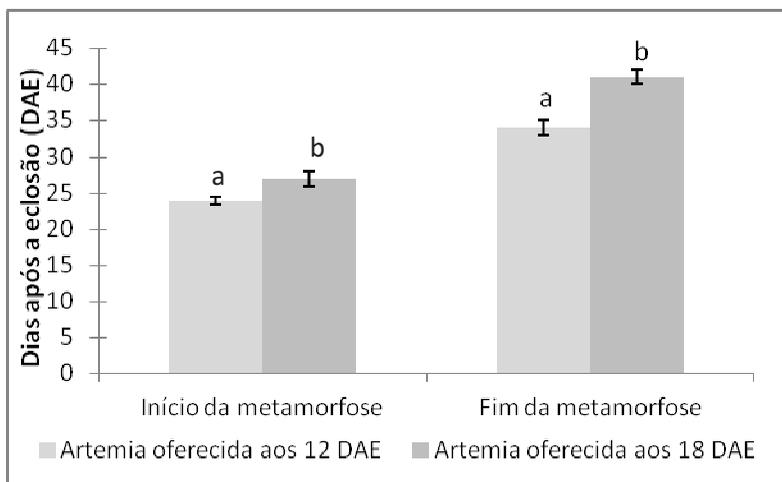


Figura 8—Dia de início e fim da metamorfose do neon gobi (*Elacatinus figaro*) (Média, \pm DP; n=10) nas larviculturas com início de oferta de Artemia aos 12 e 18 DAE (as barras representam o desvio padrão). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

4. Discussão

Conforme o observado no presente estudo, larvas recém eclodidas de neon gobi já apresentam saco vitelínico quase completamente reabsorvido, e a boca aberta. Com 3 DAE, o vitelo já foi completamente reabsorvido. Também foi demonstrado neste estudo que nesse mesmo estágio, as larvas já apresentam atividade de proteases alcalinas, com valores semelhantes aos estágios larvais seguintes (22 e 41 DAE). Segundo Baragi & Lovell (1986), a detecção precoce de enzimas digestivas antes ou durante a transição da alimentação endógena para exógena não é incomum. De fato, a tripsina, uma protease alcalina, está relacionada com a ativação de outros zimogênios pancreáticos e, portanto, é comumente detectada antes mesmo da abertura da boca (Jimenez-Martinez et al., 2012). Segundo Lazo, Holt & Arnold (2000) isso demonstra que as larvas são capazes de digerir presas relativamente complexas na primeira alimentação utilizando proteases endógenas.

Semelhante ao neon gobi, larvas de algumas espécies comercialmente importantes como o bacalhau do Atlântico (*G. morhua*), robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) e “turbot” (*Scophthalmus maximus*) eclodem de pequenos ovos (1-2 mm) com uma pequena

quantidade de vitelo e apresentam um curto (2-6 dias) período de alimentação vitelínica (Jobling, 1995; Ronnestad, Koven, Tandler, Harel & Fyhnn, 1998). De acordo com Watanabe & Kiron (1994), o ideal para essas espécies é iniciar a alimentação das larvas quando a boca abre, mas pouco antes da total reabsorção do vitelo. Isso porque a larva só vai estar com total capacidade de se alimentar quando as reservas do vitelo estiverem completamente reabsorvidas, e, portanto, a larva dependerá da disponibilidade de alimento.

A variação da atividade das proteases é afetada principalmente pelo aparecimento progressivo de órgãos do sistema digestório e pela resposta às mudanças na composição e na quantidade de alimento disponível (Moyano, Díaz, Alarcón & Sarasquete, 1996; Martínez, Moyano, Fernández-Díaz & Yúfera, 1999). Nesse contexto, espera-se que os padrões de atividades enzimáticas variem durante a ontogenia dos peixes. Todavia, no presente estudo, a atividade proteolítica alcalina não demonstrou uma relação direta com o crescimento das larvas da espécie, onde durante todo o período larval, até a fase de juvenil (41 DAE), não foram constatadas diferenças significativas na atividade proteolítica alcalina.

A evidente diferença na biometria entre as idades iniciais de amostragem, que reflete em um acréscimo progressivo das proteínas corporais decorrentes do crescimento larval, pode mascarar a expressão da atividade das proteases, uma vez que a atividade específica é expressa em atividade (unidade de enzima) por miligrama de proteína contida nos extratos enzimáticos obtidos dos homogenatos do corpo da larva. Nem sempre a diminuição da atividade específica de uma enzima significa a redução da atividade enzimática, pois na relação atividade enzimática e miligrama de proteína, o valor desta proteína vai aumentando com a idade da amostragem (Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Cara Et Al., 2003; Alvarez-González, Cervantes-Trujano, Tovar-Ramírez, Conklin, Nolasco, Gisbert, Piedrahita & Conkli, 2004).

Além disso, a falta de variação na atividade das proteases alcalinas mesmo durante a metamorfose pode ser devido a uma substituição do predomínio da digestão da proteína alimentar por proteases ácidas, indicando o início da digestão gástrica (devido às "pepsin-like"). Tal suposição foi defendida por Shan, Huan, Cao, Xiao & Dou (2009) em larvas de "miiuy croacker" (*Miichthys miiuy*), em que se obteve resultados semelhantes, porém também não se mensurou a atividade da pepsina.

Por outro lado, durante o desenvolvimento ontogenético de uma espécie, o perfil da atividade das enzimas varia substancialmente entre

larvas e adultos (Díaz, Moyano, García-Carreño, Alarcón & Sarasquete, 1997). No presente estudo, foram observadas diferenças significativas nas atividades enzimáticas de proteases alcalinas entre as fases larvais, juvenil e a adulta, onde a atividade das proteases alcalinas mostrou-se 309 vezes maior (0,4 U mg proteína⁻¹) em adultos, quando comparada com os estágios larvais (0,0015 U mg proteína⁻¹), o que demonstra a permanente contribuição dessas enzimas na digestão dos alimentos para o neon gobi.

A atividade das proteases determinada no presente estudo, no neon gobi com 180 DAE, é superior a encontrada em peixes herbívoros, porém inferior à observada em peixes carnívoros (Tab. 4). Segundo German, Horn & Gawlicka (2004), peixes herbívoros possuem poucas proteases uma vez que produzir grandes quantidades destas pode ser metabolicamente dispendioso já que os animais ingerem baixas quantidades de substratos (proteína) para essas enzimas, enquanto peixes carnívoros demonstram elevadas atividades de proteases uma vez que necessitam digerir sua dieta composta de alto conteúdo proteico.

Por outro lado, a atividade enzimática do neon gobi foi semelhante à encontrada em peixes onívoros (Tab.4). Isso faz sentido, uma vez que o neon gobi é uma espécie que se alimenta de diferentes níveis tróficos, sendo considerada limpadora obrigatória, consumindo ectoparasitas, tecidos doentes ou feridos e muco da superfície do corpo do outro peixe (Sazima et al., 2000), além de poder se tornar oportunista na ausência de clientes e procurar alimentos não provenientes de limpeza (Araújo *et al.*, 2004). Na literatura, o hábito alimentar do gênero *Elacatinus* possui diferentes definições, sendo classificado como “consumidores de ectoparasitos”(Randall, 2004), consumidor de invertebrados móveis (“mobile invertebrate feeders” - MIF) (Mendonça-Neto et al., 2008) ou mesmo carnívoros que vivem de pequenos invertebrados bentônicos (Sazima et al., 1996).

As análises enzimáticas dos alimentos vivos demonstraram que a atividade das proteases alcalinas detectada nos rotíferos foi baixa no atual experimento, permitindo concluir que tais enzimas provenientes desse organismo não contribuem expressivamente no total da atividade enzimática em larvas de neon gobi.

Muitos estudos demonstraram a habilidade das larvas em produzir a maioria de suas enzimas digestivas na, ou próximo da, primeira alimentação, sugerindo que essa contribuição exógena é pequena, ou mesmo negligível. Por exemplo, Kim, Dikaravan, Brown & Ostrowski (2001), em um estudo com o “threadfin” (*Polydactylus sexfilis*) e o xaréu-barbatana-azul (*Caranx melampygus*), observaram

que a atividade das proteases alcalinas aumentou antes da primeira alimentação com rotífero em ambas as espécies, e mesmo quando essas não foram alimentadas, ainda assim produziram a mesma atividade das proteases, comprovando a irrelevante contribuição do alimento vivo. Kurokawa, Shiraishi & Suzuki (1998) obtiveram 1% de contribuição das proteases exógenas em larvas de sardinha japonesa (*Sardinops melanoticus*) alimentada com rotífero, resultado próximo ao encontrado no presente estudo.

Por outro lado, os resultados obtidos no atual experimento estimam uma contribuição de 67,9 % das proteases alcalinas provenientes da *Artemia*. Semelhantemente, Dabrowski e Glogowski (1977) e Kuz'mina et al. (2011) também encontraram elevadas atividades proteolítica alcalinas em invertebrados constituintes da dieta de larvas de peixes (*Artemia*, moluscos e outros).

Segundo Kolkowski (2001), as larvas podem utilizar as enzimas de seu alimento vivo para facilitar o processo de digestão até que o sistema digestório larval esteja completamente desenvolvido e diferenciado. O autor afirma que pode-se explicar o crescimento acelerado e maior assimilação de nutrientes em larvas de peixes em que se oferece alimento vivo devido á contribuição dessas enzimas exógenas para as larvas.

Isso poderia explicar os resultados do segundo experimento do presente estudo, onde a antecipação da oferta de *Artemia* do protocolo alimentar permitiu obter juvenis em um menor período de tempo (em torno de 24 DAE comparado com 34 DAE do protocolo original), gerando animais com quase o dobro de peso do protocolo original, utilizado por Meirelles *et al.* (2009).

Além disso, segundo Côrtes & Tsuzuki (2009), nos protocolos de larvicultura de peixes marinhos, o início da utilização de náuplios de *Artemia* (450-700 μm) é indicado quando as larvas estão aptas à predarem alimentos maiores que os rotíferos (80-340 μm). A transição de alimento vivo deve ser feita de forma gradativa, e seu início varia conforme a espécie, por exemplo: larvas de pequeno tamanho irão demorar mais para começar a preda náuplios de *Artemia*. É importante que a introdução de um alimento de maior tamanho no cultivo seja ofertada no tempo certo, isto porque, existe um momento em que a utilização de rotíferos não é mais benéfica para as larvas. Este momento ocorre quando o gasto de energia que a larva utiliza para capturar o alimento não é compensado pela energia contida neste. Conseqüentemente, a demora no fornecimento da *Artemia* no protocolo original de larvicultura do neon gobi pode ter feito com que as larvas da

espécie obtivessem um menor crescimento e atrasassem seu desenvolvimento e, por conseguinte, sua metamorfose para juvenil.

Para a espécie de gobídeo *Elacatinus oceanops*, Wittenrich, Turingan & Creswell (2007) recomendam iniciar a utilização de *Artemia* em larvas de 10 DAE, com ocorrência da metamorfose entre os 33 e 40 DAE. Outros estudos com a mesma espécie adicionam *Artemia* na larvicultura com 15 DAE, e relatam a metamorfose entre os 30 e 40 DAE (Olivotto, Zenobi, Rollo, Migliarini & Avella, 2005). Portanto, a antecipação proposta no presente estudo parece ser benéfica no ponto de vista produtivo, onde os animais alcançarão o tamanho comercial mais rapidamente, além de permanecerem menos tempo dependentes da oferta de *Artemia* (22 dias).

Person-Le Ruyet et al. (1993) calcularam os custos envolvidos com a alimentação com alimentos vivos (principalmente *Artemia*) para o robalo europeu (*D. labrax*), e encontraram gastos de aproximadamente 79% dos custos de produção para juvenis de cerca de 45 dias. Portanto, qualquer decréscimo no uso da *Artemia* se torna economicamente vantajoso.

Por outro lado, a atividade específica das proteases alcalinas foi menor nas larvas com oferta antecipada de *Artemia* do que naquelas do protocolo alimentar tradicionalmente utilizado. De acordo com Hjmeland et al. (1984), pode-se interpretar a presença e níveis de atividade das enzimas digestivas como indicadoras do desenvolvimento larval. A variação de tais atividades parece ser afetada principalmente pelo aparecimento progressivo de órgãos do sistema digestório (MARTÍNEZ et al., 1999), principalmente no momento da metamorfose de juvenil para adulto, que é acompanhando de diversos processos de mudanças nas funções digestórias (SHAN et al., 2009), e a digestão das proteína é gradativamente substituída por enzimas ácidas, indicando o início da digestão gástrica. Portanto, a baixa atividade de proteases alcalinas nas larvas mais desenvolvidas pode estar refletindo um estágio mais evoluído no trato digestório, que já não dependem unicamente das proteases alcalinas.

Adicionalmente, segundo Kolkovski (2001), é evidente que os alimentos vivos contribuem para os processos de digestão e assimilação em larvas de peixes marinhos de outras formas além das colaborações diretas de enzimas digestivas. Por exemplo, as técnicas de enriquecimento comumente utilizadas em náuplios de *Artemia* oferecidos para peixes em cultivo aumentam a disponibilidade de ácidos graxos altamente insaturados, como o ácido docosaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA), componentes essenciais da dieta de

larvas de peixes (Han, Geurden & Sorgeloos, 2000). A oferta de alimento vivo com administração desses ácidos graxos demonstrou incrementar o crescimento e desenvolvimento em espécies ornamentais como a donzela (*Chrysiptera parasema*) (Olivotto, Cardinali, Barbaresi, Maradonna & Carnevali, 2003), o gobídeo *Gobiosoma evelynae* (Olivotto et al., 2005) e o peixe palhaço (*Amphiprion ocellaris*) (Olivotto et al., 2007).

Além disso, dado o seu maior tamanho quando comparada com o rotífero, a motilidade da *Artemia* pelo trato digestório pode provocar estímulos mecânicos, aumentando os movimentos peristálticos, o que desencadeia os processos digestórios larvais (Tandler & Kolkovski, 1991).

5. Conclusão

O presente estudo pôde observar que a atividade das proteases alcalinas no trato digestório de neon gobi encontram-se presentes desde os 3 DAE, no início da alimentação exógena, não diferindo dos estágios larvais seguintes, até 22 DAE, e da fase juvenil (41 DAE). Todavia, essas atividades específicas das proteases alcalinas aumentaram em torno de 309 vezes em adultos da espécie, mostrando a contribuição da atividade proteolítica, em pH alcalino, na digestão proteica durante essa fase. As determinações das atividades enzimáticas realizadas em organismos vivos comumente utilizados na larvicultura do neon gobi permitiram concluir que a contribuição da atividade específica de proteases alcalinas exógenas do rotífero para larvas de 3 DAE foi pequena (2%), porém mais expressiva (68,9%) quando provenientes da *Artemia* para larvas de 22 DAE.

A antecipação do fornecimento de *Artemia* no protocolo alimentar na larvicultura do neon gobi resultou em diferenças estatísticas entre a atividade específica de proteases alcalinas de juvenis de 41 DAE cultivadas nesse manejo alimentar e o protocolo original. Além disso, demonstrou ser benéfica do ponto de vista produtivo devido ao incremento no crescimento e a metamorfose antecipada observados no protocolo alimentar com antecipação da *Artemia*, alcançando o tamanho comercial mais cedo, e permanecendo menos tempo dependente da alimentação com a *Artemia*, o que reduz os custos de produção.

6. Referências bibliográficas

- Alvarez-González, C. A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D. E., Nolasco, H., Gisbert, E. & Piedrahita, R. (2006) et al. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry***31**, 83-93.
- Applebaum, S. L. & Holt, G. J. (2003) The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology***142**, 1159-1167.
- Avella, M. A., Olivotto, I., Gioacchini, G., Maradonna, F. & Carnevali, O. (2007) The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture***273**, 87-95.
- Baragi, V. & Lovell, T. (1986) Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Transactions of the American Fishery Society***115**, 478-484.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry***72**, 248-254.
- Cahu, C. L.; Zambonino Infante, J. L. (1994) Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem, Physiol.***109**, 213-222.
- Cara, T. J. B. et al. (2002) Actividad de enzimas digestivas durante El desarrollo larvário de Sargo (*Diplodus sargus*). In: *Congreso Iberoamericano Virtual De Acuicultura (Civa)*, pp. 110-121. Resumos... , Civa.
- Cara, J. B., Moyano, F. J., Cárdenas, S. Fernández-Díaz, M. & Yúfera, M. (2003) Assesment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology***63**, 48-58.
- Carvalho-Filho, A. (1999) *Peixes: costa brasileira*, pp. 1- 304. Melro, São Paulo.
- Côrtes, G. F. & Tsuzuki, M. Y. (2011) Effect of different live food on survival and growth of first feeding barber goby, *Elacatinus figaro*

(Sazima, Moura & Rosa 1997) larvae. *Aquaculture Research***43**, 831-834.

Dabrowski, K.; Glogowski, J. (1977) Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates constituting fish food. *Hydrobiologia***52**, 171-174.

Dabrowski, K. (1984) The feeding of fish larvae: present state of the art and perspectives. *Reprod. Nutr. Develop* **24**, 807-833.

Díaz, M., Moyano, F. J., García-Carreño, F. L., Alarcón, F. J. & Sarasquete, M. C. (1997) Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International***5**, 461-471.

Fernández, I., Moyano, F. J. & Martínez, M. D. (2001) Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.**262**, 1-12.

García-Carreño, F. L. & Haard, N. F. (1993) Characterization of proteases classes in langostilla *Pleurocondes planipes* and crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. *Journal of Food Biochemistry***7**, 97-113.

Galvão, M. S. N., Yamanaka, N., Fenerich-Verani, N. & Pimentel, C. M. M. (1997) Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Boletim do Insituto de Pesca* **24**, 101-110.

Gawlicka, A. Parent, B., Horn, M., Ross, N. Opstad, I. & Torrissen, O. J. (2000) Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture***184**, 303-314.

García-Carreño, F. L., Albuquerque-Cavalcanti, C., Toro, M. A. N., Zaniboni-Filho, E. (2002) Digestive proteinases of Brycon orbignyanus (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B***132**, 343-352.

Gasparini, J. L., Floeter, S. R., Ferreira, C. E. L. & Sazima, I. (2005) Marine Ornamental Trade in Brazil. *Biodiversity and Conservation***14**, 2883-2899.

- German, P. D., Horn, H. M. & Gawlicka, A. (2004) Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology* **77**, 789-804.
- Gisbert, E. R. H., Piedrahita, R. H. & Conkli, D. E. et al. (2004) Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* **232**, 455-470.
- Guerreiro, I. Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P. Rodrigues, V., Dinis. M. T. & Ribeiro, L. (2010) Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* **300**, 194-205
- Han, K., Geurden, I. & Sorgeloos, P. (2000) Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of *n*-3 highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* **183**, 335-347.
- Hidalgo, M. C., Urea, E. & Sanz, A. (1999). Comparartive study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* **170**, 267-283.
- Hjemeland, K., Huse, I., Jorgensen, T., Molvik, G., Raa, J. (1984). Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua*) larvae. *Flodevigen Rapportseries* **1**, 189-201.
- Hofer, R. (1981) Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. A.* **72**, 55-63.
- Jimenez-Martinez, L. D., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, Gaxiola, G., Sanchez-Zamora, A., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., Márquez-Couturier, G., Gisbert, E. & Contreras-Sánchez, W. M. (2012) Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiology Biochemistry* **38**, 441-454.
- Jobling, M. (1995) Development of eggs and larvae. In: *Environmental Biology of Fishes* (ed. By M. Jobling), pp. 357-390. Chapman & Hall, London.
- Kim, B. G., Dikaravan, S., Brown, C. L. & Ostrowski, A. C. (2001) Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes:

Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and Bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology and Biochemistry***24**, 225-241.

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

Kotani, T. & Fushimi, H. (2011) Determination of appropriate feeding schedules from diel feeding rhythms in finfish larviculture. *Aquaculture***315**, 104-113.

Kurowaka, Shiraishi, M. & Suzuki, T. (1998) Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanoticus* larvae. *Aquaculture***161**, 491-499.

Kuz'mina, V. V. (1990). Temperature influence on the total level of proteolytic activity in the digestive tract of some species of freshwater fishes. *Journal of Ichthyology*, **30**, 97-109.

Kuz'mina, V. V. (1996) Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture***148**, 25-37.

Kuz'mina, V. V. (2011) Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of intestinal mucosa, chime and microbiota in fish. *Fish Physiology and Biochemistry***37**, 345-353.

Lauff, M. & Hofer, R. (1984) Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture***37**, 335-346.

Lazo, J. P., Holt, G. J. & Arnold, C. R. (2000). Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition***6**, 183-192.

Ma, H., Cahu, C., Zambonino, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M. & Mai, K. (2005). Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, **245**, 1-4.

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

- Meirelles, M. E. Tsuzuki, M. Y., Ribeiro, F. F., Medeiros, R. & Diniz, I. (2009) Reproduction, early development and larviculture of the barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997). *Aquaculture Research***41**, 11-18.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J. & Sarasquete, M. C. (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Spaurus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry***15**, 121-130.
- Olivotto, I., Cardinali, M., Barbaresi, L., Maradonna, M. & Carnevali, O. (2003). Coral reef fish breeding: the secrets of each species. *Aquaculture***224**, 69-78.
- Olivotto, I., Zenobi, A., Rollo, A., Migliarini, B., Avella, M. & Carnevali, O.. (2005) Breeding, rearing and feeding studies in the cleaner goby *Gobiosoma evelynae*. *Aquaculture***250**, 175-182
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Théubad, L. & Mugnier, C.. (1993) Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *Journal of Aquaculture Society***24**, 211-224.
- Pezzato, L. E. O (1997)Estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. In: *Simpósio sobre o manejo enutrição de peixes* (ed. by J. E. P. Cyrino, J. E. P.; F. Kubitza), pp. 45-62. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal (CBNA) e Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo.
- Ronnestad, I., Koven, W., Tandler, A., Harel, M. & Fyhnn, H. J. (1998) Utilization of yolk fuels in developing eggs and larvae of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture***161**, 157-170.
- Sazima, I., Sazima, C., Francini-Filho, R. B. & Moura, R. L. (2000) Daily cleaning activity diversity of clients of the barber goby, *Elacatinus figaro*, on rocky reefs in southeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes* **69**, 69-77.
- Sazima, I.; Moura, R. L. & Rosa, R. S. *Elacatinus figaro* sp. (Perciformes: Gobiidae), a new cleaner goby from the coast of Brazil. (1996) *Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, **3**, 33-38.

Sazima, I.; Moura, R. L. & Sazima, C. (1999) Cleaning activity of juvenile angelfish, *Pomacanthus paru*, on the reefs of the Abrolhos Archipelago, western South Atlantic. *Environmental Biology of Fishes*, **56**, 399-407.

Shan, X., Huan, W., Cao, L., Xiao, Z. & Dou, S. (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry***35**, 385-398.

Tandler, A. & Kolkosvki, S. (1991) Rates of ingestion and digestibility as limiting factors in the successful use of microdiet in *Spaarus aurata* larvae. In: *LARVI'91 – Fish and Crustacean Larviculture Symp. Europ.* (ed. by. SORGELOOS, L.P., JASPERS, P. & OLLEVIER, F), pp. 169-171. Aquacult. Soc. Spec. Publ., Bélgica.

Walford, J. & Lam, T. J. (1993) Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture***109**, 187-205.

Watanabe, T. & Kiron, V. (1994) Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, **124**, 223-251.

Wittenrich, M. L., Turingan, R. G. & Creswell, R. L. (2007) Spawning, early development and first feeding in the gobiid fish *Priolepis nocturna*. *Aquaculture***270**, 132-141.

Zambonino Infante, J. L. & Cahu, C. L. (1994) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology***109A**, 209-212.

Zambonino Infante, J. L., Cahu, C. L., Péres, A., Quazuguel, P. & Le Gall, M. M. (1996) Sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae fed different *Artemia* rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive function. *Aquaculture***139**, 129-138.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O neon gobi (*E. figaro*) gera desovas com baixa fecundidade (cerca de 410 ovos) e uma taxa de sobrevivência muito pequena (20%) ao final da larvicultura, o que limita a disponibilidade de amostras para realizar experimentos de descrição da ontogenia da espécie. Portanto, o presente trabalho apresentou uma introdução aos estudos envolvendo o sistema digestório do neon gobi, havendo ainda lacunas a serem preenchidas á respeito da capacidade digestória envolvendo outros principais nutrientes requeridos pela espécie. Sendo assim, futuros estudos nesta área tornam-se necessários a fim de melhor suprir as necessidades alimentares do neon gobi em cativeiro.

Para um melhor entendimento dos processos relativos à dinâmica das atividades enzimáticas na ontogênese do neon gobi, tornam-se necessários futuros estudos abrangendo a quantificação das enzimas digestivas ácidas (principalmente, pepsina), a fim de determinar o momento de aparecimento da digestão ácida decorrente do surgimento do estômago funcional.

Outro aspecto importante a ser focado em futuros trabalhos é a caracterização do hábito alimentar do neon gobi, uma vez que a literatura possui diferentes classificações, não muito claras. Tal definição poderia ser alcançada através de um estudo comparativo entre as atividades de proteases e amilases, que poderia revelar a capacidade da espécie em usar proteínas e carboidratos dos alimentos, paralelamente à uma descrição da morfologia e da histologia do trato digestório da espécie para, por fim, interpretar suas necessidades nutricionais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO

ALARCÓN, F. J.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications: In: FEEDING TOMORROWS FISH: PROCEEDINGS OF THE WORKSHOP OF THE CIHEAM NETWORK ON....., 1998, Zaragoza. **Workshop**. FAO: Instituto Español de Oceanografía, p. 113-121.1997.

ALARCÓN, F. J.; MARTINEZ DÍAZ, M. I . Fisiologia de la digestión em larvas de peces marinos y SUS aplicaciones al cultivo larvário em masa. **Revista Aquatic**, Zaragoza, n. 5, não paginado, 1998. Disponível em: <http://www.revistaaquatic.com>. Acesso em: 18 de novembro de 2011.

ALVAREZ-GONZÁLEZ, C. A. et al. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 4, p. 373-384. 2008.

AVELLA, M. A. et al. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprion ocellaris*.**Aquaculture**. v. 273, p. 87-95. 2007

BARRETO, L. M. **Estudo sobre o mercado de peixes ornamentais marinhos no Ceará com ênfase na taxa de descarte nas capturas**.Fortaleza, 2002. 54 f.

BELL, J. G. et al. Optimizing lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae.**Aquaculture**, v. 227, p. 211-220. 2003.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Do parecer no tocante á espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobre-exploração. Instrução Normativa, n. 5 de 21 de maio de 2004. Legislação Federal e marginália.

BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. **Broodstock management and egg and larval quality**.Chapter 15: Larval Foods. Stirling: Blackweel Science, 2001. 424 p.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. **Comp. Biochem, Physiol.**, v. 109, p. 213-222. 1994.

CAHU, C. L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 200, p. 161-180. 2001.

CAHU, C. et al. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-258, 2003.

CALADO, R. Marine ornamental species from European Waters: A valuable overlooked resource or a future threat for the conservation of marine ecosystems? **Sci. Mar.** v. 70, p. 389-398, 2006.

CAMPOS, C. E. C.; SÁ-OLIVEIRA, J. C. Atividade de limpeza e clientes de *Elacatinus figaro* (Pisces: Gobiidae) nos recifes de coral dos Parrachos de Muriú, Nordeste do Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 11, n.1, p. 47-51. 2011.

CARA, T. J.B. et al. Actividad de enzimas digestivas durante El desarrollo larvário de Sargo (*Diplodus sargus*). In: CONGRESO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA (CIVA), 1., 2002. **Resumos...** Disponível em <http://www.civa2002.org>; p; 110-121. Acesso em: 10 de janeiro de 2012.

CARVALHO-FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. 3. ed. São Paulo: Melro, 1999. 304 p.

CHONG et al. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish *Symphysodon aequifasciata*. **Aquaculture**. v. 203, p. 321-333. 2002.

CONCEIÇÃO, L. E. C. et al. Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**.v. 38, p. 26-35. 2009.

CÔRTEZ, G. F. **Produção e utilização de diferentes fontes de alimento vivo na fase inicial de larvicultura do neon gobi (*Elacatinus figaro*)**. 2009. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Depto. de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

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

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

ENGROLA, S. et al. Co-feeding in Senegalese sole larvae with inter diet from mouth opening promotes growth at weaning. **Aquaculture**, v. 288, p. 264-272, 2009.

FAO. Fisheries and Aquaculture topics. **Ornamental fish**. Rome, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/topiic/13611/en>>. Acesso: 5 de março de 2012.

FERNÁNDEZ, I.; et al. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 262, p. 1-12. 2000.

GALVÃO, M. S. N. et al. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. **Bol. Inst. Pesca**, v. 24, p. 101-110. 1997.

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

GARCÍA-CARREÑO, F. et al. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, p. 343-352. 2002.

GASPARINI, J. L. et al. Marine Ornamental Trade in Brazil. **Biodiversity and Conservation**.v.14, p.2883-2899, 2005.

GAWLICKA, A. et al. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hipoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. **Aquaculture**, v. 184, p. 303-314. 2000.

GLASS, H. J. et al. Digestion of protein in different marine species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 94, p. 607-611, 1989.

GRAHAM, H.; INBORR, J. Enzymes in monogastric feeding. **Agro Industry Hi-tech.**, v. 2, n.1, p. 45-48, 1991.

GRUTTER, A. S.; MURPHY, J. M.; CHOAT, J. H. Cleaner fish drives local fish diversity on coral reefs. **Current Biology**. v. 13, p. 64-67, 2003.

GUERREIRO, I. et al. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). **Aquaculture**, v. 300, p. 194-205. 2010.

HANZA, N. et al. Effect of dietary phospholipid levels on performance, enzyme activities and fatty acid composition of pikeperch (*Saner lucioperca*) larvae. **Aquaculture**. v. 264, p. 264-282. 2009.

HOFER, R. Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. **Comp. Biochem. Physiol. A**. v. 72, n.1, p.1 55-63. 1981.

HOLT, G. J. Research on culturing of the early life stages of marine ornamental fish. In: CATO, J. C.; BROWN, C. L. **Marine Ornamental Species: collection, culture and conservation**. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 251-264

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS PESQUEIROS - IBAMA. **Relatório da Reunião Nacional sobre Regulamentação Específica para Exploração de Peixes Ornamentais Marinhos**. Fortaleza, 36 p. 2003.

KIM, B. G. et al. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). **Fish Physiol. Biochem.**, v. 24, p. 225-241. 2001.

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

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

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

MEIRELLES, M. E. et al. Reproduction, early development and larviculture of the barber goby, *Elacatinus figaro* (Sazima, Moura & Rosa 1997). **Aquaculture Research**. v. 41, p. 11-18. 2009

MOORHEAD, J. A., ZENG, C. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. **Reviews in fisheries science**. v. 18, p. 315 -343. 2010.

NAZ, M. The changes in the biochemical compositions and enzymatic activities of rotifer (*Brachionus plicatilis*, Muller) and *Artemia* during the enrichment and starvation periods. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 34, p. 391-404. 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehniger**. Artmed, 2011. 1273 p.

NOTTINGHAM, M. C.; CUNHA, F. E. A.; MONTEIRO-NETO. C. Captura de peixes ornamentais marinhos no Estado do Ceará. **Arquivos das Ciências do Mar**, v. 33, n.1/2, p. 119-124, 2000.

OLIVIER, K. World trade in ornamental species, p. 49-63. In: CATO, J. C.; BROWN, C. L. **Marine Ornamental Species: Collection, Culture and Conservation**. Ames, Iowa: Iowa State Press. 2003. p. 49-64.

PEZZATO, L. E. O estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO ENUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: CYRINO, J. E. P.; KUBITZA, F., 1997. p. 45-62.

PINHEIRO, C. **Diagnóstico geral das práticas de controle ligadas a exploração, captura, comercialização, exportação e uso de peixes para fins ornamentais e de aquariorfilia**. Brasília: IBAMA. 2008. 202 p.

SALES, J., JANSSENS, G. P. J. Nutrient requirements of ornamental fish. **Aquatic living resources**. v. 16, p. 533-540. 2003.

SAMPAIO, C. L. S.; ROSA, I. L. Comércio de peixes ornamentais marinhos na Bahia: passado, presente e futuro. **Boletim da SBI**, nº 71, João Pessoa, 2003

SAMPAIO, C. L. S.; NOTTINGHAM, M. C. **Guia para identificação de peixes ornamentais**. Brasília: Ibama, 2008. 738 p.

SAZIMA, I.; MOURA, R. L.; ROSA, R. S. *Elacatinus figaro* sp. (Perciformes: Gobiidae), a new cleaner goby from the coast of Brazil. **Aqua J. Ichtyol. Aquat. Biol.**, 2 v. 3, p. 33-38. 1996.

SAZIMA, I.; MOURA, R. L.; SAZIMA, C. Cleaning activity of juvenile angelfish, *Pomacanthus paru*, on the reefs of the Abrolhos Archipelago, western South Atlantic. **Environmental Biology of Fishes**, v. 56, 399-407. 1999.

SAZIMA, I. et al. Daily cleaning activity diversity of clients of the barber goby, *Elacatinus Figaro*, on rocky reefs in southeastern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 69, p. 69-77. 2000.

SEGNER, H. et al. Larval nutrition physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 24, p. 121-134. 1993.

SHAN, X. et al. Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, n. 3, p. 385-398. 2008.

SHEI, M. **Reprodução, desenvolvimento embrionário e larvicultura do “neon goby” *Elacatinus figaro* em laboratório**. 2008. 21 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Universidade Federal do Rio Grande. . Rio Grande.

SHEI, M. et al. Production of juvenile barber goby *Elacatinus figaro* in captivity: developing technology to reduce fishing pressure on an endangered species. **Marine Biodiversity Records**, v. 3, p. 1-7. 2011.

SOUZA, R. A. R. **Interação de limpeza entre o neon gobi *Elacatinus figaro* cultivado e a garoupa verdadeira *Epinephelus marginatus* e seu efeito no controle de *Neobenedenia melleni***. 2010. 65 f.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Depto. de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

TAKEUCHI, T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v. 200, p. 203-22, 2001.

TAKEUTI, T. **Variação de frequência de desova e fecundidade de animais selvagens e de cultivo e aspectos de sanidade do neon gobi (*Elacatinus figaro*)**. 2009. 21 f. Monografia (Graduação em Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

TISSOT, B. N.; HALLACHER, L. E. Effects of aquarium collectors on coral reef fishes in Kona, Hawaii. **Conserv. Biol.**, v. 17, p. 1759-1768, 2003.

VEGA-VILLASANTE, F. et al. The digestive enzymes of the pacific Brown shrimp *Peneaus californiensis* – II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. **Comp. Biochem, Physiol. B.** v. 1, p.1 123-139. 1995.

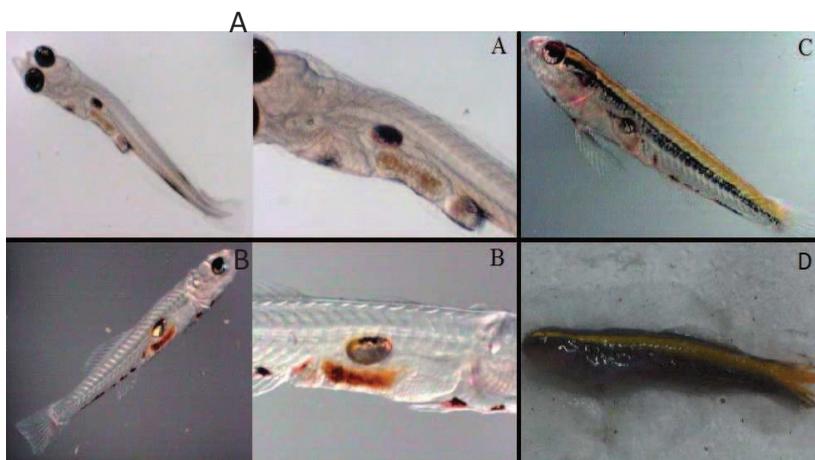
WALFORD, J., LAM, T. J. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. **Aquaculture**, v. 109, p. 187-205. 1993.

WITTINGTON, R. J.; CHONG, R. Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: The case for revised import risk analysis and management strategies. **Prev. Vet. Med.** v. 81, p. 92-116. 2007.

WOOD, E. **Exploitation of coral reef fishes for the aquarium trade**. UK: Marine Conservation Society, 1985. 121 p.

ZAMBONINO INFANTE, J. L.; CAHU, C.L. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. **Aquaculture**, v. 268, p. 98-105. 2007.

ZIMMERMANN, S.; JOST, H. C. Recentes avanços na nutrição de peixes: a nutrição por fases em piscicultura intensiva. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Piracicaba. **Resumos...**:São Paulo: CYRINO, J. E. P.; MACHADO, J. F. M.; MIYADA, V. S. p. 123-162.

ANEXOS

Anexo 1 – Estágios de desenvolvimento do neon gobi (*E. figaro*): A – com 3 DAE; B – com 22 DAE; C – com 41 DAE e D – com 180 DAE. (Fonte: Meirelles et al., 2009).