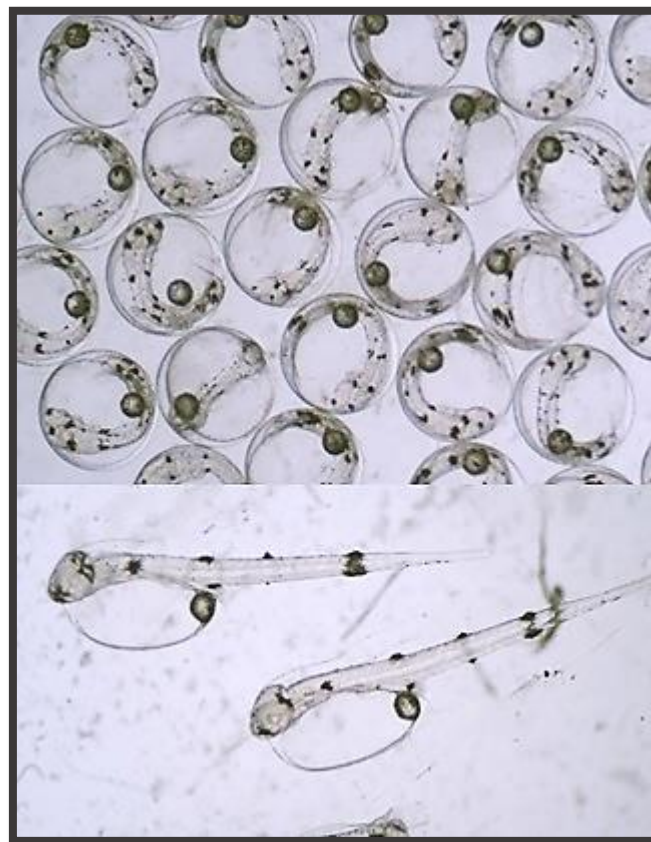


## **Impacto da acidificação dos oceanos no desenvolvimento embrionário e larvar de peixes marinhos**



**Soraia Alexandra Costa Filipe**





# **Impacto da acidificação dos oceanos no desenvolvimento embrionário e larvar de peixes marinhos**

**Soraia Alexandra Costa Filipe**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura e Pescas

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Pombo- IPL-ESTM

Doutora Ana Faria- ISPA

Doutora Laura Ribeiro- IPMA



**Título:** Impacto da acidificação dos oceanos no desenvolvimento embrionário e larvar de peixes marinhos

**Copyright © Soraia Alexandra Costa Filipe**  
**Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche**  
**Instituto Politécnico de Leiria**  
**2015**

---

*A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*

**Para a minha família**

○ **Agradecimentos**

A toda a equipa do IPMA e do ISPA, as duas instituições que me receberam, obrigada por me terem proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha dissertação, pela companhia, aprendizagem, bons momentos, pela forma como me receberam, pelo excelente ambiente que me proporcionaram e por tudo o que me ensinaram.

À Doutora Laura Ribeiro e à Doutora Ana Faria obrigada pela disponibilidade para orientar este trabalho, pela exigência de método e rigor, pela cedência e indicação de bibliografia relevante, pela acessibilidade, cordialidade e simpatia demonstradas, pela confiança que me concederam e pelo permanente estímulo que se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta dissertação.

À Doutora Ana Pombo muito obrigada por ter aceitado orientar este trabalho de Mestrado, pela revisão crítica do texto, pelos comentários, esclarecimentos e sugestões, pela disponibilidade, que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica. À Professora Susana Mendes por toda ajuda e paciência com as dúvidas de Estatística. A todos os colegas de Licenciatura de Biologia Marinha e Biotecnologia e Mestrado em Aquacultura, com quem vivi um ambiente de verdadeira amizade e aprendizagem colaborativa, em especial às melhores amigas de Peniche, minha ‘preta’ Marcela França, Catarina Mendes e Cátia Fernandes, que sempre que me faltavam as forças para continuar, davam-me palavras de apoio. Um agradecimento especial às minhas amigas Mafalda Rocha e Maria João Xavier pela amizade e todas as aventuras vividas durante a minha estadia em Olhão.

A minha imensa gratidão à Marta Santos e à Ana Lopes que me acompanharam durante as atividades laboratoriais, por me fornecerem informações importantes, pela aprendizagem, por acreditarem no meu trabalho, pela constante disponibilidade, por toda a ajuda, por todas as horas ‘extras’ de trabalho e por toda a boa disposição presente durante todo este tempo.

Aos meus pais, pelos inúmeros sacrifícios suportados, pelo constante encorajamento, por me apoiarem incondicionalmente independentemente de tudo e de todos. Por me ensinarem a lutar, ser feliz e dedicada a fazer o que se gosta, pensando sempre na possibilidade de conseguir. Ao meu namorado Cláudio pelo apoio incondicional, amizade, incentivo constante. Obrigada, vocês são a minha fortaleza, o meu porto seguro e os meus maiores incentivadores.

A toda a minha família, pelo apoio, histórias, telefonemas e preocupação constante.

Eternos agradecimentos aos amigos de sempre, mas em especial à Joana Granadas, Ana Mourão e Cátia Graça por compreenderem as ausências e tornarem as presenças possíveis por via Skype, por nunca me deixarem desistir, pelas saídas, cafés e longas conversas. Vocês tornaram tudo mais fácil!

Em suma, a todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta tese, o meu *Muito Obrigada!*

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projecto ACIDLARVAE (PTDC/MAR-EST/4627/2012), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.



## ○ **Resumo**

Devido à acumulação atmosférica de CO<sub>2</sub> antropogénico, a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>) na água do mar aumenta e o pH diminui. Atualmente, este processo conhecido como a acidificação dos oceanos, está a ocorrer a um ritmo mais rápido do que em qualquer outro momento dos últimos 300 milhões de anos, o que leva a um desafio ecológico para os organismos marinhos a nível mundial. Embora este processo afete significativamente mais os organismos marinhos que sintetizam exosqueletos de calcário ou conchas, ainda não está claro como este processo irá afetar organismos calcificados internamente, tais como peixes marinhos. Embora se pense que os peixes adultos são relativamente mais tolerantes a níveis elevados de CO<sub>2</sub> ambiental, sabe-se muito pouco sobre a sensibilidade dos estágios iniciais de vida, que são geralmente mais vulneráveis às mudanças ambientais do que os juvenis e os adultos. Determinar que espécies marinhas são sensíveis ou tolerantes aos elevados níveis de CO<sub>2</sub> e redução do pH é fundamental para prever os impactos da acidificação dos oceanos nas cadeias alimentares marinhas e nos ecossistemas nos próximos 300 anos.

O presente estudo aborda o efeito da acidificação dos oceanos sobre os estágios iniciais de desenvolvimento de três espécies comercialmente importantes, *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus*, *Argyrosomus regius*. Estas espécies foram sujeitas a diferentes níveis de pH e pCO<sub>2</sub> (pH 8.0, ~400 µatm; pH 7.8, ~1000 µatm; pH 7.6, ~2000 µatm) desde a fase do ovo até à abertura de boca. Os resultados deste estudo sugerem que a exposição das fases iniciais de vida de *Solea senegalensis* e *Diplodus sargus* a elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> podem levar a taxas de eclosão e crescimento reduzidas e taxas de sobrevivência e peso seco elevados. Quando comparado com os níveis atuais de pCO<sub>2</sub> (400 ppm), a exposição de embriões *Argyrosomus regius* a 1000 µatm aumentou a sua sobrevivência, crescimento e comprimento total ao fim de 3 dias após eclosão. Não se detetaram diferenças significativas entre tratamentos no que respeita à organogénese e às dimensões e morfologia do ovo.

De uma forma geral, este estudo parece indicar que *Diplodus sargus* e *Solea senegalensis* são substancialmente mais suscetíveis aos efeitos fisiológicos da acidificação dos oceanos do que *Argyrosomus regius* que está presumivelmente melhor adaptada às variações das condições ambientais, devido ao seu rápido desenvolvimento e ampla distribuição geográfica.

- **Palavras-Chave:** Acidificação dos Oceanos, *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus*, *Argyrosomus regius*, Embriogénese, Desenvolvimento Larvar

- **Abstract**

Due to the accumulation of atmospheric anthropogenic CO<sub>2</sub>, partial pressure of carbon dioxide (pCO<sub>2</sub>) in sea water increases and pH decreases. This process, known as ocean acidification is occurring at a faster pace than at any time in the last 300 million years leading to an ecological worldwide challenge to marine organisms. While this process affects significantly more marine organisms that synthesize limestone shells or exoskeletons, it remains unclear how this process will affect calcifying organisms with internal calcification, such as marine fish. Although it's is believed that the adult fish are relatively more tolerant to high levels of CO<sub>2</sub> in the environment, very little is known about the sensitivity of the early stages of life, which are generally more vulnerable to environmental changes than juveniles and adults. Determine which marine species are sensitive or tolerant to high levels of CO<sub>2</sub> and pH reduction is critical for predicting the impacts of ocean acidification on marine food webs and ecosystems over the next 300 years.

This study addresses the effect of ocean acidification on the early stages of development of three importante comercial species, *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus*, *Argyrosomus regius*. These species were subjected to different levels of pH and pCO<sub>2</sub> (pH 8.0, ~400 μatm; pH 7.8, ~1000 μatm, pH 7.6, ~2000 μatm) since the egg stage til mouth opening. The results suggests that exposure of early life stages of *Solea senegalensis* and *Diplodus sargus* to high CO<sub>2</sub> concentrations will cause reduced hatching rates and growth and high survival rates and dry weight. When compared with the current levels of CO<sub>2</sub> (400 ppm), exposure of *Argyrosomus regius* embryos to 1000 μatm increased the survival, growth and the overall length after 3 days after hatching. No significant differences were detected among treatments in respect to organogenesis, the size and morphology of the egg.

This study suggests that *Diplodus sargus* and *Solea senegalensis* are substantially more susceptible to the physiological effects of ocean acidification than *Argyrosomus regius*, which is presumably better suited to changing environmental conditions due to it's rapid development and wide geographical distribution.

- **Keywords:** Ocean acidification, *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus*, *Argyrosomus regius*, embryogenesis, larval development



○ <b><u>Índice</u></b>	
1. Introdução.....	1
1.1- Acidificação dos Oceanos.....	2
1.2- Consequências da Acidificação dos Oceanos no Desenvolvimento Embrionário e Larvar de Peixes Marinhos.....	5
1.3- Embriogênese.....	7
1.4- Ontogênese Larvar.....	9
1.5- Organogênese.....	11
1.6- Caracterização de Espécies.....	12
1.6.1- Linguado ( <i>Solea senegalensis</i> , Kaup, 1858).....	12
1.6.2- Sargo ( <i>Diplodus sargus</i> , Linnaeus, 1758).....	13
1.6.3- Corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> , Asso, 1801).....	15
2. Objetivos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Origem do Material Biológico.....	17
3.2. Acondicionamento dos Ovos.....	18
3.3. Desenho Experimental.....	19
3.3.1- Descrição do Sistema Experimental.....	19
3.3.2- Tratamentos.....	20
3.3.3- Amostragens.....	22
3.4- Componente Analítica.....	22
3.4.1- Taxa de eclosão e sobrevivência.....	22
3.4.2- Biometria, Peso Seco e Taxa de Crescimento.....	22
3.4.3- Histologia.....	23
3.4.4- Organogênese.....	24
3.4.5- Análise Estatística.....	24
4. Resultados.....	26
4.1- Análise por Espécie.....	26
4.1.1- Linguado.....	26
4.1.1.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar.....	26
4.1.1.2- Organogênese.....	31
4.1.2- Sargo.....	33
4.1.2.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar.....	33

4.1.2.2- Organogénese.....	38
4.1.3- Corvina.....	40
4.1.3.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar.....	40
4.1.3.2- Organogénese.....	46
4.2- Análise Interspecífica.....	48
5. Discussão.....	51
6. Considerações finais.....	65
7. Perspetivas Futuras.....	66
8. Referências Bibliográficas.....	68
ANEXOS.....	84

o **Índice de Figuras**

<b>Figura 1.1-</b> Diagrama do ciclo de CO <sub>2</sub> entre a atmosfera e o oceano (Hoegh-Guldberg <i>et al.</i> , 2007).....	3
<b>Figura 1.2-</b> Valores médios da concentração de CO <sub>2</sub> atmosférico e pH da água do mar da superfície da água do mar (Fabry <i>et al.</i> , 2008).....	4
<b>Figura 1.3-</b> Desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Lithognathus mormyrus</i> da família Sparidae: Mórula (1-8), Blástula (9-10), Gástrula (11-12), Nêurula (13-14) (Firat <i>et al.</i> , 2005).....	8
<b>Figura 1.4-</b> Desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Lithognathus mormyrus</i> da família Sparidae: Final de Nêurula (1-6), Contrações musculares (6-8), Eclosão (9) (Firat <i>et al.</i> , 2005).....	9
<b>Figura 1.5-</b> Exemplar de linguado ( <i>Solea senegalensis</i> ).....	13
<b>Figura 1.6-</b> Exemplar de sargo ( <i>Diplodus sargus</i> ).....	14
<b>Figura 1.7-</b> Exemplar de corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ) .....	15
<b>Figura 3.1-</b> Ilustração esquemática do sistema experimental com diferentes níveis de pH .....	19
<b>Figura 3.2-</b> Variáveis morfológicas utilizadas para descrever o tamanho, forma, e o desenvolvimento das larvas.....	23
<b>Figura 4.1-</b> Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e de sobrevivência (B) (n= 100 larvas/ tratamento) das larvas de <i>Solea senegalensis</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	28
<b>Figura 4.2-</b> Diâmetro dos ovos de <i>Solea senegalensis</i> com 12 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH.....	28
<b>Figura 4.3-</b> Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de <i>Solea senegalensis</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	29
<b>Figura 4.4-</b> Secções longitudinais de 2 µm usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de <i>Solea senegalensis</i> . .....	31
<b>Figura 4.5-</b> Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e sobrevivência (B) (n=100 larvas/ tratamento) das larvas de <i>Diplodus sargus</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	35
<b>Figura 4.6-</b> Diâmetro dos ovos de <i>Diplodus sargus</i> , com 12 e 24 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH.....	35

<b>Figura 4.7-</b> Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de <i>Diplodus sargus</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	36
<b>Figura 4.8-</b> Secções longitudinais de 2 µm usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de <i>Diplodus sargus</i> .....	38
<b>Figura 4.9-</b> Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e sobrevivência (B) (n= 100 larvas/ tratamento) das larvas de <i>Argyrosomus regius</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	43
<b>Figura 4.10-</b> Diâmetro dos ovos de <i>Argyrosomus regius</i> com 12 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH .....	43
<b>Figura 4.11-</b> Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de <i>Argyrosomus regius</i> mantidas em diferentes níveis de pH.....	44
<b>Figura 4.12-</b> Secções longitudinais de 2 µm usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de <i>Argyrosomus regius</i> . .....	46
<b>Figura 4.13-</b> Razão entre a área do saco vitelino (ASV) e o comprimento standard (CS <sup>2</sup> ) à eclosão (0 DAE) das três espécies em estudo.....	48
<b>Figura 4.14-</b> Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) para a eclosão das diferentes espécies em estudo com os respetivos tratamentos referentes às variáveis morfométricas.....	49
<b>Figura 4.15-</b> Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) para a abertura de boca das diferentes espécies em estudo com os respetivos tratamentos referentes às variáveis morfométricas. ....	50



o **Índice de Tabelas**

<b>Tabela I-</b> Datas de receção das posturas das diferentes espécies, com as respetivas temperaturas e taxa de viabilidade dos ovos (%).....	17
<b>Tabela II-</b> Estados de desenvolvimento dos ovos das diferentes espécies quando foram recolhidos do coletor.....	18
<b>Tabela III-</b> Quantidade de ovos incubados em aquários de 35L das posturas utilizadas e testadas em diferentes níveis de pH.....	18
<b>Tabela IV-</b> Resumo dos parâmetros (média $\pm$ desvio-padrão) de água salgada no controlo e tratamentos acidificados.....	21
<b>Tabela V-</b> Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Solea senegalensis</i> , incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.....	27
<b>Tabela VI-</b> Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de <i>Solea senegalensis</i> em diferentes níveis de pH. ....	30
<b>Tabela VII-</b> Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Diplodus sargus</i> , incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.....	34
<b>Tabela VIII-</b> Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de <i>Diplodus sargus</i> em diferentes níveis de pH. ....	37
<b>Tabela IX-</b> Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de <i>Argyrosomus regius</i> , incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.....	42
<b>Tabela X-</b> Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de <i>Argyrosomus regius</i> em diferentes níveis de pH. ....	45



o **Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera

EPPO- Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

ISPA- Instituto Superior de Psicologia Aplicada

FAO- Food and Agriculture Organization

SPSS- Statistical Package for the Social Sciences

IPCC- International Panel on Climate Change

AO- Acidificação dos Oceanos

DAE- Dias Após Eclosão

$\rho\text{CO}_2$ - Pressão atmosférica de dióxido de carbono

$\text{CO}_2$ - Dióxido de Carbono

T- Temperatura

AT- Alcalinidade Total

ARC- Após Recolha do Coletor

ACP- Análise de Componentes Principais



## **1. Introdução**

Os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico têm vindo a aumentar significativamente na atmosfera terrestre, cerca de 280 ppm (partes por milhão) para cerca de 390 ppm desde os últimos 150 anos e prevê-se que continuem a subir, podendo atingir valores acima dos 1000 ppm em 2100 (Caldeira & Wickett, 2005; Feely *et al.*, 2010; Kroeker *et al.*, 2013).

O aumento do CO<sub>2</sub> na atmosfera conduz a um aumento da pressão parcial do CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) da água do mar conduzindo a uma alteração química do carbonato, que resulta na diminuição do pH, e por conseguinte na acidificação da água (Caldeira & Wickett, 2005; Borges & Gypens, 2010). Estas variações vão ter graves consequências ecológicas no nosso planeta, podendo causar uma perda global de biodiversidade, distúrbios nos processos dos ecossistemas e redução de bens e serviços ecológicos úteis ao Homem (Kroeker *et al.*, 2010; Kikkawa *et al.*, 2003). Nos organismos marinhos, as consequências poderão ser drásticas, como por exemplo, diminuição das taxas de calcificação, alterações de processos fisiológicos e, também, variações no comportamento de alguns peixes (Ben-Asher *et al.*, 2013; Franke & Clemmesen, 2011; Kroeker *et al.*, 2010; Basallote *et al.*, 2012; Fabry *et al.*, 2008).

Uma vez que as fases iniciais de vida dos peixes marinhos são mais vulneráveis às mudanças do ambiente, o mais provável é que os efeitos da acidificação sejam detetados mais facilmente nestes estágios do ciclo de vida (Franke & Clemmesen, 2011; Munday *et al.*, 2011; Kroeker *et al.*, 2010). É portanto, fundamental compreender as consequências de um meio mais ácido no desenvolvimento embrionário e larvar, que, por sua vez, podem refletir-se nas populações adultas (Kikkawa *et al.*, 2003).

Estudos recentes, em peixes marinhos demonstraram que o aumento do CO<sub>2</sub> e a consequente diminuição do pH podem ter efeitos prejudiciais no comportamento larvar, organogénese e respostas sensoriais das fases iniciais de vida destes peixes, afetando a sua morfologia, órgãos, esqueleto e até mesmo o sentido de orientação (Baumann *et al.*, 2011; Frommel *et al.*, 2011; Munday *et al.*, 2010).

O conhecimento dos efeitos das alterações ambientais no período de organogénese são particularmente relevantes porque estas alterações podem afetar a sobrevivência dos estados larvares e, conseqüentemente, pôr em risco a população de uma determinada espécie (Papadakis *et al.*, 2013; Ribero *et al.*, 1999; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003). Por isso, é importante avaliar qual o impacto da acidificação desde a embriogénese em peixes marinhos.

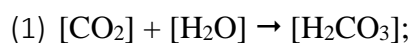
## **1.1- Acidificação dos Oceanos**

Desde o início da revolução industrial, os níveis atmosféricos de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) têm vindo a aumentar a uma taxa muito elevada, cerca de 40%, devido às atividades antropogénicas como a queima de combustíveis fósseis, a agricultura e a desflorestação (Feely *et al.*, 2010; Borges & Gypens, 2010; Lachkar, 2014; Caldeira & Wickett., 2003). Como consequência, tem-se assistido ao aquecimento global e à acidificação dos oceanos, que são cada vez mais reconhecidos como importantes propulsores da mudança nos sistemas biológicos, estimulando um considerável interesse científico e social (Fabry *et al.*, 2008; Caldeira & Wickett., 2005; Feely *et al.*, 2004, 2010). A acidificação dos oceanos (AO), causada pela libertação de CO<sub>2</sub> para atmosfera (Caldeira & Wickett, 2003), resulta num aumento da pressão parcial do CO<sub>2</sub> na superfície do oceano (pCO<sub>2</sub>) (Caldeira & Wickett, 2005), tornando-se uma das ameaças antropogénicas mais problemáticas para os ecossistemas marinhos (Fabry *et al.*, 2008, 2009; Feely *et al.*, 2010, Hendricks *et al.*, 2010).

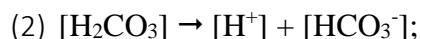
De salientar, que os níveis de CO<sub>2</sub> previstos para o fim do século vão provocar maior acidez da água do mar em zonas estuarinas e costeiras do que em mar aberto (Lachkar, 2014), devido a condições de alcalinidade específicas e ao afloramento de água rica em CO<sub>2</sub> e pobre em oxigénio (Cossarini *et al.*, 2014). Como consequência, o aumento dos níveis de acidificação pode assumir dimensões ainda mais graves nas zonas costeiras, pois é onde grande parte dos recursos marinhos vivos comercialmente extraíveis residem (Borges & Gyoens, 2010).

Os oceanos são um reservatório de carbono natural e até agora têm absorvido cerca de metade de todo o CO<sub>2</sub> antropogénico produzido (Wood *et al.*, 2008; Fabry *et al.*, 2008). Nas últimas décadas, apenas metade do CO<sub>2</sub> libertado pela atividade humana manteve-se na atmosfera, cerca de 30% foi absorvido pelo oceano e 20% pela biosfera terrestre (Feely *et al.*, 2010; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007; Caldeira & Wickett., 2003).

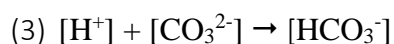
Na atmosfera, o CO<sub>2</sub> é um gás quimicamente inerte, mas quando dissolvido na água, torna-se mais reativo e envolve-se em várias reações físicas, químicas e biológicas. O CO<sub>2</sub> absorvido pelo oceano reage com as moléculas de água (H<sub>2</sub>O, formando ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):



O ácido carbónico dissocia-se produzindo iões de hidrogénio ( $H^+$ ) e iões bicarbonato ( $HCO_3^-$ ):



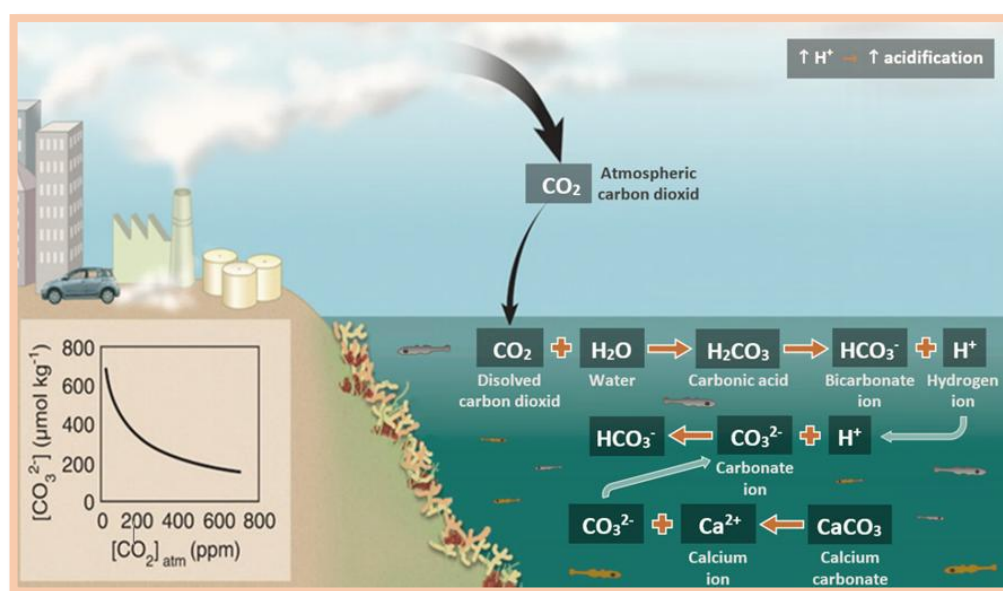
Devido ao aumento dos iões de hidrogénio, os iões carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) reagem com os iões hidrogénio, formando  $HCO_3^-$ .



Assim, a dissolução do  $CO_2$  na água do mar leva a um aumento da concentração de iões hidrogénio, e a uma diminuição dos iões carbonato ( $CO_3^{2-}$ ), aumentando assim a acidez do mar (Doney *et al.*, 2009; Feely *et al.*, 2004, 2009; Ries *et al.*, 2015). Esta diminuição dos iões carbonato, impede a formação de minerais de carbonato e promove a sua dissolução, ocorrendo a reação de equilíbrio:



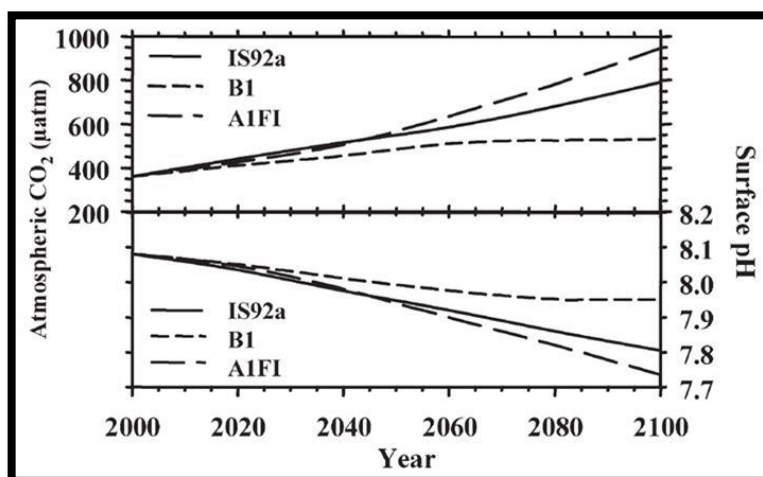
Por isso, o aumento da pressão parcial do  $CO_2$  dissolvido ( $pCO_2$ ) resultará numa redução do valor de pH (Borges & Gypens, 2010), da concentração de iões carbonato ( $CO_3^{2-}$ ) e de carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ) no estado de saturação, como se pode observar na figura 1.1 (Waldbusser & Salisbury, 2014; Pörtner, 2008; 2009; Orr *et al.*, 2005; Feely *et al.*, 2004).



**Figura 1.1-** Diagrama do ciclo de  $CO_2$  entre a atmosfera e o oceano (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007).

Embora a concentração de CO<sub>2</sub> nos últimos 650 000 anos tenha vindo a variar entre 180 e 300 ppm, atualmente a concentração média de CO<sub>2</sub> atmosférico é de aproximadamente 391 ppm, níveis que agora excedem em muito os dos últimos anos (Caldeira & Wickett, 2005; Orr *et al.*, 2005; Feely *et al.*, 2009) e está a crescer a uma taxa de 0,5 % por ano (Fabry *et al.*, 2008; Caldeira & Wickett, 2005), acelerando as mudanças climáticas globais e alterando as propriedades químicas do próprio mar (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007).

As previsões, baseadas em cenários realistas para as emissões futuras de CO<sub>2</sub> estimam que vão aumentar para 800 ppm durante este século (Solomon *et al.*, 2014; Fabry *et al.*, 2008; Doney *et al.*, 2009) e, potencialmente, para 1000 ppm até ao ano de 2100. Consequentemente, o pH do mar irá diminuir mais entre 0,3-0,4 unidades até 2100 (Caldeira & Wickett, 2005), o que corresponde a um aumento de 100% da [H<sup>+</sup>] na água do mar, fazendo com que os oceanos se tornem menos alcalinos do que nos últimos milhões de anos (Harley *et al.*, 2009; Cossarini *et al.*, 2014; Guinotte & Fabry, 2008). O pH da água do mar varia entre 7,8 e 8,2 e atualmente o pH está, em média, 0,1 unidades abaixo do que era antes da revolução industrial (figura 1.2) (Guinotte & Fabry, 2008; Fabry *et al.*, 2008).



**Figura 1.2-** Valores médios da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e pH da água do mar da superfície da água do mar (Fabry *et al.*, 2008)

Os mecanismos de feedback biológicos podem amenizar estas diminuições do pH e alterações de parâmetros do sistema carbonado. Assim, o futuro da acidificação dos oceanos ainda tem potencial para reestruturar os ecossistemas marinhos, não afetando negativamente todos os organismos (Melzner *et al.*, 2009).



Um organismo pode ser afetado pela acidificação do oceano de duas formas: em primeiro lugar, através da redução de pH e em segundo lugar por meio do aumento da  $\rho\text{CO}_2$  (hipercapnia) (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008; Hayashi *et al.*, 2004). A hipercapnia, bem como a hipoxia, pode levar à diminuição da velocidade do metabolismo (Michaelidis *et al.*, 2007; Moran & Støttrup, 2011), envolvendo diversos processos fisiológicos, como o pH reduzido no cérebro, a regulação ácido-base e o mau funcionamento cardiovascular (Hayashi *et al.*, 2004; Metzger *et al.*, 2007; Vaquer-Sunyer & Duarte *et al.*, 2008).

Pelo acima exposto, a AO tornou-se uma área prioritária de pesquisa, de forma a determinar como os organismos marinhos são afetados. Os organismos marinhos variam amplamente as suas respostas à acidificação dos oceanos, em parte devido à grande variedade de processos afetados (por exemplo, as taxas de dissolução e de calcificação, taxas de crescimento, desenvolvimento e sobrevivência), tornando-se difícil de prever como os ecossistemas marinhos irão responder à acidificação dos oceanos (Kroeker *et al.*, 2010; Frommel *et al.*, 2013).

## **1.2- Consequências da Acidificação dos Oceanos no Desenvolvimento Embrionário e Larvar de Peixes Marinhos**

Existe uma crescente preocupação de que o contínuo aumento de  $\text{CO}_2$  atmosférico durante o próximo século poderá ter impactos significativos sobre uma grande variedade de espécies marinhas, não apenas naquelas com esqueletos calcificados (Munday *et al.*, 2009; Pope *et al.*, 2014), mas também nos peixes, que são um grupo proeminente de fauna marinha e constituem uma importante fonte de proteína em muitos países (Kikkawa *et al.*, 2003).

De acordo com Ishimatsu *et al.* (2004), os primeiros estágios de desenvolvimento de peixes, como a fase embrionária e a fase larvar, são geralmente mais suscetíveis e vulneráveis a pressões do ambiente do que os adultos, pois os ovos e as larvas possuem uma menor área de superfície e carecem de mecanismos de homeostasia especializados que ainda não estão totalmente desenvolvidos (Pope *et al.*, 2014; Hurst *et al.*, 2013; 2015). Por exemplo, as larvas à eclosão perdem a sua membrana protetora e ficam totalmente expostas a potenciais agentes tóxicos (Arufe *et al.*, 2004) e é nestes estágios iniciais de vida que ocorrem mudanças estruturais e funcionais significativas em órgãos,

tecidos e sistemas orgânicos necessários para o estabelecimento e manutenção da homeostasia animal (Dunaevskaya *et al.*, 2012; Yúfera *et al.*, 2004).

Assim, os impactos negativos da  $\rho\text{CO}_2$  parecem ser particularmente mais fortes durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Munday *et al.*, 2009; Franke & Clemmesen, 2011; Kroeker *et al.*, 2010; Bignami *et al.*, 2014).

Não existem muitos estudos que tenham abordado os impactos da exposição de hipercapnia a longo prazo em estágios iniciais de desenvolvimento de peixes, no entanto, nos últimos 5 anos, foram publicados alguns trabalhos sobre as alterações da  $\rho\text{CO}_2$  a nível de comportamento, fisiologia e desenvolvimento larvar de peixes marinhos (Baumann *et al.*, 2011; Bignami *et al.*, 2013, 2014; Chambers *et al.*, 2014; Frommel *et al.*, 2013, 2014; Hurst *et al.*, 2013, 2015; Munday *et al.*, 2009, 2011). Alguns estudos mostram que os níveis de acidificação induzida por  $\text{CO}_2$  que podem ocorrer nos próximos 50-100 anos (pH -0,2 a -0,4 unidades) (Caldeira & Wickett, 2003) podem resultar em efeitos prejudiciais para a sobrevivência larvar, crescimento e desenvolvimento, metabolismo, capacidade de natação, deformação do esqueleto, crescimento dos otólitos e capacidade de detetar pistas olfativas, sensoriais e visuais de predadores (Ben-Asher *et al.*, 2013; Bignami *et al.*, 2013; 2014; Munday *et al.*, 2008; 2009; 2011; Dixson *et al.*, 2010; Hayashi *et al.*, 2004; Pope *et al.*, 2014; Devine *et al.*, 2011; Domenici *et al.*, 2015).

A sobrevivência dos peixes durante os estágios iniciais de desenvolvimento contribui para o tamanho da população de uma espécie, portanto, é importante avaliar a suscetibilidade a elevadas  $\rho\text{CO}_2$  durante as fases iniciais do desenvolvimento do peixe (Kikkawa *et al.*, 2003; Basallote *et al.*, 2012; Moran & Størrup, 2011; Frommel *et al.*, 2011, Munday *et al.*, 2011; Franke & Clemmesen, 2011).

### 1.3- Embriogénese

Hoje em dia, as atividades de cultivo de peixes requerem uma produção de grande número de ovos durante todo o ano. Como consequência, é necessário obter um melhor conhecimento dos processos de maturação, desova e incubação, a fim de assegurar uma produção regular de embriões viáveis (Devauchelle *et al.*, 1987; Firat *et al.*, 2005). Como os estágios embrionários e larvares constituem um período crítico durante a história da vida dos peixes, o sucesso e o progresso de larvicultura dependem especialmente de um conhecimento adequado da biologia e ecologia do desenvolvimento do embrião e larvas sob condições controladas (Antolovic *et al.*, 2010; Cerqueira *et al.*, 2005)

A embriogénese é considerada o período compreendido entre a fertilização e a eclosão do ovo (Kimmel *et al.*, 1995). A duração da embriogénese é influenciada pela temperatura, isto é, a temperaturas mais altas a duração é menor. De forma a normalizar o desenvolvimento embrionário a diferentes temperaturas é habitual indicarem-se os eventos neste período em horas-grau (HG), a qual é obtida pela soma das temperaturas da água, a cada hora, durante o evento (Godinho *et al.*, 2007).

Após a fertilização, o ovo absorve água e ocorre a formação do espaço peri-vitelino, com a separação entre o córion e a membrana vitelina. Os ovos dos peixes são telolécitos, com uma elevada concentração de vitelo, do qual o embrião se irá nutrir durante a embriogénese, assim como as larvas durante algum tempo após a eclosão (Firat *et al.*, 2005).

De acordo com Firat *et al.* (2005), espécies de peixes marinhos com ovos pelágicos apresentam um padrão de desenvolvimento embrionário semelhante, tendo-se utilizado a espécie *Lithognathus mormyrus* para ilustrar a embriogénese de peixes marinhos. A diferenciação começa com a fertilização, sendo de seguida possível identificar os diferentes estádios de desenvolvimento à lupa ótica (Figura 1.3): ovo recém-fertilizado, clivagem, mórula, blástula, gástrula, nêurula e eclosão.

- Ovo recém-fertilizado: Compreende a fase a partir da fertilização até à organização dos pólos animal (blastodisco) e vegetativo.

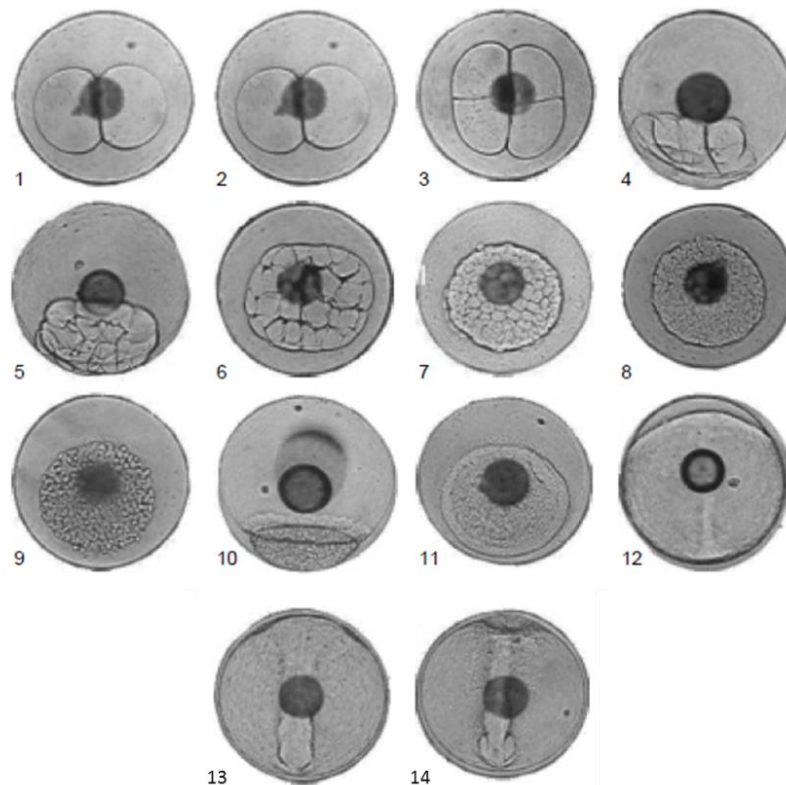
- Mórula: Caracterizada por clivagens sucessivas do blastodisco, originando os blastómeros. A primeira divisão ocorre 1h30min após a fertilização, resultando na formação de duas células ou blastómeros. Após 1h50min após a fertilização formam-se

4 células, em seguida 8 células (2h20min), 16 células (3h), 32 células (3h30min) e 64 células (4h20min após a fertilização).

- Blástula- Ocorre cerca de 6h após a fertilização e é a fase na qual o blastodisco apresenta-se estratificado e alto, com pequenas cavidades entre os blastómeros. Os blastómeros formam uma camada de células transparente e incolor no pólo animal, de modo a formar uma esfera oca.

- Gástrula: Cerca de 9h após a fertilização, as células do blastodisco deslocam-se e separam-se em epiblasto e hipoblasto (notocorda, meso e endoderme). O corpo do embrião alonga-se, ficando a extremidade caudal voltada para o blastóporo.

- Nêurula: Compreende a formação da mesoderme. A partir daí, a mesoderme induz a ectoderme a formar o canal neural. A conclusão do desenvolvimento embrionário dá-se com o processo organogénético, isto é, a formação de órgãos.

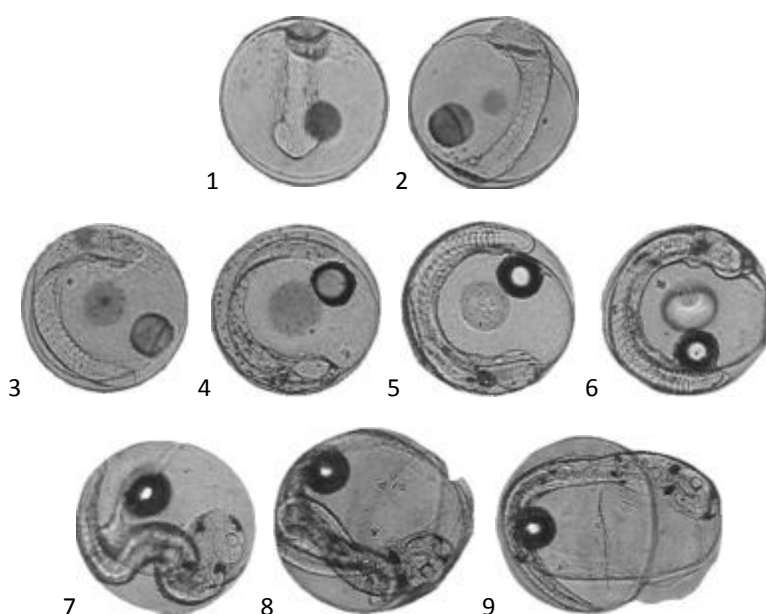


**Figura 1.3** – Desenvolvimento embrionário de ovos de *Lithognathus mormyrus* da família Sparidae: Mórula (1-8), Blástula (9-10), Gástrula (11-12), Nêurula (13-14) (Firat *et al.*, 2005).

#### 1.4- Ontogénese Larvar

Antes de ocorrer a eclosão, o processo de neurulação está praticamente completo (figura 4 (1-6)), e é evidente a presença de melanóforos ao longo do corpo e do saco vitelino. Nesta fase, é possível visualizar os olhos, batimento cardíaco, saco vitelino e pigmentação (Cerqueira, 2005).

A eclosão da larva (figura 1.4 (9)) ocorre através de fortes contrações musculares (figura 1.4 (7-8)) da cauda e do corpo, de seguida o embrião torna-se muito ativo, sendo o córion amolecido como resultado da ação de enzimas. O grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende da espécie e relaciona-se ao tamanho do ovo. O período de incubação depende desses fatores e da temperatura (Blaxter & Hempel, 1963).



**Figura 1.4** – Desenvolvimento embrionário de ovos de *Lithognathus mormyrus* da família Sparidae: Final de Nêurula (1-6), Contrações musculares (6-8), Eclosão (9) (Firat *et al.*, 2005).

Os registros dos seguintes eventos do desenvolvimento larvar são de relevância para a larvicultura: tamanho à eclosão, duração (absorção) do saco vitelino, pigmentação da retina, abertura da boca e do lúmen intestinal, flexão da notocorda, desenvolvimento das barbatanas, enchimento da bexiga gasosa e padrão de pigmentação cutânea (Godinho *et al.*, 2007).

Ao contrário de alguns peixes de desenvolvimento direto e longo período de incubação que apresentam larvas com morfologia e funcionamento de órgãos imediatamente à eclosão (Fernandez-Palacios *et al.*, 1994), as larvas de ovos pelágicos quando eclodem ainda não apresentam trato digestivo nem boca e ânus funcionais,

sendo uma larva muito rudimentar. Enquanto a íris dos olhos não tem pigmentação, os otólitos, o coração e o cérebro são claramente visíveis. Nesse período, poucos melanóforos são visíveis e a larva é muito transparente. A larva recém-eclodida apresenta um grande saco vitelino de forma elíptica, com uma única gota lipídica (Cerqueira, 2005). Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do saco vitelino, que é reabsorvido constantemente através de endocitose (Jug-Dujaković *et al.*, 1995).

O período de absorção do saco vitelino é vital para a larva pois nesse período o sistema digestivo ainda se encontra em diferenciação (Godinho *et al.*, 2003). Em muitas espécies, a maioria dos órgãos começa a ser funcional após a primeira alimentação e durante a diferenciação dos estágios larvais e de metamorfose (Fernandez-Palacios *et al.*, 1994).

O tempo de desenvolvimento de sistemas e órgãos segue padrões ontogenéticos de cada espécie e determina o momento em que os peixes irão adquirir a capacidade natatória, de fuga e de captura de seu próprio alimento (Koumoundouros *et al.*, 1996).

Tal como ocorre em outros animais, o sistema digestivo dos peixes é responsável pela ingestão e armazenamento de alimentos, quebra mecânica e hidrólise enzimática. A formação do sistema digestivo está entre as alterações morfológicas que mais influenciam a sobrevivência e crescimento dos peixes durante o início do ciclo de vida (Klimogianni *et al.*, 2011).

O estágio larvar pode durar de alguns dias a meses, dependendo da temperatura e também da espécie. Durante esse tempo, a larva duplica seu comprimento e aumenta o peso até 100 vezes (Devauchelle *et al.*, 1987). Ocorre diferenciação progressiva de caracteres adultos, tais como raios das barbatanas e ossificação do esqueleto. A larva passa por um processo de metamorfose até o período juvenil. Assim sendo, o juvenil assemelha-se a um pequeno adulto (Blaxter & Hempel, 1963).

A maioria dos estudos com larvas de peixes é voltada para a sistemática e filogenia, sem dar particular atenção ao desenvolvimento morfológico em relação à função. Estudos sobre larvas de peixes são necessários na compreensão do papel biológico dos caracteres larvais para a sobrevivência, principalmente de mecanismos funcionais relacionados a requerimentos vitais, como locomoção, alimentação e respiração (Machinandiarena *et al.*, 2003).

## 1.5- Organogénese

O sucesso da larvicultura marinha depende essencialmente de um conhecimento adequado do desenvolvimento funcional do sistema digestivo e das necessidades nutricionais das larvas, bem como do controlo de possíveis patologias que ocorrem durante a fase larvar (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003). A fase larval é um período crítico durante o desenvolvimento do início da vida, porque, nessa fase, as mudanças estruturais e funcionais significativas ocorrem em órgãos, tecidos e sistemas (Dunaevskaya *et al.*, 2012). Neste contexto, uma descrição histológica e histoquímica do sistema digestivo das larvas representa o primeiro passo para a determinação das relações funcionais entre a alimentação e assimilação (Micale *et al.*, 2008; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003).

A histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos animais e vegetais. Tanto a zoologia quanto a botânica apresentam nomenclaturas especiais (Tim, 2005). Neste estudo a metodologia utilizada será a histologia de larvas, que inclui técnicas de histologia animal, como recolha e fixação das larvas, inclusão em historesina, microtomia, coloração com hematoxilina-eosina e montagem das lâminas.

A organogénese do sistema digestivo tem sido investigada num número de espécies de peixes ósseos comercialmente valiosas, incluindo o pregado, bacalhau, solha, dourada, arenque, robalo, sargo e pargo (Micale *et al.*, 2008). Geralmente, durante a incubação os teleósteos apresentam um trato digestivo indiferenciado, sem qualquer abertura para o exterior, que se desenvolve nos dias seguintes para estar pronto para a digestão no início da alimentação exógena. Enquanto isso, a energia necessária para o metabolismo de manutenção, atividade de natação e de crescimento é obtida a partir das reservas do saco vitelino (Darias *et al.*, 2007).

A organogénese pode ser afetada pela história de vida dos peixes e por uma série de fatores abióticos e bióticos, incluindo a temperatura da água, o pH, a disponibilidade de oxigénio e de alimento (Dunaevskaya *et al.*, 2012). Com o aumento dos níveis de CO<sub>2</sub> na atmosfera, alguns autores têm descrito as alterações morfológicas e histológicas que ocorrem durante a ontogenia das larvas de algumas espécies (Chambers *et al.*, 2014). No entanto, existem variações entre espécies no momento da formação de órgãos, desenvolvimento, e da funcionalidade (Dunaevskaya *et al.*, 2012; Micale *et al.*, 2008).

Neste sentido, torna-se necessária a realização de estudos de organogénese específica para cada espécie de forma a verificar quais os efeitos das alterações ambientais em larvas de peixes marinhos, adaptando as condições de cultivo às alterações do meio ambiente (Darias *et al.*, 2007; Dunaevskaya *et al.*, 2012), que num futuro próximo pode pôr em risco as populações de peixes.

## **1.6- Caracterização das Espécies**

As espécies em estudo são o Linguado (*Solea senegalensis*), o Sargo (*Diplodus sargus*) e a Corvina (*Arygrosomus regius*), que são peixes de grande importância na aquacultura do Mediterrâneo, tornando-se importantes modelos de pesquisa (Andrades *et al.*, 1996), devido à sua fácil adaptação ao cativeiro e ao seu bom desempenho do crescimento (Abellan & Garcia-Alcazar, 1995; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003).

Todas as espécies em estudo apresentam ovos e larvas pelágicas, mas quando passam a pós-larvas assentam em áreas bentónicas pouco profundas, adquirindo diferentes hábitos alimentares à medida que se vão desenvolvendo (Morato *et al.*, 2003; Mouine *et al.*, 2007), sendo o sargo uma espécie omnívora (FAO, 2014b), a corvina uma espécie muito voraz e carnívora (Mylonas *et al.*, 2013) e o linguado omnívoro, com tendência a ser também herbívoro (Dinis *et al.*, 1999).

### **1.6.1- Linguado (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858)**

O Linguado, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) (figura 1.5), é um Pleuronectiforme pertencente à família Soleidae. É uma espécie muito cultivada em aquacultura extensiva em Portugal e Espanha, de elevado valor económico (Wunderink *et al.*, 2011; Borges *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2002; Imsland *et al.*, 2003; Dinis *et al.*, 1999; Drake *et al.*, 1984). Esta espécie tornou-se prioritária para a diversificação da aquacultura nos países banhados pela costa mediterrânea (Dinis *et al.*, 1999; FAO, 2014a). Apesar da cultura desta espécie estar tecnicamente dominada, ainda existem elevadas taxas de mortalidade, o que tem impedido o desenvolvimento da cultura de linguado a nível comercial (Conceição *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2002, 1999; Dinis *et al.*, 1999, 1992).





**Figura 1.5-** Exemplar de linguado (*Solea senegalensis*)

Os linguados adultos vivem em águas marinhas próximo da costa a 80 metros de profundidade e preferem substrato de areia. É um peixe gonocórico, ovíparo, sendo os ovos fertilizados externamente. A maturação sexual ocorre aos 2-3 anos de vida com um comprimento médio de 30cm. A época de postura estende-se por um período de 4 meses, Abril a Julho com um máximo de emissão de ovos em Maio (Dinis, 1986).

As larvas são planctónicas e levam uma vida pelágica durante 15 a 20 dias. Ao terminarem a metamorfose, os juvenis tornam-se bentónicos e penetram no interior dos estuários e lagoas costeiras procurando os fundos arenosos de águas salobras. A metamorfose das larvas para o estágio juvenil dá-se na Primavera e no princípio do Verão, permanecendo em zonas de menor profundidade, até finais do Verão e início do Outono. Quando a temperatura da água começa a diminuir estes indivíduos refugiam-se nas zonas mais profundas do estuário, onde as temperaturas são mais amenas, até ao início da Primavera. Os juvenis podem permanecer no ambiente estuarino entre 2 a 3 anos (Koutsikopoulos *et al.*, 1989), após esse período migram para o mar.

#### **1.6.2- Sargo (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758)**

A espécie *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758) (figura 1.6), de nome vulgar Sargo, é um peixe teleósteo pertencente à ordem dos perciformes e à família Sparidae. É um peixe bento-pelágico que se encontra normalmente em zonas costeiras e distribui-se pelas costas do Mediterrâneo, Índico e Atlântico. Foram encontrados indivíduos a norte da baía da Biscaia em 2007, o que pode indicar uma expansão para norte da área de distribuição da espécie, possivelmente relacionada com as alterações climáticas (Chanet & Dettai, 2008).

O sargo é uma espécie Mediterrânica com alto valor comercial, verificando-se, por vezes, preços superiores aos da dourada e do robalo (Sá *et al.* 2008). Tem atraído um elevado interesse junto dos piscicultores desde a década de 1980 (Golomazou *et al.*,

2006), visto considerar-se um alvo potencial para a diversificação da aquacultura. As técnicas de produção necessárias nesta espécie são semelhantes às desenvolvidas para os Sparídeos (*Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*) já utilizados em aquacultura (Abellan & Basurco, 1999; Pérez *et al.*, 2008), favoráveis à sua criação em cativeiro, nomeadamente no que se refere a taxas de sobrevivência e índices de crescimento, sendo as épocas de reprodução diferentes da dourada e do robalo (Pousão-Ferreira *et al.*, 1997).



**Figura 1.6-** Exemplar de sargo (*Diplodus sargus*)

Em termos reprodutivos, é uma espécie hermafrodita protândrica, com fertilização externa- os machos podem converter-se em fêmeas quando o número destas é demasiado baixo. Esta estratégia permite assegurar uma adequada proporção dos dois sexos, contribuindo para o sucesso reprodutor da espécie. A maturidade sexual ocorre aos 2 anos de idade com aproximadamente 17cm, e a reprodução ocorre entre Março e Junho (Morato *et al.*, 2003; Mouine *et al.*, 2007).

À semelhança de outros Sparídeos, o desenvolvimento ovocitário não é síncrono, apresentando posturas sucessivas durante a época reprodutiva. Os ovos são transparentes, as larvas são pelágicas e, decorrido um mês, as pós-larvas assentam em áreas bentónicas pouco profundas, onde permanecem durante vários meses.

São peixes demersais e usam os estuários com baixa salinidade e oxigénio dissolvido como maternidade (FAO, 2014b; Vinagre *et al.*, 2010), e os seus juvenis com 4,5-5cm habitam fundos rochosos e pradarias de ervas marinhas, encontrando-se em profundidades até aos 150 metros.

### 1.6.3- Corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801)

A corvina-legítima, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (figura 1.7) é um peixe teleósteo da família Sciaenidae, sendo considerado um dos maiores cienídeos a nível mundial (Quéméner *et al.*, 2002).

A corvina (*A. regius*) é atualmente uma espécie de interesse em todo o mediterrâneo com o intuito da sua produção comercial. As suas características biológicas qualificam-na como uma candidata de excelência para a diversificação da piscicultura marinha. É uma espécie de elevada fecundidade e amplamente distribuída com preços de mercado médio-altos (6 euros/kg) e boa aceitação por parte do consumidor (Poli *et al.*, 2003).



**Figura 1.7-** Exemplar de corvina (*Argyrosomus regius*)

Durante a época de reprodução, entre Abril e Junho, as corvinas alteram o seu comportamento e reúnem-se em grandes grupos para desovar. A desova ocorre em zonas costeiras ou em estuários. É uma espécie particularmente abundante na foz dos rios Garona (Pasquaud, 2006), Guadiana (Prista *et al.*, 2007) e Guadalquivir (Catalán *et al.*, 2006). A corvina é uma espécie semi-pelágica costeira, com tendência demersal (Quéro *et al.*, 1987), sendo facilmente encontrada em águas litorais até aos 80 m.

A evolução da organogénese do sistema digestivo da corvina (*A. regius*) foi descrita durante os primeiros 30 dias de vida por Cruz *et al.*, (2007) e durante os primeiros 60 dias de vida por Abreu *et al.*, (2009). Ambos os autores descrevem a corvina como uma espécie de rápido desenvolvimento larvar e muito suscetível aos parâmetros de criação durante a sua fase larvar, condicionando o seu crescimento.

Durante o crescimento larvar esta espécie apresenta taxas de sobrevivência muito elevadas, variando entre os 38% no dia de eclosão, 5% aos 15 DAE e 77% aos 70 DAE (Pousão-Ferreira *et al.*, 2010). Aos 30 DAE as corvinas (*A. regius*) podem alcançar 10 mg de peso seco, o quádruplo do peso de larvas de Dourada (*S. aurata*).

## **2. Objetivos**

Até agora, apenas alguns estudos se centraram no impacto da acidificação induzida por um aumento da  $p\text{CO}_2$  em estágios iniciais de desenvolvimento de teleósteos marinhos. Até à data, nenhum trabalho foi publicado sobre o efeito que a exposição a elevadas  $p\text{CO}_2$  tem sobre o desenvolvimento embrionário e larvar de sargo (*Diplodus sargus*) e corvina (*Argyrosomus regius*). Quanto ao linguado (*Solea senegalensis*) Pimentel *et al.* (2014) realizaram um estudo sobre o desenvolvimento do esqueleto quando sujeito à acidificação dos oceanos.

Neste sentido, o presente trabalho visa avaliar os efeitos das futuras alterações climáticas, mais concretamente o efeito da elevada pressão parcial de  $\text{CO}_2$  no desenvolvimento embrionário e condição de larvas recém-eclodidas de linguado, sargo e corvina, peixes de elevado interesse comercial (Kikkawa *et al.*, 2003; Marinaro, 2009). Especificamente, analisaram-se as consequências da acidificação na morfometria, taxas de eclosão, sobrevivência, crescimento e organogénese larvar das espécies-estudo, através de técnicas histológicas.

Os ovos e larvas recém-eclodidas das espécies-estudo foram expostos a diferentes tratamentos de acidificação, comparando-se o pH atual de uma área costeira-estuarina (controlo: 400  $\mu\text{atm}$ ; pH 8,0), com os piores cenários para o fim do século, sendo uma condição intermédia para 2100 (1000  $\mu\text{atm}$ ; pH 7,8) e a outra a condição extrema de acidificação para 2300 (2000  $\mu\text{atm}$ ; pH 7,6), previstos pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (Solomon *et al.*, 2014). A compreensão do impacto da acidificação dos oceanos sobre esses estágios iniciais de vida é fundamental para projetar com precisão a sensibilidade das espécies de peixes de importância comercial às alterações climáticas.


### **3- Material e Métodos**

#### **3.1- Origem do Material Biológico**

As posturas de diferentes espécies de peixes marinhos, Linguado (*Solea senegalensis*), Sargo (*Diplodus sargus*) e Corvina (*Argyrosomus regius*), foram obtidas a partir de lotes de reprodutores adaptados a cativeiro na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do IPMA, em Olhão. O período de recolha das posturas decorreu entre Fevereiro e Abril, tendo-se recolhidos 4 posturas de cada espécie (tabela I). Considerando a variação da temperatura ao longo da época de postura e o efeito que a temperatura tem no desenvolvimento embrionário foi decidido selecionar as posturas que apresentassem um padrão de sincronização de temperaturas mais próximas e de taxas de viabilidade dos ovos (%) mais elevadas. Desta forma a análise biométrica e histológica incidiu apenas em 2 posturas por espécie (tabela I). Após a recolha dos ovos, estes foram pesados, tendo-se separado a fração viável da inviável, por gravimetria, pesando-se a fração viável. Após este procedimento cerca de 30 a 40 g de ovos foram devidamente acondicionados, num recipiente próprio para transporte de ovos, em que 2/3 do volume foi preenchido com oxigénio. As posturas foram enviadas no próprio dia para as instalações do ISPA, em Lisboa, tendo os horários de envio e de receção sido os mesmos para as diferentes posturas.

**Tabela I-** Datas de receção das posturas das diferentes espécies, com as respetivas temperaturas e taxa de viabilidade dos ovos (%).

<b>Posturas</b>	<b>Data</b>	<b>Espécie</b>	<b>T °C</b>	<b>Taxa Viabilidade (%)</b>
1ª Postura	23-fev	<i>Solea senegalensis</i>	17,9	66,1
2ª Postura	02-mar	<i>Solea senegalensis</i>	18,8	41,7
3ª Postura	03-mar	<i>Solea senegalensis</i>	18,3	71,5
4ª Postura	12-mar	<i>Solea senegalensis</i>	17,9	86,2
1ª Postura	23-fev	<i>Diplodus sargus</i>	17,8	88,1
2ª Postura	11-mar	<i>Diplodus sargus</i>	18,5	82,1
3ª Postura	16-mar	<i>Diplodus sargus</i>	18,4	71,6
4ª Postura	19-mar	<i>Diplodus sargus</i>	18,2	61,3
1ª Postura	19-mar	<i>Argyrosomus regius</i>	18,6	88,2
2ª Postura	31-mar	<i>Argyrosomus regius</i>	19,5	91,5
3ª Postura	31-mar	<i>Argyrosomus regius</i>	19,5	85,2
4ª Postura	09-abr	<i>Argyrosomus regius</i>	19,1	76,9

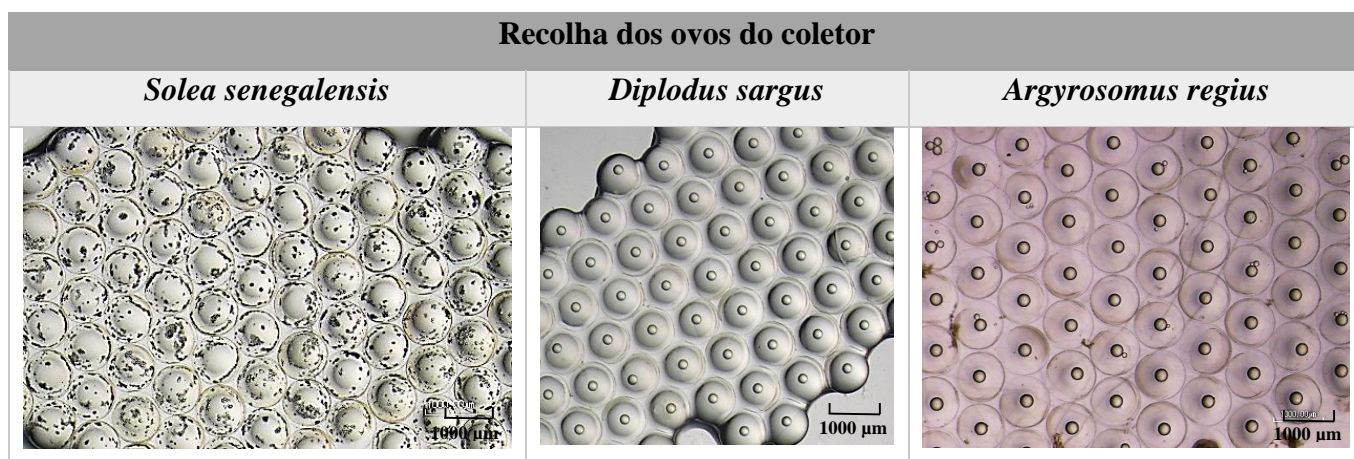
 - Representa as posturas utilizadas para testar a acidificação dos oceanos nos ovos e larvas das diferentes espécies.

### 3.2- Acondicionamento dos ovos

Para todas as posturas foi recolhida uma amostra de ovos na EPPO, antes do envio dos mesmos para Lisboa, para avaliar o estado de desenvolvimento (tabela II) de cada espécie, sendo que todos os ovos encontravam-se na fase de gástrula (às 10h da manhã do dia que a postura foi enviada para Lisboa) quando foram recolhidos do coletor. Este processo foi repetido à chegada ao ISPA (10h depois dos ovos terem sido recolhidos do coletor) antes de os ovos serem distribuídos por cada tratamento de pH.

Após a chegada dos ovos ao ISPA, estes foram distribuídos aleatoriamente por aquários de 35L em densidades semelhantes para cada tratamento de pH (tabela III).

**Tabela II-** Estados de desenvolvimento dos ovos das diferentes espécies quando foram recolhidos do coletor



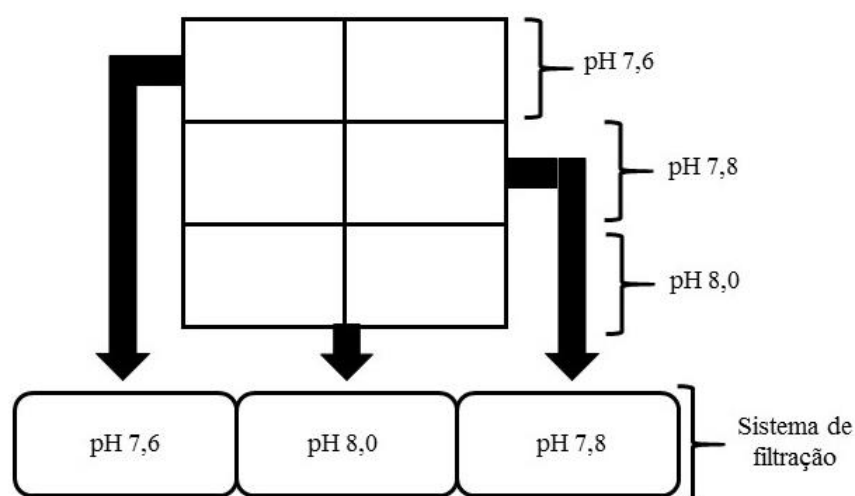
**Tabela III-** Quantidade de ovos incubados em aquários de 35L das posturas utilizadas e testadas em diferentes níveis de pH.

Espécie	Linguado			Sargo			Corvina		
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6
<b>Postura A</b>	8,8g	8,7g	8,8g	13,2g	13,2g	12,9g	14,3g	14,2g	13,7g
<b>Postura B</b>	13,3g	13,3g	13,6g	12,9g	12,7g	12,9g	12,2g	12,3g	12,1g

### 3.3- Desenho Experimental

#### 3.3.1- Descrição do Sistema Experimental

O sistema de ensaio consistiu em 3 sistemas de recirculação independentes de 200L, equipados com filtração biológica, mecânica, química, ultravioleta e refrigeração (HAILEA, HC-300A), mantidos em diferentes condições de pH. Cada sistema de filtração fornecia água para 2 aquários de 35L, onde os ovos e as larvas foram mantidos (figura 3.1).



**Figura 3.1-** Ilustração esquemática do sistema experimental com diferentes níveis de pH.

A água salgada artificial foi obtida em laboratório por combinação de uma mistura de sal comercial (tropical Marin®) com água doce filtrada. O tratamento controle foi estabelecido pela difusão do ar ambiente. As condições de acidificação foram simuladas pela injeção de CO<sub>2</sub>, através de um sistema eletrônico e de um controlador de pH (Tunze Aquarientechnik, Alemanha) que permitiu manter o pH no nível desejado. Os aquários foram fechados no topo com uma tampa de vidro para limitar as trocas de CO<sub>2</sub> com a atmosfera.

Os parâmetros da qualidade da água de cada tratamento foram monitorizados de forma independente uma vez por dia, usando um medidor portátil (SevenGo DuoPro, SG23) calibrado semanalmente com padrões estabelecidos (Mettle Toledo). Os níveis de oxigênio foram mantidos acima de 90% de saturação pela ação de mistura das bombas de difusão nos sistemas de filtração.

As amostras para determinação de alcalinidade total (AT) foram recolhidas semanalmente de cada sistema, e analisadas por titulação. A  $\rho\text{CO}_2$  foi calculada utilizando os dados de alcalinidade total e pH no software CO<sub>2</sub>SYS, com as constantes de Mehrbach *et al.* (1973) adaptadas por Dickson & Millero (1987). Os parâmetros estimados da água durante as experiências estão registados na tabela IV.

### 3.3.2-Tratamentos

Os ovos e as larvas foram sujeitos a três tratamentos com diferentes valores de pH: controlo (pH ~ 8.0), intermédio (pH ~ 7.8) e extremo (pH ~ 7.6). Estes cenários de acidificação são representativos das condições de pH atuais e as esperadas para o futuro em muitas zonas costeiras, correspondendo o controlo a ~ 400  $\mu\text{atm}$   $\rho\text{CO}_2$  atmosférica (Solomon *et al.*, 2007) e os tratamentos acidificados a ~ 1 000  $\mu\text{atm}$   $\rho\text{CO}_2$  e ~ 2 000  $\mu\text{atm}$   $\rho\text{CO}_2$ , valores previstos pelo Painel Intergovernamental para as alterações ambientais para os anos 2100 e 2300, respetivamente (Solomon *et al.*, 2014). As restantes condições ambientais foram mantidas em valores idênticos para os 3 tratamentos, nomeadamente temperatura constante de 18°C, salinidade de 35, fotoperíodo de 12h luz e 12h escuro usando luz fluorescente artificial.



**Tabela IV-** Resumo dos parâmetros (média  $\pm$  desvio-padrão) de água salgada no controlo e nos tratamentos acidificados.

Espécie	Linguado			Sargo			Corvina		
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6
<b>pH</b>	8,08 $\pm$ 0,01	7,84 $\pm$ 0,01	7,63 $\pm$ 0,02	8,02 $\pm$ 0,06	7,83 $\pm$ 0,03	7,66 $\pm$ 0,08	7,97 $\pm$ 0,01	7,85 $\pm$ 0,01	7,69 $\pm$ 0,05
<b>T (°C)</b>	17,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,2	17,9 $\pm$ 0,0	17,8 $\pm$ 0,1	18,0 $\pm$ 0,1	17,6 $\pm$ 0,3	17,6 $\pm$ 0,3	18,0 $\pm$ 0,3	17,7 $\pm$ 0,4
<b>Salinidade</b>	35,1 $\pm$ 0,4	35,2 $\pm$ 0,2	35,3 $\pm$ 0,2	35,3 $\pm$ 0,3	35,5 $\pm$ 0,5	35,3 $\pm$ 0,3	35,2 $\pm$ 0,1	35,0 $\pm$ 0,4	35,1 $\pm$ 0,2
<b>AT (<math>\mu</math>mol/kg)</b>	2721,6 $\pm$ 104,4	2915,0 $\pm$ 82,1	2671,9 $\pm$ 80,8	2782,1 $\pm$ 92,4	2822,9 $\pm$ 29,5	2759,4 $\pm$ 14,9	2763,7 $\pm$ 83,6	2581,8 $\pm$ 50,1	2646,7 $\pm$ 19,9
<b><math>\rho</math>CO<sub>2</sub> (<math>\mu</math>atm)</b>	572,2 $\pm$ 0,54	1204,2 $\pm$ 17,0	1937,0 $\pm$ 59,9	591,2 $\pm$ 32,8	1166,5 $\pm$ 34,7	1817,1 $\pm$ 295,1	784,0 $\pm$ 22,5	1041,1 $\pm$ 9,9	1551,6 $\pm$ 269,1

### 3.3.3- Amostragens

O desenvolvimento embrionário nos diferentes tratamentos foi acompanhado através de amostragens de 12 em 12 horas (n=50), desde a colocação dos ovos no sistema de acidificação das instalações do ISPA até à eclosão das larvas, tendo sido registadas apenas a fase de nêurula e a eclosão.

Para além da eclosão, as larvas foram ainda amostradas à abertura de boca (3 dias após eclosão). Em cada ponto de amostragem recolheram-se 50 larvas de cada espécie, de cada postura e de cada tratamento as quais foram utilizadas para a análise da morfologia e crescimento (n=30) e organogénese (n=20).

## 3.4- Componente Analítica

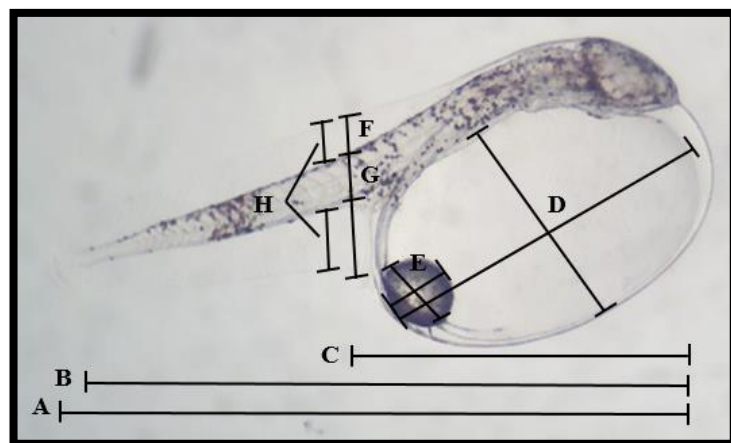
### 3.4.1- Taxa de eclosão e sobrevivência

Para determinação da taxa de eclosão, contabilizou-se o número de larvas eclodidas de um total de 50 ovos colocados num recipiente com cerca de 50mL de capacidade com o fundo de rede para permitir a circulação de água que ficava parcialmente submerso em cada aquário. Para determinação da taxa de sobrevivência contabilizou-se o número de larvas sobreviventes até à abertura de boca (dia 3), de um total de 100 larvas colocadas no mesmo tipo de recipiente em cada aquário.

### 3.4.2- Biometria, Peso Seco e Taxa de Crescimento

Para efeitos de biometria, 30 larvas de cada tratamento e de cada postura foram fotografadas *in vivo* numa lupa ótica (Olympus SZPT) com o software Motic Images Plus 2.0 ML. As larvas utilizadas para biometria foram também utilizadas para determinação do peso seco final, permitindo a determinação do crescimento ponderal.

Posteriormente foram efetuadas as seguintes medidas em cada larva (figura 3.2): a) comprimento total, b) comprimento standard, c) comprimento até ao ânus, d) área do saco vitelino, e) área da gota lipídica, f) altura total do corpo, g) altura massa muscular e h) largura membrana corporal. Estas medidas foram obtidas a partir da análise das fotografias com o programa Image J® (National Institutes of Health, USA).



**Figura 3.2-** Variáveis morfológicas utilizadas para descrever o tamanho, forma, e o desenvolvimento das larvas: A- Comprimento Total; B- Comprimento Standard; C- Comprimento até ao ânus; D- Área do Saco Vitelino; E- Área da Gota Lipídica; F- Altura Total do Corpo; G-Altura Massa Muscular; H- Largura Membrana Corporal

Após a foto, as larvas foram rapidamente passadas por água destilada, para remover o excesso de sal e congeladas de imediato num ultracongelador de -80°C (Cryocell) até posterior análise. Posteriormente as larvas foram liofilizadas e colocadas num exsiccador até ficarem à temperatura ambiente e de seguida pesadas numa balança Sarbrios Pro11.

A taxa de crescimento foi determinada através da fórmula:

$$\text{Taxa Crescimento (\%)} = \left( \frac{\text{Comprimento Standard Abertura Boca} - \text{Comprimento Standard Ecloração}}{3 \text{ dias}} \right) \times 100$$

### 3.4.3- Histologia

As larvas utilizadas para analisar a organogénese (n=20 larvas/ tratamento) foram fixadas durante 3 horas no fixador, composto por paraformaldeído tamponado a 10%, glutaraldeído, tampão cacodilato a 0,2M e água destilada. Após este período, fizeram-se 3 lavagens, com um intervalo de 1 hora, com tampão cacodilato a 0,1 M e por fim armazenaram-se as larvas em álcool a 70%, até posterior análise.

Para a inclusão em resina as amostras foram previamente desidratadas através de uma passagem por sequência de álcoois e posteriormente foram processadas de acordo com o kit de resina Technovit 7100 (Anexo I), deixando-se os blocos a polimerizar durante 2 dias à temperatura ambiente.

Os blocos obtidos foram colados a suportes de madeira (4x 2,8x 0,7cm) com a cola Historesin Mounting Media. Seguidamente, os blocos de resina foram cortados num

micrótomo Microm Leitz® HM340E, com uma espessura de 2 µm e posteriormente colocados em banho-maria circular Electrothermal®, a uma temperatura próxima dos 37°C, com o objetivo de esticar os cortes e melhorar a aderência à lâmina de microscopia.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (Anexo I). Depois de coradas, as lâminas foram montadas com DPX (meio de montagem) e após secagem do mesmo (aproximadamente 24h) procedeu-se à análise microscópica das lâminas, no microscópio Nikon® eclipse ci, tendo-se obtido fotografias através da câmara Nikon® DS-Fi2 acoplada ao microscópio ótico.

#### 3.4.4- Organogénese

Nas secções histológicas de larvas de Linguado, Sargo e Corvina analisou-se o desenvolvimento dos tecidos e dos órgãos à eclosão (0 DAE) e à abertura de boca (3 DAE). À eclosão observou-se com mais pormenor estruturas como o saco vitelino e o trato digestivo primordial. No momento da abertura de boca analisaram-se estruturas como o olho e o trato digestivo, mais concretamente o fígado, pâncreas, resíduos do saco vitelino e porções anterior e posterior do intestino.

#### 3.4.5- Análise Estatística

De forma a determinar o efeito dos tratamentos (pH 8,0; pH 7,8; pH 7,6) nas taxas de sobrevivência, crescimento, diâmetro dos ovos e a morfometria das larvas à eclosão e à abertura de boca foi realizada uma análise de variância (One-Way ANOVA) paramétrica, com um fator (de efeitos fixos) (Zar, 2010).

Sempre que os requisitos (normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias-Kolmogorov-Smirnov) relativos à execução deste método foram violados, o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi executado. Quando as diferenças foram estatisticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ), utilizou-se o teste de comparações múltiplas de *Tukey*. Adicionalmente para verificar se houve diferenças entre aquários (n=2) e entre posturas (n=2) nos diferentes tratamentos, utilizou-se o teste paramétrico *t-student* (Zar, 2010). Em todos os testes estatísticos realizados, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 (isto, é  $P \leq 0,05$ ). Todos os cálculos inerentes à análise estatística dos dados foram realizados através do *software* IBM SPSS Statistics 22.

Com o objetivo de avaliar o padrão de distribuição de cada espécie, de forma a identificar a relação entre as variáveis morfométricas (médias) e os diferentes níveis de pH, realizou-se uma análise de componentes principais (ACP). Este é um método exploratório que permite a associação entre variáveis, reduzindo a dimensão e redundância da matriz que contempla os dados da amostra. Os eixos (componentes principais) fornecem informações sobre os parâmetros que se evidenciam preponderantes para explicar o comportamento das espécies, e sem perda de informação relevante ao estudo. Todas as análises foram realizadas com recurso ao *software* Canoco for Windows 4.5 (Braak & Smilauer, 2002)

## **4. Resultados**

### **4.1- Análise por Espécie**

#### **4.1.1- Linguado**

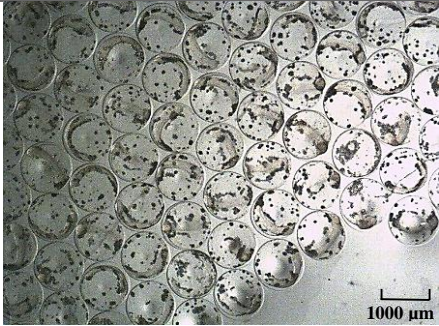
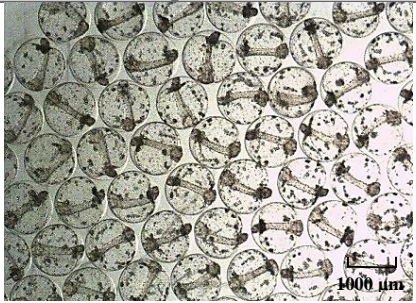
##### **4.1.1.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar**

Os ovos de linguado são esféricos e transparentes, apresentando várias gotas lipídicas indiferenciadas em cada ovo. O acompanhamento do desenvolvimento embrionário pode ser observado na tabela V. Após 10 horas da recolha do coletor, antes de serem colocados no sistema experimental, os ovos apresentam-se em fase de nêurula, ocorrendo nesta fase a formação da cápsula ótica e o aparecimento de pequenos melanóforos junto às gotas lipídicas, à zona da cabeça e ao longo do tronco do embrião. Observou-se também um alargamento do espaço peri-vitelino.

Às 22 horas após a recolha do coletor (ARC), no final da fase de nêurula, quando os ovos já estavam sujeitos a diferentes níveis de pH, o embrião já estava mais pigmentado, ocorrendo um alongamento da cauda do embrião e um posicionamento da gota lipídica junto ao ânus. Nesta fase, observaram-se batimentos cardíacos, um aumento do espaço peri-vitelino e movimentação da cauda dentro do córion. Do ponto de vista ventral era visível a cabeça, o corpo do embrião, o tubo neural, a notocorda, as lentes oculares, a região cardíaca e a pigmentação do corpo do embrião. Nesta etapa, não se detetaram diferenças morfológicas entre os diferentes tratamentos (tabela V).

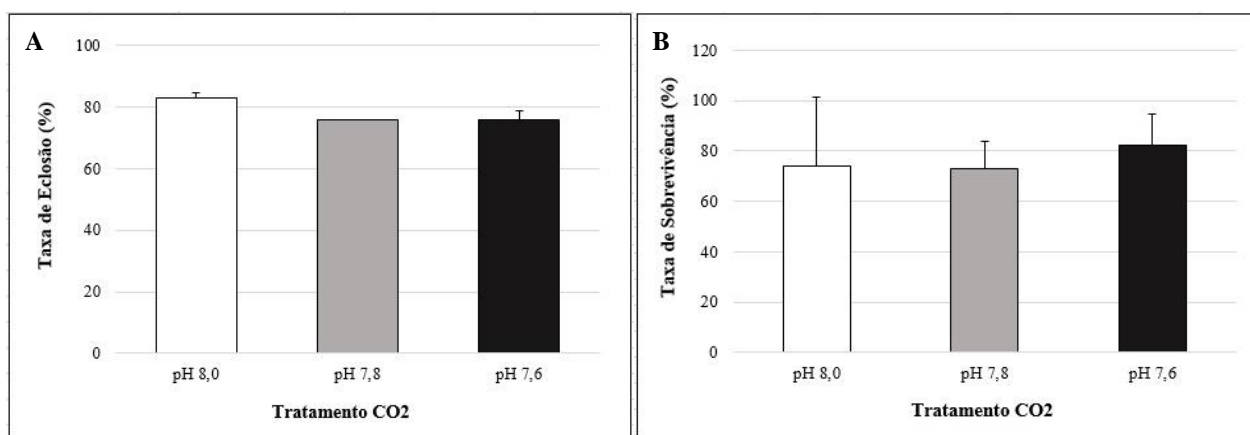
Aproximadamente 26 horas após a recolha dos ovos do coletor, registou-se uma atividade vigorosa dentro do ovo, ocorrendo a rutura do córion e a libertação do embrião, com a ajuda de sucessivas contrações com a cauda. As larvas recém-eclodidas têm um saco vitelino elíptico com diversas gotas lipídicas, mas ainda não têm a boca e o ânus funcionais, nem os olhos pigmentados, sendo uma larva muito rudimentar.

**Tabela V-** Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de *Solea senegalensis*, incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.

<i>Ovos Solea senegalensis</i>			
Horas de Amostragem	10h ARC		
Temperatura 18°C			
Tratamentos	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6
22h ARC			
Eclosão (26h ARC)			

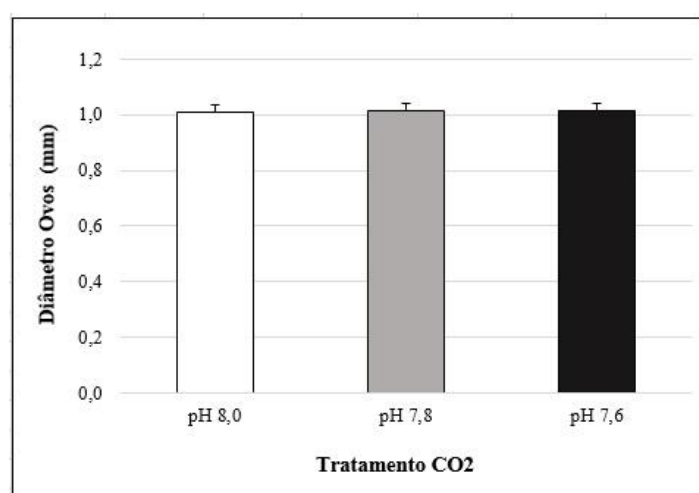
\*ARC- Após Recolha do Coletor

A taxa de eclosão das larvas de *Solea senegalensis* variou entre 76 e 83% entre os diferentes tratamentos (figura 4.1-A), observando-se que o tratamento de pH 8,0 foi o que apresentou uma taxa de eclosão mais elevada ( $83,00 \pm 1,41\%$ ). Quanto à taxa de sobrevivência (figura 4.1-B) registaram-se valores mais elevados no pH 7,6 ( $82,25 \pm 4,43\%$ ), ainda assim, a taxa de sobrevivência não apresentou alterações significativas ( $p= 0,80$ ) entre os diferentes tratamentos. Em anexo (II), é possível consultar a análise descritiva com as médias, os desvios-padrões e o *p-value* de cada tratamento para cada espécie.



**Figura 4.1-** Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e de sobrevivência (B) (n= 100 larvas/ tratamento) das larvas de *Solea senegalensis* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão.

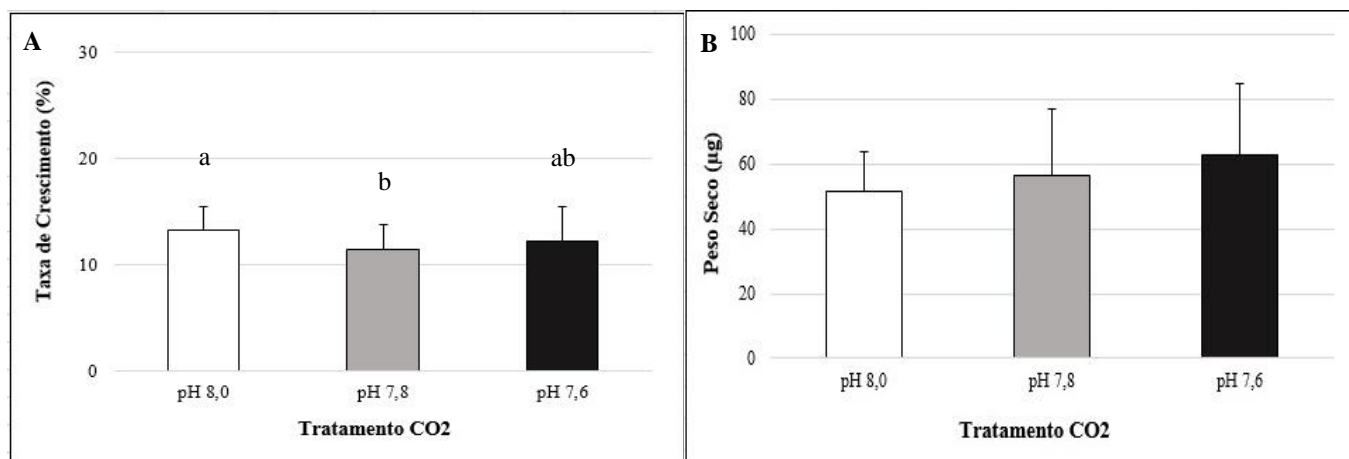
Quanto ao diâmetro dos ovos de *Solea senegalensis* (figura 4.2) não variou significativamente após 12 horas de incubação nos diferentes tratamentos ( $p= 0,33$ ).



**Figura 4.2-** Diâmetro dos ovos de *Solea senegalensis* com 12 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão (n= 50 ovos/ tratamento).



A taxa de crescimento de *Solea senegalensis* variou entre 11,5 e 13,2% entre os diferentes tratamentos (figura 4.3-A), observando-se que o tratamento de pH 8,0 foi o que apresentou uma maior taxa de crescimento ( $13,20 \pm 2,29$  %), tendo-se verificado diferenças significativas entre o tratamento pH 8,0 e pH 7,8 ( $p= 0,00$ ). Quanto ao peso seco (figura 4.3-B), embora as larvas do pH 7,6 sejam tendencialmente mais pesadas ( $65,50 \pm 21,99$   $\mu\text{g}$ ) não se verificaram alterações significativas ( $p= 0,72$ ) entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.3-** Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de *Solea senegalensis* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão ( $n= 30$  larvas/ tratamento). As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Com base na tabela VI, é possível observar a análise descritiva das variáveis morfométricas das larvas de *Solea senegalensis*. Pode-se afirmar que à eclosão, as larvas apresentaram diferenças entre tratamentos nas seguintes variáveis: comprimento pré-ânus, área do saco vitelino e altura na massa muscular, sendo o controlo (pH 8,0) o que apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) com os restantes tratamentos. As variáveis morfométricas, comprimento pré-ânus ( $1,31 \pm 0,06$  mm) e área do saco vitelino ( $0,84 \pm 0,11$  mm<sup>2</sup>) apresentaram maiores dimensões no controlo em relação aos restantes tratamentos, enquanto a altura da massa muscular apresentou valores mais baixos no controlo ( $0,16 \pm 0,01$  mm) quando comparado com os restantes tratamentos.

Na abertura de boca, aos 3 DAE, as larvas apresentaram diferenças entre tratamentos nas seguintes variáveis: comprimento total, comprimento standard, altura total do corpo e largura da membrana corporal. As medidas morfométricas do comprimento total e standard obtiveram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos intermédio

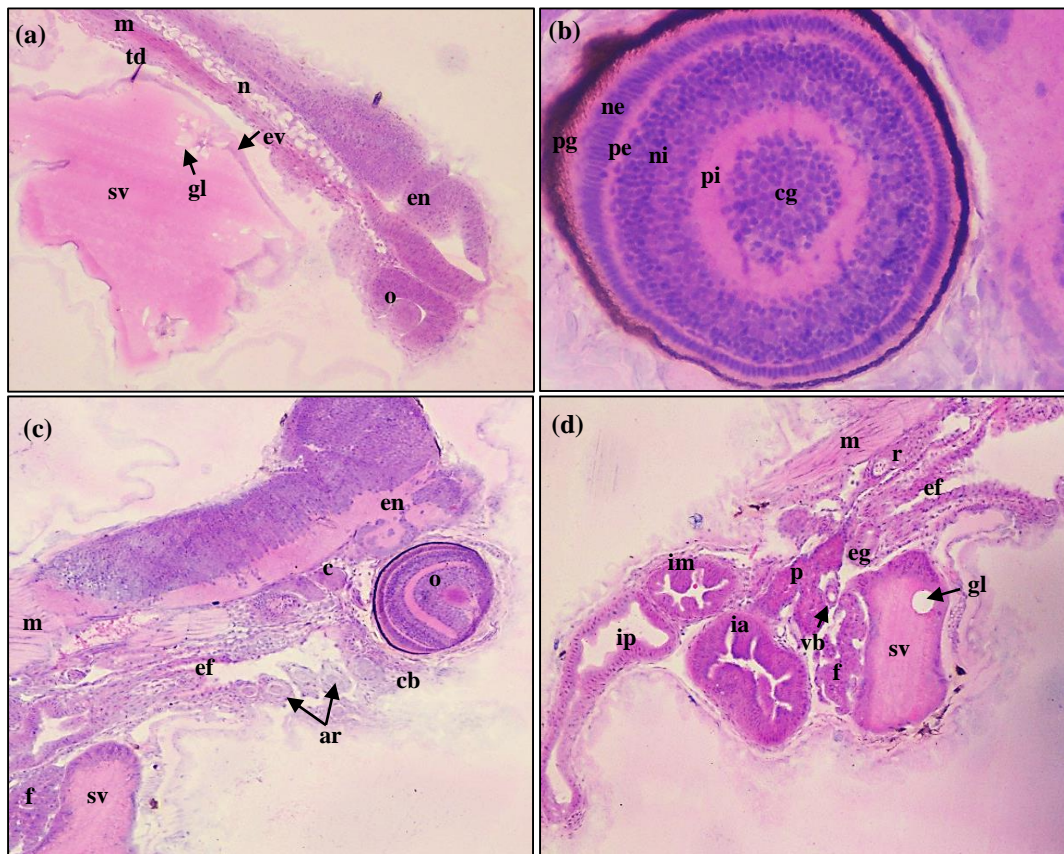
(pH 7,8) e extremo (pH 7,6), sendo que o tratamento que teve valores mais elevados foi o pH 7,8 para o comprimento total ( $3,42 \pm 0,11$  mm) e para o comprimento standard ( $3,20 \pm 0,11$  mm). Quanto às variáveis altura da massa muscular e largura da membrana corporal tiveram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o pH 7,6 e o pH 7,8, sendo o pH 7,6 o que obteve valores mais baixos para as duas variáveis,  $0,84 \pm 0,09$  mm e  $0,63 \pm 0,09$  mm, respectivamente.

**Tabela VI-** Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de *Solea senegalensis* em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão. As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Variáveis	<i>Solea senegalensis</i>			
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento
	Média $\pm$ Desvio-padrão			<i>p-value</i>
<b>Larvas à Eclosão- 0 DAE</b>				
<b>Comprimento Total (mm)</b>	2,16 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,09	0,23
<b>Comprimento Standard (mm)</b>	2,07 $\pm$ 0,09	2,09 $\pm$ 0,09	2,08 $\pm$ 0,09	0,45
<b>Comprimento Pré-Ânus (mm)</b>	1,31 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,29 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	<b>0,01</b>
<b>Área Saco Vitelino (mm<sup>2</sup>)</b>	0,84 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,72 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,70 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
<b>Área Gota Lipídica (mm<sup>2</sup>)</b>	n.a	n.a	n.a	n.a
<b>Altura Massa Muscular (mm)</b>	0,16 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,17 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,17 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	<b>0,01</b>
<b>Altura Total Corpo (mm)</b>	0,41 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,05	0,96
<b>Largura Membrana Corporal (mm)</b>	0,24 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,05	0,24 $\pm$ 0,04	0,44
<b>Larvas à Abertura de Boca- 3 DAE</b>				
<b>Comprimento Total (mm)</b>	3,37 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	3,42 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	3,34 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	<b>0,01</b>
<b>Comprimento Standard (mm)</b>	3,16 $\pm$ 0,11 <sup>ab</sup>	3,20 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	3,12 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	<b>0,02</b>
<b>Comprimento Pré-Ânus (mm)</b>	1,46 $\pm$ 0,07	1,44 $\pm$ 0,06	1,45 $\pm$ 0,07	0,31
<b>Altura Massa Muscular (mm)</b>	0,21 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,10
<b>Altura Total Corpo (mm)</b>	0,89 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,84 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	<b>0,00</b>
<b>Largura Membrana Corporal (mm)</b>	0,68 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,68 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,63 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	<b>0,00</b>

n.a- Não aplicável; os ovos de linguado apresentam várias gotas lipídicas, difíceis de quantificar a área

#### 4.1.1.2- Organogênese



**Figura 4.4-** Secções longitudinais de 2  $\mu\text{m}$  usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de *Solea senegalensis*. (a)- Larva à eclosão (0 DAE), ampliação 10x; (b)- Olho da larva aos 3 DAE, ampliação 40x (c)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Cabeça, ampliação 10x; (c)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Trato digestivo, ampliação 10x. ar- arcos branquiais; c- coração; cb- cavidade bucal; cg- camada de células ganglionares; ef- esôfago; eg- estômago; en- encéfalo; ev- envelope vitelino; f- fígado; gl- gotas lipídicas; ia- intestino anterior; im- intestino médio; ip- intestino posterior; m- músculo, n- notocorda; ne- camada nuclear externa; ni- camada nuclear interna; o- olho; p- pâncreas; pi- camada plexiforme interna; pe- camada plexiforme externa; pg- epitélio do pigmento; r-rim; sv- saco vitelino; td- trato digestivo; vb- vesícula biliar.

A figura 4.4 mostra cortes histológicos de larvas de *Solea senegalensis* à eclosão e à abertura de boca, sujeitos a diferentes níveis de  $\rho\text{CO}_2$  ( $\mu\text{atm}$ ), sendo que entre as larvas estudadas não se verificaram diferenças morfológicas entre os tratamentos e as posturas.

À eclosão (0 DAE), o trato digestivo dos linguados é apenas um segmento tubular histologicamente indiferenciado ao longo do seu comprimento (figura 4.4.a), que estabelece uma ligação dorsal com o saco vitelino, com a boca e ânus fechados. O epitélio consiste numa camada monoestratificada com células cúbicas e colunares. O lúmen do trato digestivo é estreito com tendência a alargar em ambas as extremidades. O saco vitelino contém várias gotas lipídicas periféricas e exibe um vitelo homogêneo

acidófilo. Esta estrutura está cercada por um epitélio escamoso com dois grupos de células redondas com núcleo esférico e citoplasma basofílico (figura 4.4.a) entre o trato digestivo e o saco vitelino, o que pode corresponder ao início da formação do fígado e do pâncreas. Os olhos não estão pigmentados e estão pouco desenvolvidos. A câmara do olho é muito rudimentar e a córnea ainda não está formada.

Aos 3 DAE, a boca e o ânus já estão abertos e os olhos também já estão pigmentados, apresentando diferentes camadas óticas.

O olho apresenta sete camadas (figura 4.4.b), a partir da zona interior para a zona exterior: (l) lente; (cg) uma camada de células ganglionares formadas por células redondas grandes e diferenciadas; (pi) uma camada plexiforme interna observada como uma banda larga regularmente corada; (ni) uma camada nuclear interna composta por três tipos celulares: uma única linha de células com núcleos horizontais achatadas, uma zona intermédia de células bipolares redondas e uma zona interna de células redondas com grandes núcleos de coloração clara e muito pouco citoplasma; (pe) uma camada plexiforme externa consiste em uma banda fina regularmente corada; (ne) uma camada nuclear externa formada por núcleos de células fotorreceptoras; (pg) epitélio do pigmento.

Quando ocorre a abertura de boca da larva (3 DAE), o trato digestivo já se encontra diferenciado, ocupando o lado direito da larva e os resíduos do saco vitelino e das gotas lipídicas permanecem na parte frontal da cavidade abdominal (figura 4.4.c). Nesta fase, a porção posterior do tubo digestivo começa a dobrar-se ligeiramente e o volume do saco vitelino começa a diminuir até ser completamente absorvido.

O trato digestivo começa no esófago que é revestido por um epitélio cúbico e rodeado por uma camada muscular, que se torna mais espessa com o desenvolvimento larvar. O lúmen desta estrutura é mais estreita, quando comparada com o resto do trato digestivo. O estômago é diferenciado na extremidade do esófago apresentando-se em forma de saco e revestido por um epitélio cúbico, com núcleo central e citoplasma heterogéneo.

Quanto ao fígado está localizado ao lado do saco vitelino, ocupando ambos os lados da cavidade abdominal. Esta estrutura é constituída por hepatócitos que são células esféricas, com núcleo basal e densos grânulos no citoplasma. Ao contrário do fígado que apresenta um citoplasma basófilo, o pâncreas apresenta um citoplasma acidófilo e também grânulos de zimógeno. Estas duas estruturas aumentam o seu tamanho e complexidade com o desenvolvimento larvar.

No que respeita ao intestino, este é diferenciado em três porções (figura 4.4.d): a porção anterior, média e a porção posterior, sendo que a primeira porção é revestida por um epitélio escamoso com disposição circular. A última porção é revestida por um epitélio colunar com um núcleo basal e projeções citoplasmáticas para o lúmen. O lúmen destas porções é mais ondulado, devido ao desenvolvimento de microvilosidades intestinais.

#### **4.1.2- Sargo**

##### **4.1.2.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar**

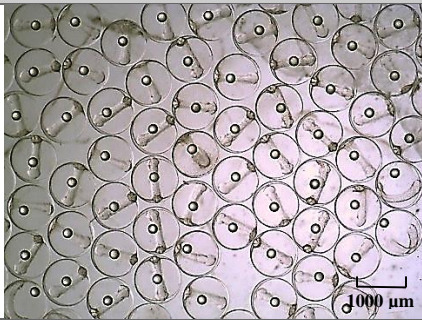
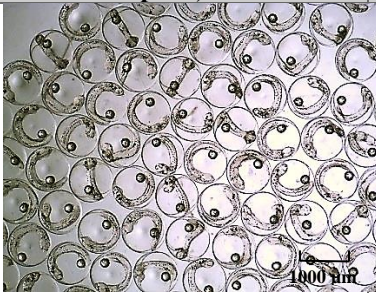
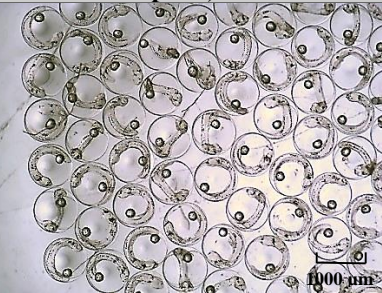
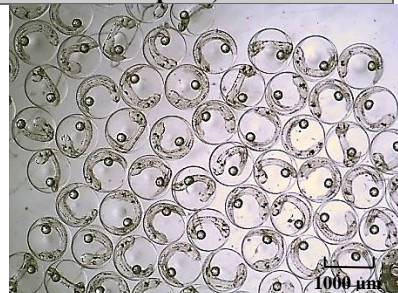
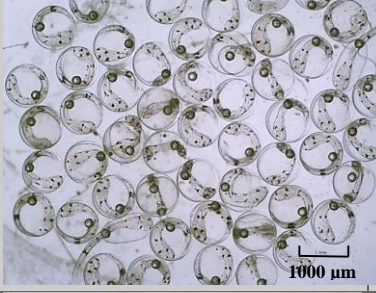
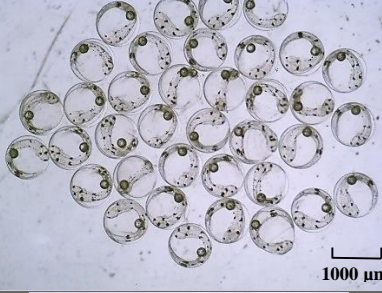
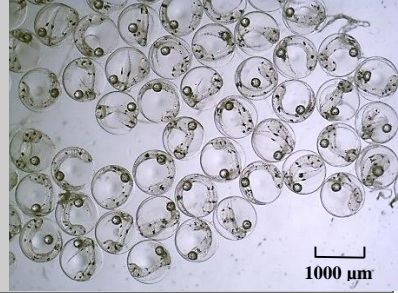


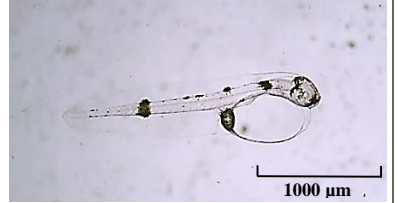
Os ovos de sargo são esféricos e transparentes, apresentando uma única gota lipídica em cada ovo e o vitelo é homogéneo e não segmentado. Depois de 10 horas da recolha do coletor, antes de serem colocados no sistema experimental, os ovos apresentavam-se já em fase de nêurula, ocorrendo a formação da cápsula ótica. Nesta fase observam-se pequenos melanóforos junto às gotas lipídicas, à zona da cabeça e ao longo do corpo embrionário.

Às 22 horas após a recolha do coletor (ARC), durante a fase de nêurula, quando os ovos já estavam sujeitos a diferentes níveis de pH, o embrião já estava mais pigmentado com um maior número de melanóforos, ocorrendo um alongamento da cauda do embrião ficando a gota lipídica junto ao ânus. Nesta fase, observou-se batimentos cardíacos, um aumento do espaço peri-vitelino e pequenas movimentações do embrião dentro do córion.

Às 34h ARC, já no final da fase de nêurula, do ponto de vista ventral era visível a cabeça, o corpo do embrião, o tubo neural, a notocorda, as lentes oculares e região cardíaca e a pigmentação ao longo do tronco do embrião. Nesta etapa, não se observou diferenças morfológicas entre os diferentes tratamentos (tabela VII).

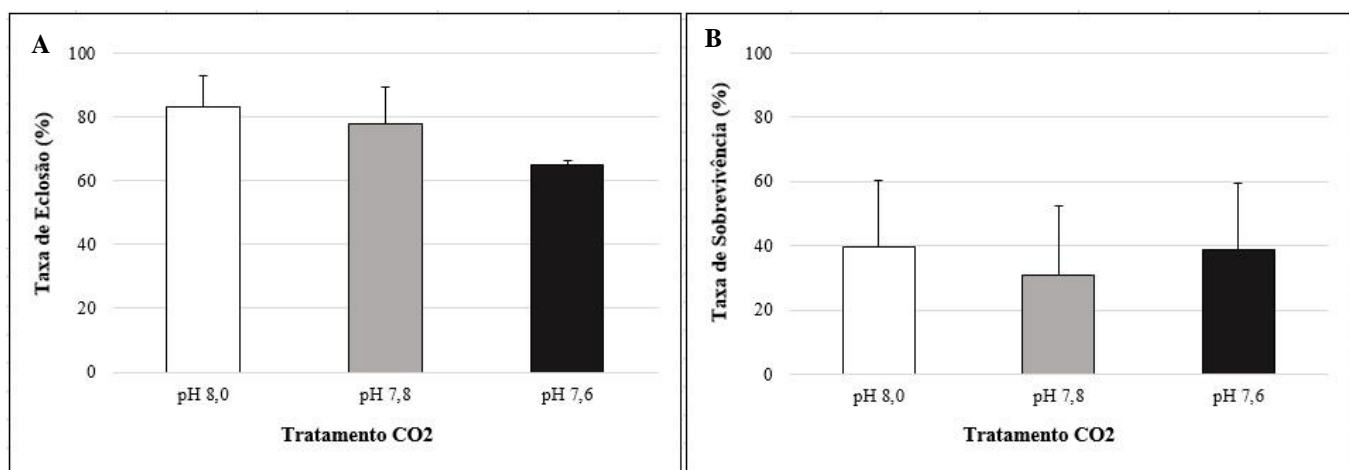
Aproximadamente 46 horas ARC, houve movimentos bruscos dentro do ovo, ocorrendo a rutura do córion e a libertação do embrião, emergindo primeiro a cabeça fora do ovo, com a ajuda de sucessivas contrações com a cauda. As larvas recém-eclodidas tem um saco vitelino elíptico com uma única gota lipídica agregada à traseira do saco vitelino, mas ainda não tem a boca nem e ânus funcionais, nem os olhos pigmentados, sendo uma larva muito rudimentar.

**Tabela VII-** Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de *Diplodus sargus*, incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.

Ovos <i>Diplodus sargus</i>			
Horas de Amostragem	10h ARC		
Temperatura 18°C			
Tratamentos	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6
22h ARC			
34h ARC			
Eclosão (46h ARC)			

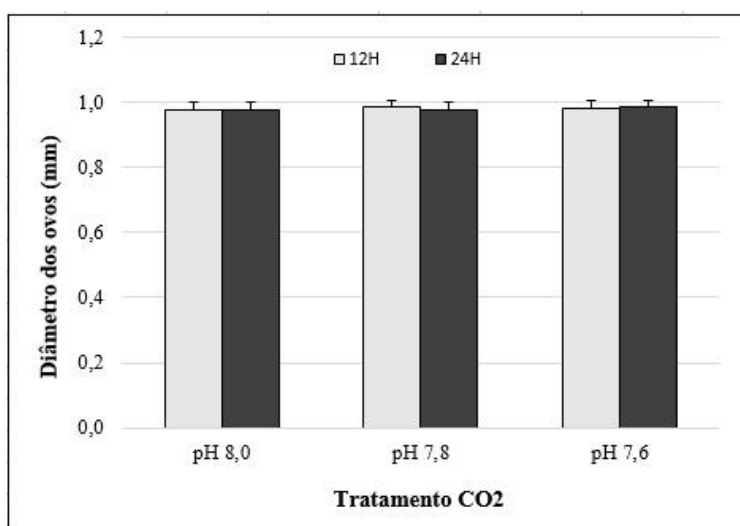
\*ARC- Após Recolha do Coletor

A taxa de eclosão das larvas de *Diplodus sargus* variou entre 65 e 83% entre os diferentes tratamentos, observando-se que o tratamento de pH 8,0 foi o que apresentou uma taxa de eclosão mais elevada ( $83,00 \pm 9,89$  %). Quanto à taxa de sobrevivência (figura 4.5-B) das larvas de *Diplodus sargus* registaram-se valores mais elevados no pH 8,0 ( $39,50 \pm 20,95$  %) e pH 7,6 ( $38,75 \pm 20,81$  %), ainda assim, a taxa de sobrevivência não apresentou alterações significativas ( $p= 0,81$ ) entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.5-** Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e sobrevivência (B) (n=100 larvas/ tratamento) das larvas de *Diplodus sargus* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão.

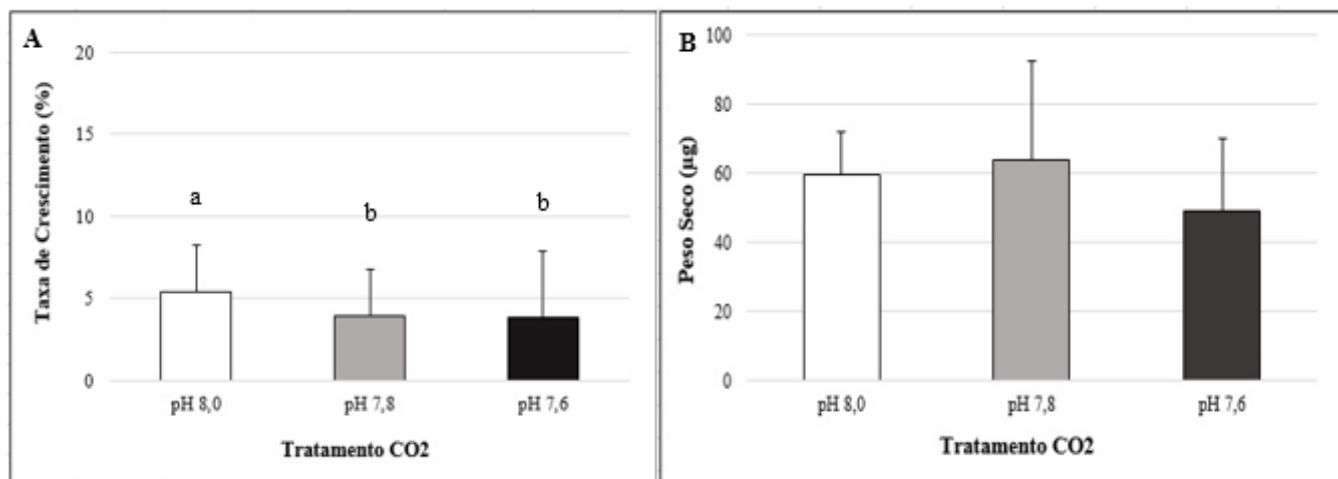
No diâmetro dos ovos de *Diplodus sargus* (figura 4.6) não se observou diferenças significativas após 12 horas ( $p= 0,14$ ) e 24 horas ( $p= 0,18$ ) de incubação nos diferentes tratamentos, sendo o diâmetro dos ovos semelhantes entre os tratamentos (Anexo II). Apesar disso, verificou-se que ocorreu um aumento do diâmetro dos ovos das 12 horas para as 24 horas de incubação após terem sido sujeitos aos diferentes tratamentos.



**Figura 4.6-** Diâmetro dos ovos de *Diplodus sargus*, com 12 e 24 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão (n= 50 larvas/ tratamento).

Quanto à taxa de crescimento de *Diplodus sargus* variou entre 3,8 e 5,2 % entre os diferentes tratamentos, observando-se que o tratamento de pH 8,0 foi o que apresentou uma maior taxa de crescimento ( $5,43 \pm 2,80$  %), tendo-se verificado diferenças

significativas entre o tratamento pH 8,0 e pH 7,8 ( $p= 0,00$ ) e ainda entre o pH 8,0 e pH 7,6 ( $p=0,00$ ). Quanto ao peso seco (figura 4.7-B) das larvas de *Diplodus sargus* registaram-se valores mais elevados no pH 7,8 ( $64,00 \pm 28,61 \mu\text{g}$ ), não se verificando diferenças significativas ( $p= 0,60$ ) no peso seco entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.7-** Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de *Diplodus sargus* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão ( $n= 30$  larvas/ tratamento). As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P <0,05$ ).

De acordo com a tabela VIII, é possível observar a análise descritiva das variáveis morfométricas das larvas de *Diplodus sargus*. Pode-se afirmar que à eclosão, as larvas apresentaram diferenças entre tratamentos nas seguintes variáveis: comprimento total, comprimento standard e área do saco vitelino, sendo o controlo (pH 8,0) que apresentou diferenças significativas ( $P <0,05$ ) com o tratamento pH 7,6. As variáveis morfométricas, comprimento total ( $3,08 \pm 0,21$  mm) e comprimento standard ( $2,92 \pm 0,21$  mm<sup>2</sup>) apresentaram valores mais baixos no controlo em relação aos restantes tratamentos, enquanto a área do saco vitelino apresentou diferenças significativas com o tratamento intermédio ( $P <0,05$ ), apresentando valores mais elevados no controlo ( $0,52 \pm 0,08$  mm<sup>2</sup>) quando comparado com os restantes tratamentos.

Na abertura de boca, aos 3 DAE, as larvas apresentaram diferenças entre tratamentos nas seguintes variáveis: comprimento total, comprimento standard, comprimento pré-ânus e altura da massa muscular. As medidas morfométricas do comprimento total, standard e pré-ânus obtiveram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos controlo e intermédio (pH 7,8), sendo que o tratamento que teve valores mais elevados foi o pH 8,0 (tabela VIII). Quanto à variável altura da massa muscular teve diferenças

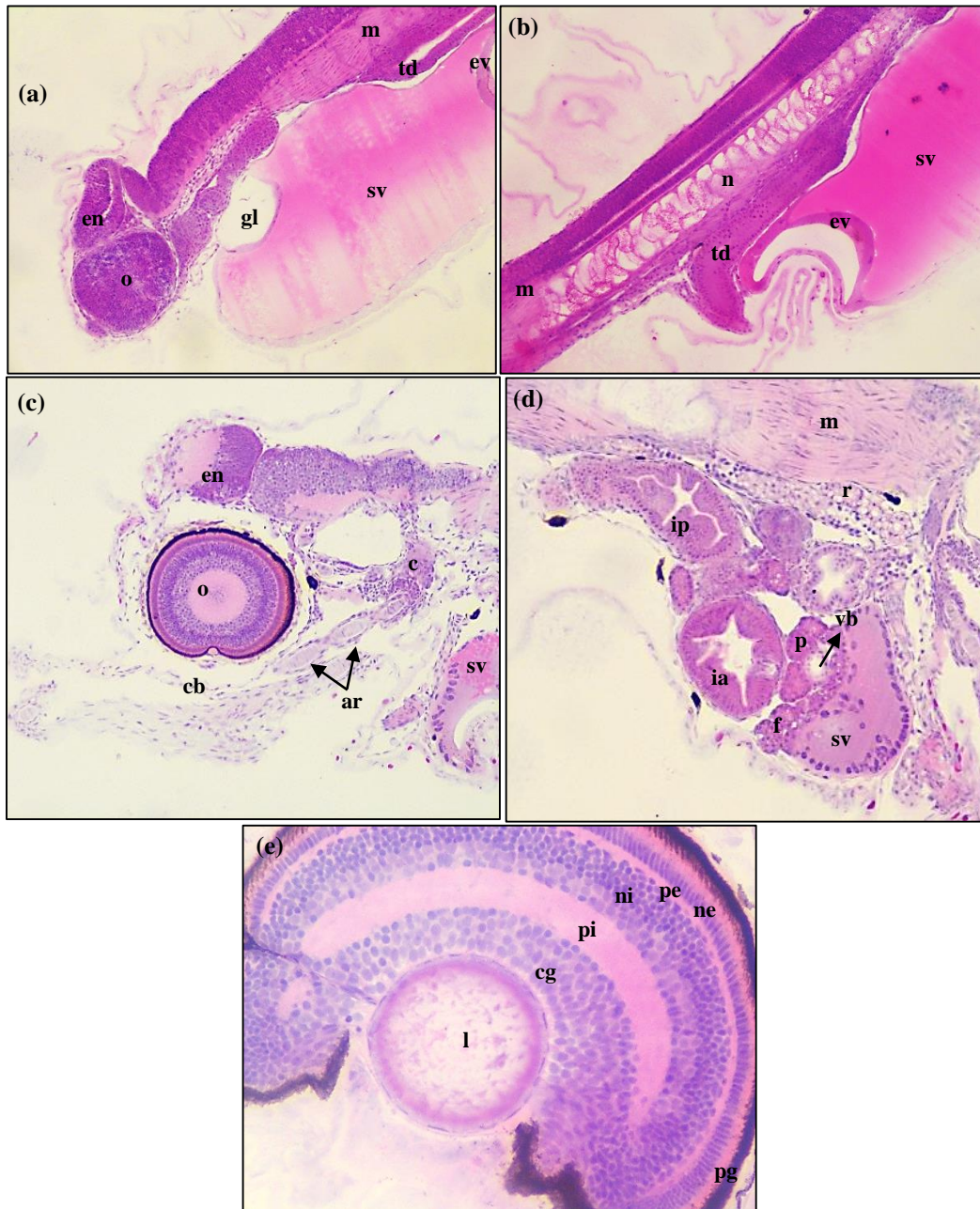


significativas ( $P < 0,05$ ) entre o pH 7,8 e o pH 7,6, sendo o pH 7,8 o que obteve valores mais baixos ( $0,22 \pm 0,012$  mm).

**Tabela VIII-** Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de *Diplodus sargus* em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão. As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Variáveis	<i>Diplodus sargus</i>			
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento
	Média $\pm$ Desvio-padrão			<i>p-value</i>
<b>Larvas à Eclosão- 0 DAE</b>				
Comprimento Total (mm)	3,08 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>	3,19 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	<b>0,03</b>
Comprimento Standard (mm)	2,92 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,25 <sup>ab</sup>	3,03 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	<b>0,04</b>
Comprimento Pré-Ânus (mm)	1,31 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,06	0,38
Área Saco Vitelino (mm <sup>2</sup> )	0,52 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,48 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,48 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	<b>0,04</b>
Área Gota Lipídica (mm <sup>2</sup> )	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	0,56
Altura Massa Muscular (mm)	0,22 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,18
Altura Total Corpo (mm)	0,70 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,06	0,58
Largura Membrana Corporal (mm)	0,49 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,08	0,12
<b>Larvas à Abertura de Boca- 3 DAE</b>				
Comprimento Total (mm)	3,62 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	3,48 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	3,39 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Comprimento Standard (mm)	3,44 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	3,27 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	3,20 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Comprimento Pré-Ânus (mm)	1,25 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,23 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	<b>0,00</b>
Altura Massa Muscular (mm)	0,23 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>	0,22 $\pm$ 0,012 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Altura Total Corpo (mm)	0,70 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,09	0,40
Largura Membrana Corporal (mm)	0,47 $\pm$ 0,07	0,47 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,09	0,85

#### 4.1.2.2- Organogênese



**Figura 4.8-** Secções longitudinais de 2  $\mu$ m usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de *Diplodus sargus*. (a,b)- Larva à eclosão (0 DAE), ampliação de 10x; (c)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Cabeça, ampliação de 10x; (d)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Trato digestivo, ampliação de 10x; (e)- Olho da larva aos 3 DAE, ampliação de 40x. ar- arcos branquiais; c- coração; cb- cavidade bucal; cg- camada de células ganglionares; en- encéfalo; ev- envelope vitelino; f- fígado; ia- intestino anterior; ip- intestino posterior; l- lente; m- músculo, n- notocorda; ne- camada nuclear externa; ni- camada nuclear interna; o- olho; p- pâncreas; pi- camada plexiforme interna; pe- camada plexiforme externa; pg- epitélio do pigmento; r-rim; sv- saco vitelino; td- trato digestivo; vb- vesícula biliar.

A figura 4.8 mostra cortes histológicos de larvas de *Diplodus sargus* à eclosão e à abertura de boca, sujeitos a diferentes níveis de pH, sendo que entre as larvas estudadas não se verificou diferenças morfológicas entre os tratamentos e as posturas.

À eclosão (0 DAE), o trato digestivo dos sargos apresenta-se apenas como um segmento tubular indiferenciado anexado à dorsal do saco vitelino (fig. 4.8.a, b). O epitélio consiste numa camada monoestratificada com células cúbicas e colunares com núcleos centrais. O lúmen do trato digestivo é estreito com tendência a alargar em ambas as extremidades. O saco vitelino apresenta-se homogéneo acidófilo com uma gota lipídica elíptica localizada na parte traseira do saco, rodeado por um envelope vitelino. Esta estrutura é constituída por um epitélio escamoso com dois grupos de células redondas com núcleo esférico e citoplasma basofílico (fig. 4.8.a) entre o trato digestivo e o saco vitelino, o que pode corresponder ao início da formação do fígado e do pâncreas exócrino. Outras estruturas como a boca e o ânus estão fechados.

Os olhos não estão pigmentados e estão pouco desenvolvidos. A câmara do olho é muito rudimentar e a córnea ainda não foi formada.

Quanto à abertura de boca (3 DAE), a larva já se encontrava com a boca e o ânus abertos, ocorrendo este processo em sincronia com a absorção das reservas energéticas. Nesta fase, o saco vitelino está praticamente reabsorvido (fig 4.8.d) e a gota lipídica também é progressivamente reabsorvida, mas não desaparece completamente até ao final desta fase.

Tal como as larvas de linguado, os sargos apresentam sete camadas no olho (fig 4.8.e), a partir da zona interior para a zona exterior: (l) lente; (cg) uma camada de células ganglionares formadas por células redondas grandes e diferenciadas; (pi) uma camada plexiforme interna observada como uma banda larga regularmente corada (ni) uma camada nuclear interna composta por três tipos celulares: uma única linha de células com núcleos horizontais achatadas, uma zona intermédia de células bipolares redondas e uma zona interna de células redondas com grandes núcleos de coloração clara e muito pouco citoplasma; (pe) uma camada plexiforme externa consiste em uma banda fina regularmente corada; (ne) uma camada nuclear externa formada por núcleos de células fotorreceptoras; O olho tem a lente que é formada por camadas concêntricas hialinas, e a córnea é formada por um epitélio com função protetora quando em contacto com o meio externo.

Aos 3 DAE, é iniciada a formação da parte anterior do trato digestivo que pode ser dividido em 3 regiões: cavidade bucal, esófago e intestino. A cavidade bucal é revestida

por um epitélio monoestratificado escamoso, e por baixo desta estrutura consegue-se observar os primeiros arcos branquiais (fig 4.8.c). Quanto ao esófago está localizado no fim da faringe, estende-se desde os arcos branquiais até á abertura do intestino anterior, sendo relativamente estreito e curto e diferenciado com um epitélio estratificado com células cúbicas.

No que respeita ao fígado e ao pâncreas são estruturas claramente distinguíveis. O fígado adapta-se à cavidade corporal, estando localizado ao lado do saco vitelino. É constituído por hepatócitos que tem um citoplasma basófilo homogéneo e um núcleo central, com grânulos no citoplasma. O pâncreas tem uma forma poliédrica, com células fortemente basófilas (células de zimógeno), com um núcleo redondo e encontra-se ventralmente ao intestino. Nesta idade, não se evidencia nenhuma divisão distinta no coração, mas observa-se um rim logo abaixo da notocorda.

Sobre o trato digestivo, mais concretamente o intestino começou a curvar e acomodou-se dentro da cavidade abdominal e formou três porções intestinais: anterior, médio e posterior. A porção anterior é revestida por um epitélio escamoso e a porção posterior é revestida por um epitélio simples, cujas células mostraram núcleos basais e projeções citoplasmáticas para o lúmen. O intestino epitelial é formado por uma única camada de enterócitos colunares com núcleo em posição basal, formando depois as microvilosidades. Ao longo do desenvolvimento da larva, o intestino ganha a forma de um laço na cavidade abdominal.

### **4.1.3- Corvina**

#### **4.1.3.1- Desenvolvimento Embrionário e Larvar**

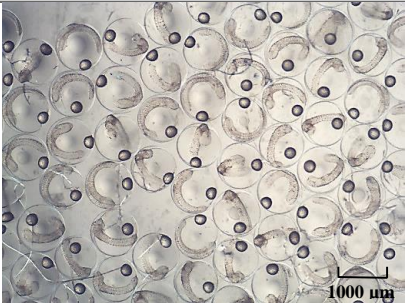
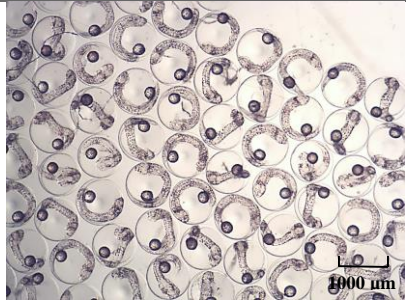
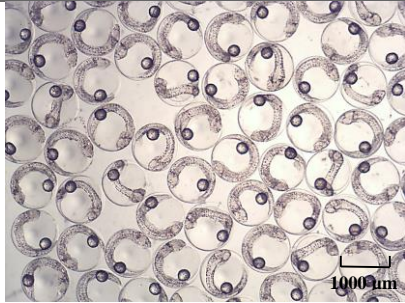
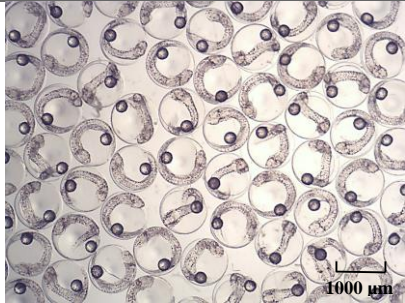



Os ovos de corvina são pelágicos, esféricos, quase transparentes, e têm uma única gota lipídica ligeiramente amarelada, tal como os ovos de sargo. Depois de 10 horas ARC, antes de serem colocados no sistema experimental, os ovos apresentavam-se já em fase de nêurula, ocorrendo a formação da cápsula ótica. Nesta fase observam-se pequenos melanóforos junto à gota lipídica e ao longo do tronco do embrião, acabando por se espalharem pelo vitelo.

Às 22 horas após a recolha do coletor, no final de nêurula, quando os ovos já estavam sujeitos a diferentes níveis de pH, o embrião já estava mais pigmentado, ocorreu um alongamento da cauda do embrião ficando a gota lipídica junto do mesmo,

mais concretamente na zona do ânus. Nesta fase, pode-se observar na tabela IX que não existiram diferenças morfológicas nos ovos entre os diferentes tratamentos.

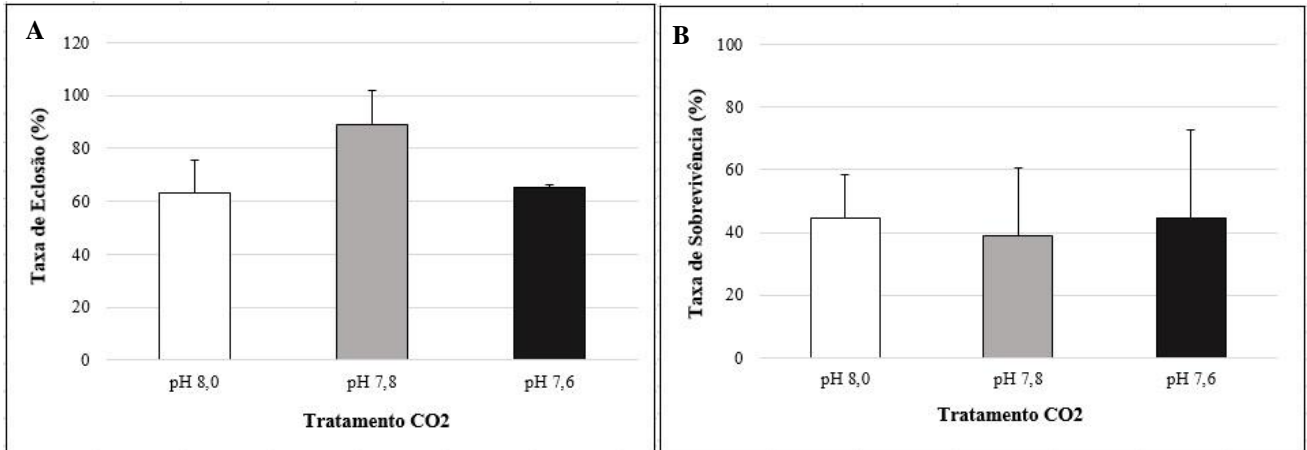
A eclosão das larvas de corvina ocorreu, com sucessivas contrações com a ajuda da cauda, cerca de 26 horas ARC, ocorrendo a rutura do córion e a libertação do embrião para o meio aquático. Nesta fase, a larva recém-eclodida tem um saco vitelino elíptico com uma única gota lipídica agregada à traseira do saco vitelino, mas ainda não tem a boca nem o ânus funcionais, nem os olhos pigmentados, sendo uma larva muito rudimentar.

**Tabela IX-** Registo do desenvolvimento embrionário de ovos de *Argyrosomus regius*, incubados a 18°C e sujeitos a diferentes níveis de pH.

<i>Ovos Argyrosomus regius</i>			
Horas de Amostragem	10h ARC		
Temperatura 18°C			
Tratamentos	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6
22h ARC			
Eclosão (26h ARC)			

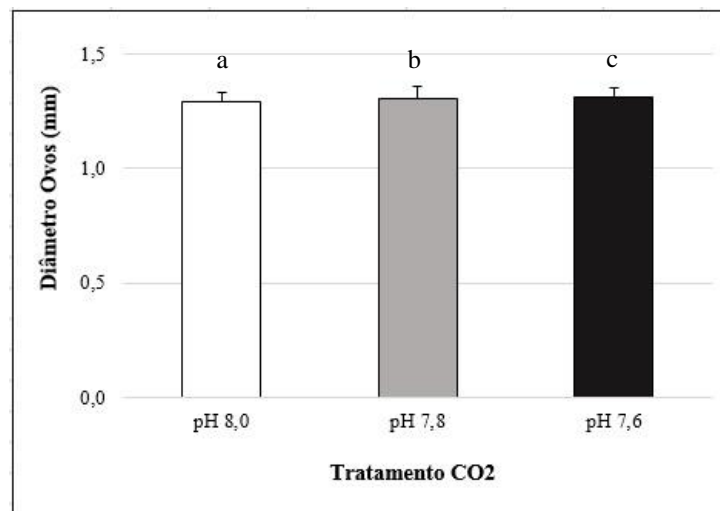
\*ARC- Após Recolha do Coletor

A taxa de eclosão das larvas de *Argyrosomus regius* (figura 4.9-A) variou entre 63 e 89% entre os diferentes tratamentos, observando-se que o tratamento de pH 7,8 foi o que apresentou uma maior taxa de eclosão ( $89,00 \pm 12,72$  %). Quanto à taxa de sobrevivência (figura 4.9-B) das larvas de *Argyrosomus regius* registaram-se valores mais elevados no pH 7,6 ( $44,75 \pm 27,90$  %), ainda assim, a taxa de sobrevivência não apresentou alterações significativas ( $p= 0,91$ ) entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.9-** Taxas de eclosão (A) (n= 50 larvas/ tratamento) e sobrevivência (B) (n= 100 larvas/ tratamento) das larvas de *Argyrosomus regius* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão.

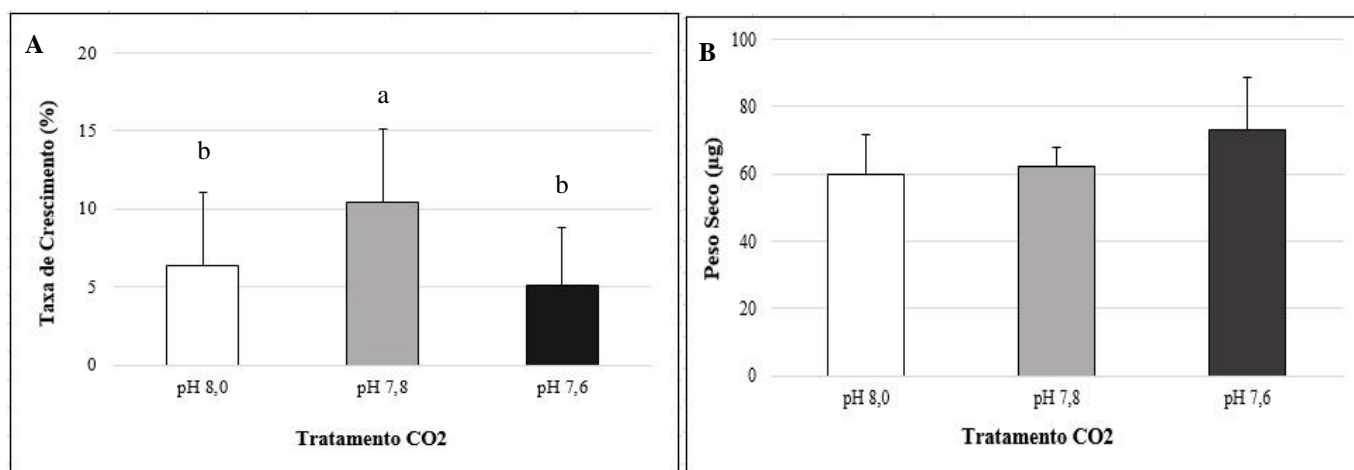
No diâmetro dos ovos de *Argyrosomus regius* (figura 4.10) observou-se diferenças significativas ( $p= 0,02$ ) após 12 horas de incubação entre todos os tratamentos, sendo o pH 7,6 o tratamento onde se verificou um maior diâmetro dos ovos ( $1,31 \pm 0,04$  mm).



**Figura 4.10-** Diâmetro dos ovos de *Argyrosomus regius* com 12 horas de incubação após terem sido sujeitos ao tratamento em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à

média  $\pm$  desvio-padrão (n= 50 larvas/ tratamento). As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

A taxa de crescimento de *Argyrosomus regius* (figura 4.11-A) variou entre 5,1 e 10,4 % entre os diferentes tratamentos, observando-se que o tratamento de pH 7,8 foi o que apresentou uma maior taxa de crescimento ( $10,44 \pm 4,67$  %), tendo-se verificado diferenças significativas entre o tratamento pH 8,0 e pH 7,8 ( $p = 0,00$ ) e ainda entre o pH 7,8 e pH 7,6 ( $p = 0,00$ ). Quanto ao peso seco (figura 4.11-B) das larvas de *Argyrosomus regius* registaram-se valores mais elevados no pH 7,6 ( $73,35 \pm 15,42$   $\mu\text{g}$ ), e não se verificou diferenças significativas ( $p = 0,26$ ) no peso seco entre os diferentes tratamentos.



**Figura 4.11-** Taxa de Crescimento (A) desde a eclosão à abertura de boca (3 DAE) e o peso seco à abertura de boca (B) das larvas de *Argyrosomus regius* mantidas em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão (n= 30 larvas/ tratamento). As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Na tabela X, é possível observar a análise descritiva das variáveis morfométricas das larvas de *Argyrosomus regius*. À eclosão, verifica-se que as larvas apresentaram diferenças em todas as variáveis morfométricas entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) pH 7,8 com o pH 7,6, e o pH 7,8 com o controle, à exceção da área do saco vitelino que apresentou diferenças significativas entre todos os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Todas as variáveis morfométricas apresentaram valores mais baixos no pH 7,8 em relação aos restantes tratamentos (tabela X).

Na abertura de boca, aos 3 DAE, as larvas apresentaram diferenças significativas em todas as variáveis morfométricas, à exceção do comprimento pré-ânus ( $P > 0,05$ ). As medidas morfométricas do comprimento total e standard obtiveram diferenças

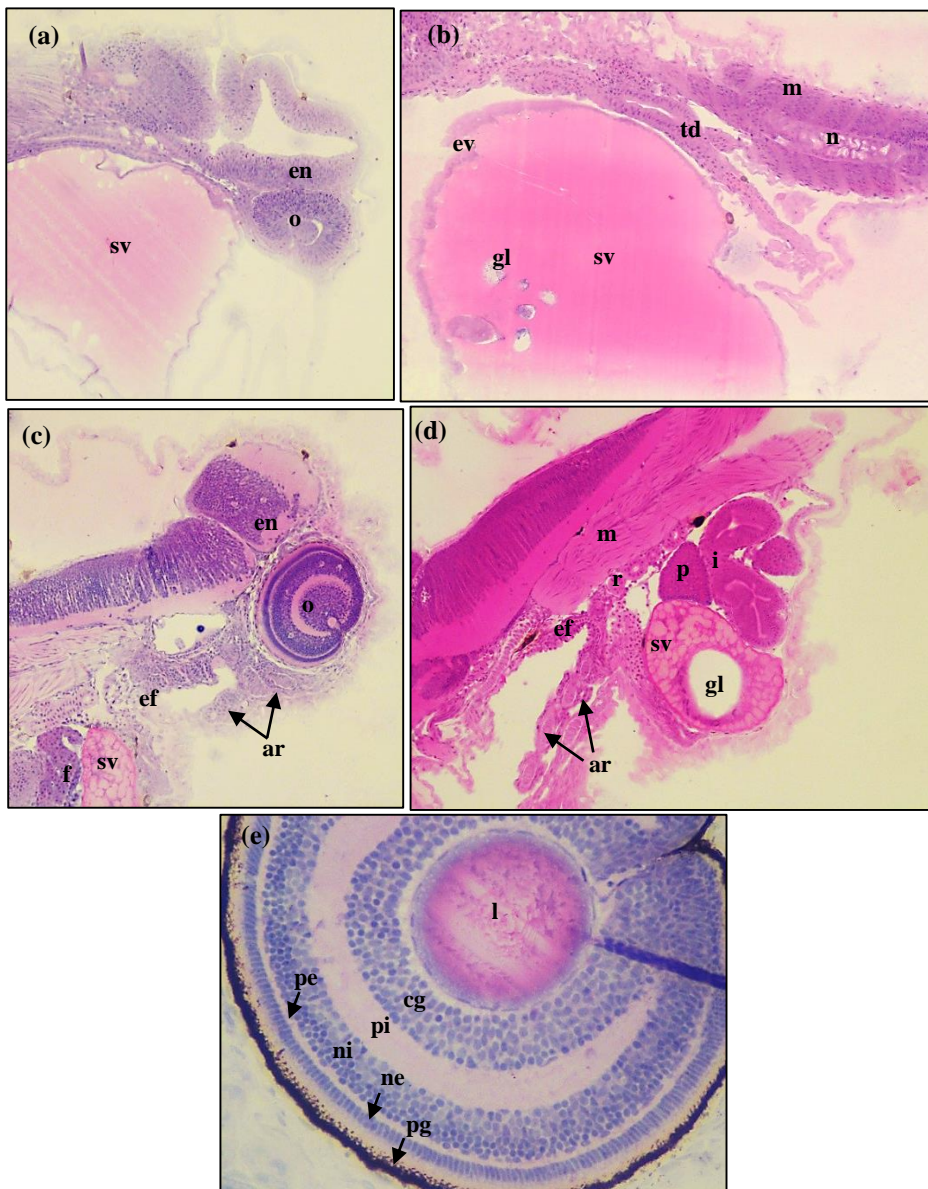


significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos pH 7,8 com o controlo e o pH 7,8 com o pH 7,6, sendo que o tratamento que teve valores mais elevados foi o pH 7,8 (tabela VIII). Quanto às medidas morfométricas altura total do corpo e largura da membrana corporal obtiveram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos controlo com o pH 7,8 e o controlo com o pH 7,6, sendo que o tratamento que teve valores mais baixos foi o controlo (tabela VIII).

**Tabela X-** Análise descritiva das variáveis morfométricas nas larvas de *Argyrosomus regius* em diferentes níveis de pH. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão. As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Variáveis	<i>Argyrosomus regius</i>			
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento
	Média $\pm$ Desvio-padrão			<i>p-value</i>
<b>Larvas à Eclosão- 0 DAE</b>				
Comprimento Total (mm)	2,68 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>	2,39 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,75 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Comprimento Standard (mm)	2,56 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	2,29 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	2,65 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Comprimento Pré-Ânus (mm)	1,43 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	1,28 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,43 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Área Saco Vitelino (mm <sup>2</sup> )	0,96 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	0,76 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup>	<b>0,00</b>
Área Gota Lipídica (mm <sup>2</sup> )	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Altura Massa Muscular (mm)	0,22 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,20 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Altura Total Corpo (mm)	0,62 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	0,55 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Largura Membrana Corporal (mm)	0,39 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,34 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
<b>Larvas à Abertura de Boca- 3 DAE</b>				
Comprimento Total (mm)	3,14 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	3,25 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,15 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	<b>0,01</b>
Comprimento Standard (mm)	2,99 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	3,11 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Comprimento Pré-Ânus (mm)	1,17 $\pm$ 0,08	1,19 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,08	0,08
Altura Massa Muscular (mm)	0,25 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>	0,26 $\pm$ 0,019 <sup>ab</sup>	0,27 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup>	<b>0,01</b>
Altura Total Corpo (mm)	0,76 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,91 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,83 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>
Largura Membrana Corporal (mm)	0,51 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	0,56 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	<b>0,00</b>

#### 4.1.3.2- Organogênese



**Figura 4.12-** Secções longitudinais de 2 µm usando metacrilato em diferentes órgãos e tecidos de larvas de *Argyrosomus regius*. (a,b)- Larva à eclosão (0 DAE), ampliação de 10x; (c)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Cabeça, ampliação de 10x; (d)- Larva à abertura de boca (3 DAE)- Trato digestivo, ampliação de 10x; (e)- Olho da larva aos 3 DAE, ampliação de 40x. ar- arcos branquiais; cg- camada de células ganglionares; ef-esófago; en- encéfalo; ev- envelope vitelino; f- fígado; gl- gota lipídica; i- intestino; l-lente; m- músculo, n- notocorda; ne- camada nuclear externa; ni- camada nuclear interna; o- olho; p- pâncreas; pi- camada plexiforme interna; pe- camada plexiforme externa; pg- epitélio do pigmento; r-rim; sv- saco vitelino; td- trato digestivo.

A figura 4.12 mostra cortes histológicos de larvas de *Argyrosomus regius* à eclosão e à abertura de boca, sujeitos a diferentes níveis de pH, sendo que entre as larvas estudadas não se verificaram diferenças morfológicas entre os tratamentos e as posturas.

Aos 0 DAE, o trato digestivo aparece como um tubo fechado localizado dorsalmente ao saco vitelino. O epitélio é composto por uma camada única de células cuboidais e colunares simples. O saco vitelino apresenta-se homogéneo acidófilo com uma gota lipídica localizada na parte posterior do saco, rodeado por um envelope vitelino.

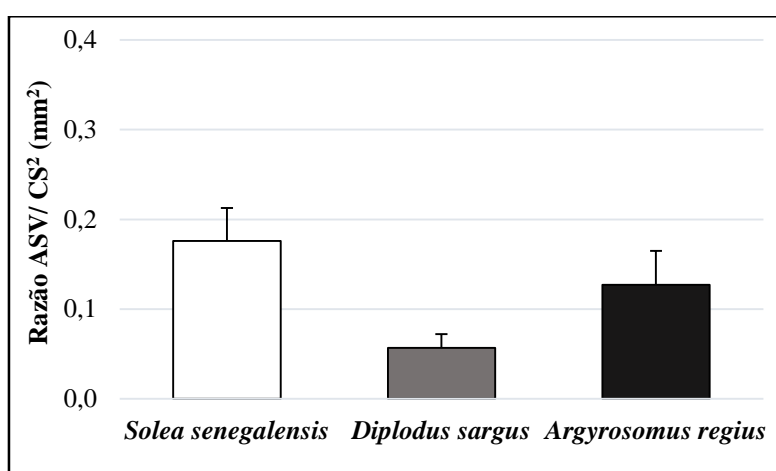
À eclosão, a boca e o ânus estão fechados, enquanto os olhos não estão pigmentados e a córnea não está formada, sendo uma estrutura rudimentar (figura 4.12.a).

Aos 3 DAE, ocorreu o primeiro evento de diferenciação com a abertura da boca e do ânus, o que foi seguido por diversas diferenciações importantes do trato digestivo (figura 4.12. d). Nesta fase, a cavidade bucal está coberta por uma camada única de células epiteliais, e a segmentação intestinal apresenta uma constrição intestinal que separa o intestino anterior e posterior. Aos 3 DAE, é possível observar microvilosidades intestinais e os primeiros vacúolos que aparecem na parte posterior do intestino. Ainda se observa restos do saco vitelino e da gota lipídica, sendo esta última estrutura, a última a ser absorvida. O pâncreas e o fígado foram diferenciados aos 3 DAE, sendo a segunda estrutura ligada ao intestino médio e aumentando progressivamente o seu tamanho à volta do intestino anterior. O fígado desenvolveu-se rapidamente, formando células hepáticas, localizado inicialmente entre o saco vitelino e o intestino anterior. Nesta espécie é possível observar uma grande quantidade de músculo acima da cavidade abdominal, apresentando uma camada de fibras musculares.

No que respeita ao olho, é uma estrutura semelhante entre as três espécies em estudo, apresentando sete camadas bem diferenciadas (figura 4.12.e). O olho tem a lente que é formada por camadas concêntricas hialinas, e a córnea é formada por um epitélio com função protetora quando em contacto com o meio externo.

#### 4.2- Análise Interespecífica

No gráfico da figura 4.13, é possível observar que as razões  $ASV/CS^2$  foram inferiores a 1, como tal indica que as larvas de linguado apresentam áreas de sacos vitelinos maiores, mas são mais curtas ( $0,17 \pm 0,04$  mm), enquanto as larvas de sargo apresentam áreas de sacos vitelinos menores, mas em contrapartida são mais compridas ( $0,06 \pm 0,02$  mm), sendo as larvas de corvina as que tem valores intermédios ( $0,13 \pm 0,04$  mm). Pode-se comprovar estes resultados das medidas do saco vitelino e do comprimento standard, através das tabelas VI, VIII e X, sendo respetivamente, *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus* e *Argyrosomus regius*.



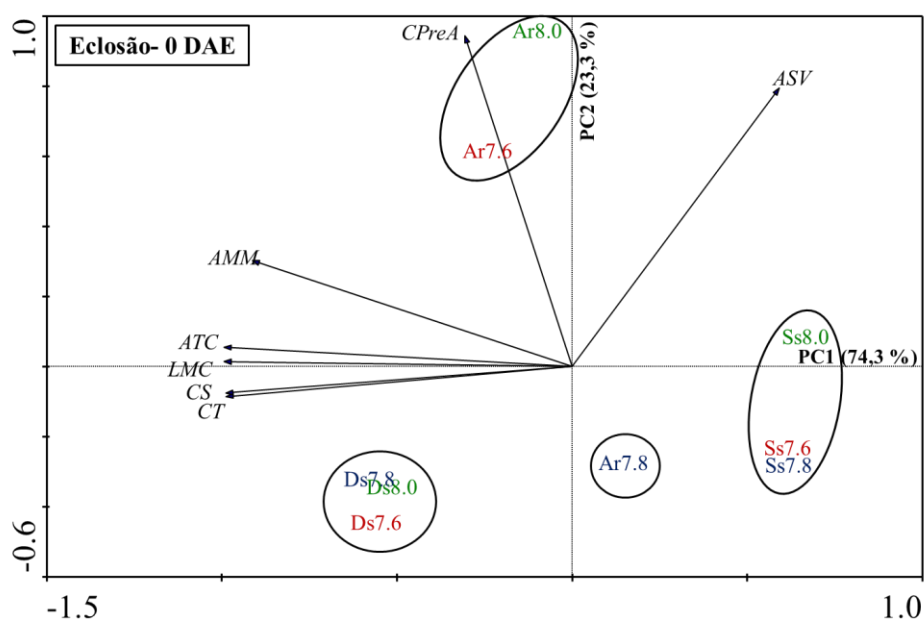
**Figura 4.13** – Razão entre a área do saco vitelino (ASV) e o comprimento standard ( $CS^2$ ) ( $mm^2$ ) à eclosão (0 DAE) das três espécies em estudo. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão.

Para a eclosão, e com o objetivo de averiguar a relação existente entre as diferentes variáveis morfométricas com as três espécies em estudo sujeitas a diferentes níveis de pH (pH 8,0; pH 7,8; pH 7,6), procedeu-se à realização de uma análise de componentes principais (ACP) para as espécies associadas a cada tratamento.

Os resultados alcançados permitem observar que as variáveis morfométricas (CS, CT, LMC, ATC, AMM) apresentaram entre si uma correlação forte positiva (ângulo formado pelos vetores é inferior a  $90^\circ$ ), tal como acontece com a ASV e o *CPreA* (figura 4.14). Em contrapartida, a ASV apresenta uma correlação inversa (ângulo formado pelos vetores é superior a  $90^\circ$ ) com as restantes variáveis morfométricas (CT, CS, LMC, ATC), à exceção da AMM cuja relação é praticamente nula (ângulo formado pelos vetores é muito próximo de  $90^\circ$ ).

O eixo 1 (PC1) explica 74,3% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 (PC2) explica 23,3% da variabilidade dos dados.

Os indivíduos associados às amostras espécie-tratamento Ar8,0 e Ar7,6 são caracterizados por altos valores de *CPreA*, em oposição a Ar7,8. O sargo nos diferentes tratamentos (Ds8,0; Ds7,8; Ds7,6) caracteriza-se por apresentar valores mais elevados de CT, CS, LMC, ATC (e com menos preponderância de AMM), ao contrário do linguado nos diferentes tratamentos (Ss8,0; Ss7,8; Ss7,6), cujo padrão é totalmente oposto. O linguado nos diferentes tratamentos (Ss8,0; Ss7,8; Ss7,6) e a corvina nos tratamentos pH 8,0 e pH 7,6 apresentam valores mais elevados da ASV, em oposição ao sargo nos diferentes tratamentos (Ds8,0; Ds7,8; Ds7,6).

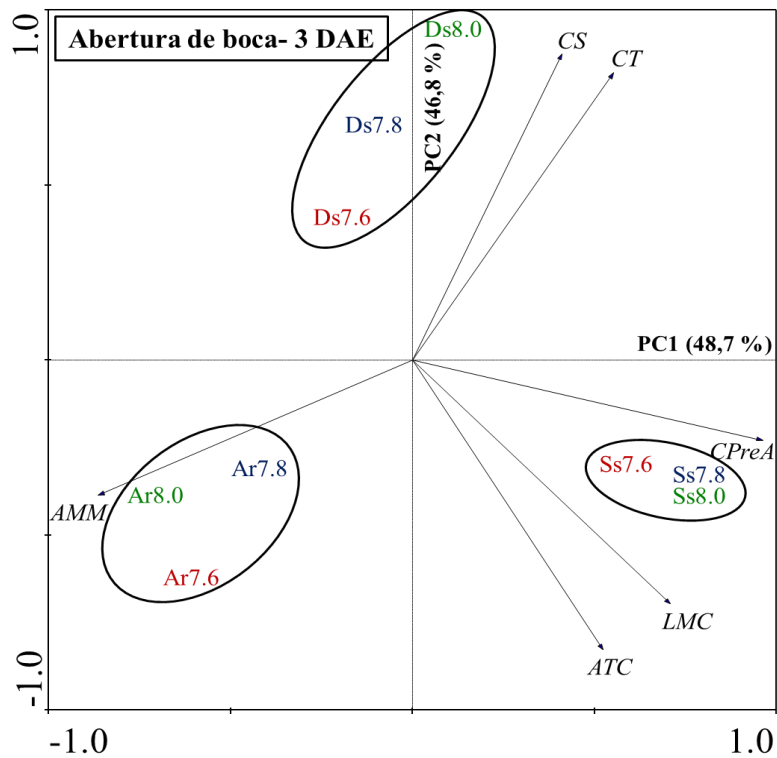


**Figura 4.14-** Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) para a eclosão das diferentes espécies em estudo com os respectivos tratamentos referentes às variáveis morfométricas. Cada vetor representa uma variável morfométrica (CS- Comprimento Standard; CT- Comprimento Total; *CPreA*-Comprimento Pré-Ânus; ASV-Área do Saco Vitelino; ATC- Altura Total do Corpo; AMM- Altura da Massa Muscular; LMC- Largura da Membrana Corporal) e cada ponto representa as espécies em estudo (Ss- *Solea senegalensis*; Ds- *Diplodus sargus*; Ar- *Argyrosomus regius*) sujeitas a diferentes níveis de pH (pH 8,0; pH 7,8; pH 7,6).

De acordo com a análise similar, mas para a abertura de boca, os resultados obtidos (figura 4.15), permitem verificar que as variáveis morfométricas (CS e CT) e (LMC, ATC, *CPreA*) apresentaram uma forte correlação positiva entre si. Em contrapartida, a AMM apresenta uma correlação inversa com as variáveis morfométricas CT, CS e *CPreA*. Adicionalmente, AMM apresenta uma relação praticamente nula com os valores obtidos na medida da ATC e LMC (sendo esta menos acentuada).

O eixo 1 (PC1) explica 48,7% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 (PC2) explica 46,8% da variabilidade dos dados.

A corvina nos diferentes tratamentos (Ar8,0; Ar7,8; Ar7,6) é caracterizada por valores AMM mais elevados, e valores mais baixos CS e CT. O linguado nos diferentes tratamentos (Ss8,0; Ss7,8; Ss7,6) apresenta valores mais elevados de CPreA, LMC, ATC, ao contrário do sargo nos diferentes tratamentos (Ds8,0; Ds7,8; Ds7,6). Adicionalmente, é possível observar que o padrão associado ao sargo se caracteriza por valores mais elevados de CS e CT, em oposição à corvina nos diferentes tratamentos.



**Figura 4.15-** Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) para a abertura de boca das diferentes espécies em estudo com os respectivos tratamentos referentes às variáveis morfométricas. Cada vetor representa uma variável morfométrica (CS- Comprimento Standard; CT- Comprimento Total; CPreA-Comprimento Pré-Ânus; ATC- Altura Total do Corpo; AMM- Altura da Massa Muscular; LMC- Largura da Membrana Corporal) e cada ponto representa as espécies em estudo (Ss- *Solea senegalensis*; Ds- *Diplodus sargus*; Ar-*Argyrosomus regius*) sujeitas a diferentes níveis de pH (pH 8,0; pH 7,8; pH 7,6).

## 5. Discussão

Um conjunto emergente de evidências sugere que no futuro o impacto da acidificação dos oceanos nos organismos marinhos será mais variável do que se pensa, gerando espécies resistentes ou vulneráveis à AO (Doney *et al.*, 2009). Enquanto a maioria dos estudos se concentram sobre o efeito do aumento da  $\rho\text{CO}_2$  em calcificadores marinhos (por exemplo Fabry *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2008; Gooding *et al.*, 2009), poucos estudos examinaram os impactos sobre os organismos não-calcificadores, como os peixes (Ishimatsu *et al.*, 2008; Melzner *et al.*, 2009; Gutowska *et al.*, 2010). É amplamente reconhecido que as fases de início de vida são as mais sensíveis à acidificação dos oceanos (Raven *et al.*, 2005; Pörtner & Farrell, 2008), no entanto, a informação sobre o efeito de hipercapnia nos estágios iniciais de vida dos peixes é bastante limitada (Kikkawa *et al.*, 2003; Checkley *et al.*, 2009; Munday *et al.*, 2009, 2011). Estudos recentes sugerem que os organismos marinhos podem adaptar-se a alterações nos níveis de pH e às mudanças climáticas em geral (Melzner *et al.*, 2009; Pistevos *et al.*, 2011). No entanto, a resposta dos organismos expostos a elevados valores de  $\rho\text{CO}_2$  pode variar entre espécies, e mesmo entre populações da mesma espécie (Parker *et al.*, 2011).

A fim de prever as consequências no ecossistema com a acidificação dos oceanos, é fundamental avaliar os potenciais efeitos dos elevados níveis de  $\text{CO}_2$  em relação a outras influências naturais e antropogênicas, e considerar o potencial das espécies para se aclimatarem ou se adaptarem às mudanças das condições ambientais (Hurst *et al.*, 2013). Como tal, este trabalho contribui para uma melhor compreensão dos efeitos do aumento da  $\rho\text{CO}_2$  no desenvolvimento embrionário e recém-larvar de três espécies de peixes marinhos com ovos pelágicos.

Estudos anteriores verificaram que o diâmetro médio dos ovos de espécies da ordem Pleuronectiforme e da família Sparidae varia entre 0,70 e 1,38 mm (Ahlstrom *et al.*, 1984) e entre 0,55 e 1,02mm (Firat *et al.*, 2005), respetivamente, sendo os ovos esféricos, pelágicos e no caso dos sparídeos apresentam uma única gota lipídica (Faranda *et al.*, 1985). No presente estudo verificou-se que os ovos de *S. senegalensis* e *D. sargus* não apresentaram diferenças significativas quanto à sua morfologia e diâmetro (0,98-1,01mm) quando sujeitos a diferentes tratamentos de pH.

Segundo Hempel (1979), a tolerância dos embriões às condições da água depende da fase de desenvolvimento, sendo os ovos mais resistentes a partir da fase de nêurula, pois o embrião já se encontra mais desenvolvido, possui mecanismos de defesa e uma menor dependência do ambiente externo (Baumann *et al.*, 2011). Neste trabalho, os ovos já se encontravam em fase de nêurula quando foram sujeitos aos diferentes níveis de pH, pelo que podemos assumir que este estudo se desenvolveu com os ovos na fase mais resistente do seu desenvolvimento. Os resultados coincidem com os dados apresentados por Franke & Clemmensen (2011), em que verificaram que os ovos de arenque (*Clupea harengus*) são tolerantes a níveis de  $p\text{CO}_2$  até 4635  $\mu\text{atm}$ , superando as previsões futuras de 4300  $\mu\text{atm}$  (Thomsen *et al.* 2010). Num estudo realizado por Munday *et al.* (2009) com peixes de recife de coral com ovos bentônicos (*Amphiprion percula*) também não detetaram nenhum efeito adverso sobre a duração da fase embrionária, na sobrevivência dos embriões e no tamanho das larvas à eclosão, em concentrações de  $p\text{CO}_2$  até 1030  $\mu\text{atm}$ .

O aumento da  $p\text{CO}_2$  no ambiente aumentará rapidamente a concentração de iões  $\text{H}^+$  dos fluídos extracelulares e intracelulares, diminuindo o seu pH. A acidose respiratória irá interferir com as vias metabólicas celulares, por isso prevê-se que a regulação ácido-base nos peixes é feita pelas células cloreto que fazem o transporte de iões para as brânquias e são responsáveis pela regulação do pH (Michaelidis *et al.*, 2007; Kreiss *et al.*, 2015). Nesta fase do desenvolvimento embrionário as células cloreto já se encontram desenvolvidas, podendo explicar a tolerância melhorada observada para os níveis de  $\text{CO}_2$  durante a fase de embrião (Kikkawa *et al.*, 2003).

Os resultados deste estudo quanto à embriogénese de *Argyrosomus regius* demonstram que os ovos e a gota lipídica desta espécie são significativamente maiores comparativamente com outras espécies de ovos pelágicos (Jug-Dujakovic *et al.*, 1995; Mihelakakis *et al.*, 2001), mas seguem o mesmo padrão ontogénico que as outras espécies em estudo (*Diplodus sargus* e *Solea senegalensis*). Em condições de cultivo (14° C), Watson (1982) observou diâmetros médios de 0,85mm para *Genyonemus lineatus* (família Sciaenidae). No presente estudo, e em situação controlo, o diâmetro dos ovos de *A. regius* variou entre 1,29 e 1,30mm, mas ao contrário do que observou para o linguado e o sargo, quando expostos a níveis elevados de  $\text{CO}_2$ , os ovos apresentaram diâmetros maiores. Uma vez que a membrana dos ovos serve como uma barreira de difusão, a permeabilidade desta pode ter sido afetada pelos elevados níveis



de CO<sub>2</sub>, aumentando o desenvolvimento dos ovos. Como nesta fase já existem mecanismos de excreção desenvolvidos para lidar com os elevados valores de pCO<sub>2</sub> no fluido perivitelino (Franke & Clemmesen, 2011), e sendo a corvina um peixe de rápido crescimento (Klimmogiani *et al.*, 2013), parece que a acidificação acelera o processo de embriogênese aumentando o desenvolvimento dos tecidos desta espécie.

Em condições de cultivo a 18°C de temperatura, Pimentel *et al.* (2014) obtiveram taxas de eclosão de 86,7% para condições controlo e 70% em condições simulando as previsões de hipercapnia em *Solea senegalensis*, sendo estes resultados semelhantes aos valores obtidos no presente trabalho. Num estudo com *Gadus morhua* (Frommel *et al.*, 2013) os autores obtiveram taxas de eclosão de 82% para o tratamento controlo e entre 68-72% para condições de acidificação, verificando-se que estes dados são semelhantes aos resultados obtidos com *Diplodus sargus*.

Embora alguns estudos tenham registado efeitos nocivos da acidificação dos oceanos sobre o desenvolvimento larvar de peixes marinhos (Dixson *et al.* 2010; Munday *et al.* 2009, 2010), Frommel *et al.* (2013), demonstraram que a eclosão das larvas de *Gadus morhua* não foi afetada significativamente pela acidificação, tendo obtido eclosões com sucesso. Ao contrário de larvas de peixes marinhos tropicais que têm uma taxa de desenvolvimento muito rápido, o bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua* habita em águas mais frias (temperadas a -15°C) apresentando um desenvolvimento mais lento (Fishbase, 2015). As larvas de bacalhau eclodem com um tamanho de cerca de 4 mm, com um saco vitelino altamente dinâmico e muito grande tornando as larvas quase imóveis.

As experiências realizadas neste estudo com larvas de peixes pelágicas decorreram a temperaturas mais elevadas, promovendo um desenvolvimento mais rápido dos peixes, associado a um consumo das reservas vitelínicas, as quais quase não existiam ao início da primeira alimentação. Não se observaram diferenças comportamentais nesta fase inicial de vida.

Neste estudo, para a espécie *Argyrosomus regius* obteve-se taxas de eclosão de 63% e 65% para o tratamento controlo e para o tratamento acidificado, respetivamente, enquanto para o tratamento intermédio obteve-se 89% de eclosão. Como os ovos desta espécie apresentaram maiores dimensões, talvez pela maior fragilidade da membrana referido anteriormente, esta pode ter sido rompida devido aos elevados níveis de CO<sub>2</sub>,

aumentando o desenvolvimento e as taxas de eclosão das larvas. Como o tratamento intermédio não é tão agressivo como o mais acidificado (pH 7,6) sugere-se que as larvas combateram as alterações do meio, consumindo mais energia com a atividade das enzimas no máximo (Bignami *et al.*, 2013), enquanto no tratamento acidificado como é um ambiente mais agressivo, a atividade das enzimas utilizadas no desenvolvimento larvar estava inativa, inibindo-as de funcionar, acabando as larvas por não terem energia suficiente para eclodirem no tratamento mais ácido (Hurst *et al.*, 2013).

Quanto às taxas de eclosão reduzidas no controlo quando comparado com o tratamento intermédio, supõe-se que tenham ocorrido alterações da qualidade da água ou luminosidade ou até mesmo alguns ovos que não estavam nas melhores condições, uma vez que se esperava que o tratamento controlo fosse aquele em que se deveria ter obtido maiores taxas de eclosão. Apesar de se verificar que a eclosão foi mais baixa nos tratamentos acidificados, estes resultados não foram significativos, sendo estes dados consistentes com outras espécies com estágios de desenvolvimento semelhantes (Melzner *et al.*, 2009; Munday *et al.*, 2009; Bignami *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Hurst *et al.* (2013), o tempo de eclosão foi ligeiramente mais curto no tratamento de elevados níveis de CO<sub>2</sub> do que nos outros tratamentos com níveis mais baixos de CO<sub>2</sub>, tendo sido este resultado também observado em *Menidia beryllina* (Baumann *et al.*, 2011). O mesmo se sucedeu, com as larvas das espécies em estudo que começaram a eclodir mais cedo no tratamento mais acidificado (pH 7,6), sugerindo que o ambiente acidificado terá atuado sobre o córion facilitando o romper das membranas pela larva, levando a uma eclosão mais rápida (Franke & Clemmesen, 2011).

Ainda que se tenham observado diferenças significativas no comprimento total entre os diferentes tratamentos, principalmente CT mais elevados no tratamento mais acidificado, é possível afirmar que as larvas das três espécies em estudo apresentem comprimentos do corpo semelhantes ao padrão observado para cada espécie (Klimmogiani *et al.*, 2013; Cerqueira *et al.*, 2005; Coban *et al.*, 2012). Estes resultados foram semelhantes aos resultados de Hurst *et al.* (2013), em que houve uma tendência (não significativa) para larvas de *Theragra chalcogramma* serem maiores no tratamento com níveis elevados de CO<sub>2</sub>. Como os peixes sofreram diversos mecanismos de desenvolvimento desde a fase do ovo, onde ocorreu o rompimento do córion por ação

da acidificação até à eclosão, podem naturalmente ter-se adaptado ao aumento dos níveis de CO<sub>2</sub>, sendo as larvas maiores no tratamento mais acidificado (Frommel *et al.*, 2014).

Não se encontrou nenhuma evidência significativa dos efeitos dos elevados níveis de CO<sub>2</sub> na taxa de sobrevivência e no peso seco durante a história de vida inicial das larvas das espécies em estudo observando-se, no entanto, uma tendência para maior taxa de sobrevivência e maior peso no tratamento mais acidificado (pH 7,6). Como o período embrionário é uma fase de desenvolvimento muito importante para a sobrevivência das larvas de peixe, num estudo com *M. beryllina*, observou-se que os ovos são tolerantes a condições de baixo pH ou altos níveis de CO<sub>2</sub> (Baumann *et al.*, 2011). Para testar esta hipótese estes autores realizaram uma experiência adicional, expondo ovos de *M. beryllina* a condições controlo (400 µatm; pH 8,0) e a condições com níveis elevados de CO<sub>2</sub> (1000 µatm; pH 7,8), tendo observado que aos 5 DAE a sobrevivência foi menor no grupo controlo, e significativamente maior no tratamento ácido, indicando que o impacto principal do CO<sub>2</sub> ocorreu durante a fase de ovo.

Chambers *et al.* (2014) confirmaram a importância da gota lipídica para o peso e sobrevivência da larva em condições de jejum (até aos 3 DAE), pois esta estrutura armazena lípidos. Com o armazenamento dos lípidos até ao consumo das reservas vitelinas (3 DAE) verificou-se um aumento de peso, devido ao aumento do teor de lípidos que se foi acumulando em torno do intestino desde a eclosão até aos 3 DAE.

Recifes de coral e ambientes costeiros caracterizam-se por apresentarem grandes flutuações naturais de pH, com mudanças de 0,1 unidades de pH ou mais, e algumas zonas costeiras tropicais extremas variam de 0,9 unidades de pH (Hofmann *et al.*, 2011). No presente trabalho, as espécies de peixe habitam um ambiente costeiro, podendo apresentar maior tolerância à acidificação dos oceanos do que as espécies de ambientes mais conservativos (Pörtner *et al.*, 2004; Munday *et al.*, 2008). Espécies como *Rachycentron canadum* (Bignami *et al.*, 2013), ou *Coryphaena hippurus* (Bignami *et al.*, 2014) que habitam em zonas costeiras têm provavelmente conduzido à evolução de adaptações, que permitem a rápida aclimação às condições ambientais. O bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua*, embora não tropical, é outra espécie que provavelmente desenvolveu adaptações à elevada pCO<sub>2</sub> encontrada no seu habitat natural (os fiordes) e, conseqüentemente demonstra resistência a altos níveis de acidificação (Frommel *et al.*,

2012). Além disso, os organismos com altas taxas metabólicas requerem um controle fisiológico adequado de equilíbrio ácido-base interno, que pode corresponder a uma tolerância pré-adaptada de elevada  $p\text{CO}_2$  e, assim, reduzida susceptibilidade ao futuro da acidificação do oceano (Melzner *et al.*, 2009). Com a AO ocorrendo a um ritmo mais rápido do que em qualquer momento nos últimos 300 milhões anos (Honisch *et al.*, 2012), as espécies que já possuem essas adaptações podem continuar a prosperar, enquanto as espécies menos desenvolvidas podem ser pouco sucedidas (Bignami *et al.*, 2013).

É importante referir que os níveis de sobrevivência em laboratório podem não fornecer informações significativas sobre a sobrevivência na natureza, porque os agentes habituais de mortalidade, como os predadores e outros fatores antropogênicos, estão ausentes (Munday *et al.*, 2009).

Quanto ao crescimento larvar foi mais baixo nos tratamentos mais acidificados, verificando-se taxas de crescimento entre 11,5-12,2% e 3,8-3,9%, para o linguado e para o sargo, respetivamente. Ao contrário de alguns estudos que têm demonstrado que as larvas podem crescer mais em elevadas condições de  $\text{CO}_2$  (Munday *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2013), muitas das respostas observadas neste estudo são semelhantes aos estudos realizados com larvas de arenque (*Clupea harengus*) (Frommel *et al.*, 2014) e bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Frommel *et al.*, 2012) em condições de acidificação idênticas. Mesmo que os embriões e larvas de peixes sejam capazes de algum nível de adaptação fisiológica ao aumento da  $p\text{CO}_2$ , como a elevada sobrevivência, este processo teria mais custos metabólicos, reduzindo a energia para a síntese dos tecidos, que conseqüentemente iria reduzir o crescimento (Baumann *et al.*, 2011).

Segundo Bignami *et al.* (2013) pressupõe-se que a diminuição do crescimento observado pode ser resultado da alteração da atividade de transportes de iões usados para manter o equilíbrio ácido-base, aumentando a exigência metabólica. Estes pequenos aumentos nas taxas metabólicas podem resultar em efeitos a longo prazo sobre o crescimento e reprodução (Pörtner *et al.*, 2004), com futuros impactos ecológicos, afetando diretamente a eficiência de atividades celulares, podendo causar efeitos nocivos sobre a fisiologia larvar, estagnando o crescimento. Além do rim, a regulação ácido-base nas larvas é conseguida através de células altamente

especializadas, células cloreto ricas em mitocôndrias, que estão localizadas no saco vitelino em embriões aos dois dias após a fertilização (Frommel *et al.*, 2014), mudando a sua distribuição sobre a superfície do corpo durante o desenvolvimento larval. Uma diminuição na abundância de células cloreto, distribuição e tamanho foi anteriormente documentada como um mecanismo para lidar com o stress iônico (Kikkawa *et al.*, 2002).

Uma tendência para taxas de crescimento mais elevadas em larvas de *Argyrosomus regius* expostas a elevados níveis de CO<sub>2</sub> também foram observadas em estudos com bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (Frommel *et al.*, 2013) e peixe-palhaço (*Amphiprion percula*) (Munday *et al.*, 2009). Como as taxas de crescimento diferiram entre espécies neste estudo, sugere-se que um conjunto de outros fatores podem afetar os resultados das experiências especificamente com larvas de ovos pelágicos, como as características do ambiente (Hurst *et al.*, 2013). Visto que a corvina é uma espécie com uma ampla distribuição geográfica com diferentes hábitos de vida, aceitando uma ampla gama de fatores ambientais (Klimogianni *et al.*, 2013), esta espécie poderá possuir alguma capacidade de ajustar um intervalo de flutuação de pH, tolerando melhor a acidificação dos oceanos.

A expectativa de que as variáveis morfológicas nos indivíduos em cada idade de amostragem (0 e 3 DAE) eram interdependentes ou correlacionadas foi confirmada pela análise de componentes principais (ACP). Por conseguinte, através desta análise foi possível avaliar o padrão de distribuição das variáveis morfométricas em função da espécie, do nível de pH e da idade em que foram amostrados. Na ACP realizada para os dois pontos de amostragem verificou-se que os tratamentos estavam agrupados entre as espécies, à exceção da corvina à eclosão, sendo que o tratamento intermédio (pH 7,8) está distante dos restantes tratamentos, indicando a existência de dissimilaridade entre eles. Estes resultados vêm comprovar a existência de diferenças significativas (tabela X) para as diferentes variáveis morfométricas.

Poucos estudos sobre AO têm feito uma caracterização multivariada do desenvolvimento larvar, e até agora nenhum foi realizado em sparídeos e cienídeos. Até ao momento, apenas Chambers *et al.* (2014) apresentaram uma caracterização multivariada com um pleuronectiforme *Paralichthys dentatus*, permitindo avaliar a evolução do desenvolvimento larvar com os elevados níveis de CO<sub>2</sub>. Nas espécies

*Diplodus sargus* e *Solea senegalensis* não se verificou dispersão dos dados (pontos), à eclosão e à abertura de boca, sendo semelhante aos resultados obtidos num estudo com *Acanthochromis polyacanthus* (Munday *et al.*, 2011) em que não se observou nenhuma variação significativa nos diferentes níveis de CO<sub>2</sub>.

Na análise interespecífica, à eclosão, podemos verificar que a espécie que apresentou maior desenvolvimento morfológico foi a corvina, seguida pelo linguado e por fim o sargo, pois as duas primeiras espécies apresentaram maiores medidas da área do saco vitelino. Segundo Kikkawa *et al.* (2003) as larvas com sacos vitelinos maiores tem mais tempo para se prepararem para uma alimentação exógena e para o consumo das suas reservas vitelínicas. Enquanto os sargos, apesar de apresentarem medidas morfométricas de comprimento maiores, têm menos reservas energéticas. Segundo Firat *et al.* (2005) as reservas serão consumidas mais rapidamente, começando a alimentação exógena mais cedo sem sucesso, tornando-se esta espécie mais frágil. Esta relação entre tamanho e reservas energéticas de larvas à eclosão já foi descrita em outros peixes marinhos por Chambers *et al.* (1989), obtendo resultados semelhantes.

Bignami *et al.* (2013) observaram que larvas em condições adversas, consumiam mais energia por apresentarem a atividade das enzimas no máximo, aumentando a exigência metabólica. A observação de maiores gastos energéticos pode justificar a dispersão de dados associados à corvina no tratamento pH 7,8, à eclosão, onde se observou valores mais baixos nas diferentes variáveis morfométricas, podendo as larvas estar a combater as alterações do meio.

Segundo Frommel *et al.* (2014), a energia necessária para uma eficaz regulação ácido-base cutânea conduz a uma diminuição da energia disponível para o desenvolvimento das larvas. Os resultados obtidos por Frommel *et al.* (2014) podem justificar a observação de larvas menores e significativamente menos desenvolvidas no tratamento intermédio do que no controlo e no tratamento mais acidificado (Kreiss *et al.*, 2015).

Em contrapartida, como o tratamento pH 7,6 não apresentou dispersão de dados quando comparado com o pH 8,0, sugere-se que a atividade das enzimas utilizadas no desenvolvimento larvar foi afetada, provavelmente porque o meio é demasiado agressivo, diminuindo a sua eficiência, acabando as larvas por morrerem de exposições prolongadas a elevados níveis de CO<sub>2</sub> (Hurst *et al.*, 2013). Estudos comparando o

crescimento, o desenvolvimento, e a taxa metabólica do ouriço-do-mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) mostraram uma maior procura de energia para uma eficaz regulação ácido-base nos animais expostos a elevados níveis de CO<sub>2</sub> em comparação com o grupo controlo (Stumpp *et al.*, 2011).

Quanto à ACP realizada à abertura de boca, observou-se que a espécie que apresentou maior desenvolvimento morfológico foi o sargo, seguido do linguado e por fim a corvina. Nesta fase, o sargo continua a ser a espécie com valores mais elevados de comprimento, ao contrário da corvina que é a espécie com menor comprimento. Deste modo, pode-se especular que o sargo à eclosão armazenou energia suficiente para a partir do 3º DAE, estar mais apto ao meio aquático e pronto para a alimentação exógena, enquanto a corvina à eclosão provavelmente gastou as suas reservas energéticas rapidamente ao combater as alterações do meio, acabando por estar mais frágil ao 3º DAE, estagnando um pouco o seu crescimento. Resultados semelhantes foram observados num estudo com arenque (*Clupea harengus*) realizado por Frommel *et al.* (2014).

De acordo com a literatura, já existem alguns estudos sobre a organogénese de larvas pelágicas, nomeadamente de duas das espécies em estudo, *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003) e *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999). Quanto à corvina (*Argyrosomus regius*), Papadakis *et al.* (2013) descreveram a organogénese a nível do sistema digestivo, sendo este o segundo trabalho a descrever a organogénese desta espécie.

A descrição da organogénese de larvas de diversas espécies de peixes marinhos tem sido alvo de vários trabalhos, sobretudo do sistema digestivo (Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Rønnestad *et al.*, 2013). O desenvolvimento do sistema digestivo de larvas de peixes marinhos segue um padrão semelhante quer sejam peixes pelágicos (Micale *et al.*, 2008) ou peixes bentónicos (Ribeiro *et al.*, 1999). Neste estudo, a organogénese e a função dos órgãos das larvas das espécies em estudo é descrita em duas fases de desenvolvimento, à eclosão (0 DAE) e à abertura de boca (3 DAE, a 18°C). Em nenhuma destas fases se verificaram diferenças significativas na organogénese com os diferentes níveis de acidificação, indicando por curtos períodos (72h) a acidificação não influenciou a morfologia interna e externa.

As larvas de *S. senegalensis*, *D. sargus* e *A. regius* seguiram um padrão de desenvolvimento do trato digestivo semelhante ao descrito anteriormente em condições de controlo em peixes planos (Ribeiro *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2004), sparídeos (Santamaría *et al.*, 2004; Sarasquete *et al.*, 1995), cienídeos (Zaiss *et al.*, 2006), bem como em outros teleósteos marinhos (O'Connell, 1981; Morrison, 1993), onde as principais alterações morfológicas do sistema digestivo aconteceram durante os primeiros dias de vida, entre a eclosão e a abertura de boca (neste estudo 3 DAE, a 18°C), quando as larvas são exclusivamente dependentes das reservas endógenas.

Em espécies de peixes com ovos e larvas pelágicas, a absorção do vitelo ocorre nos primeiros dias de vida (Falk-Petersen, 2005), ao contrário do alabote do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) que é um caso extremo, sendo cultivado a 5-6°C, a larva absorve as reservas endógenas ao longo de 50 dias (Mangor-Jensen *et al.*, 1998). Durante a fase de alimentação endógena e antes da abertura de boca, a aquisição de nutrientes baseia-se exclusivamente das reservas do saco vitelino e da gota lipídica assimiladas à camada vitelina (Diaz *et al.*, 2002). A reabsorção das reservas endógenas irá permitir à larva desenvolver vários sistemas (locomotor, sensorial, digestivo, etc) que lhe irão permitir capturar, ingerir e digerir o alimento aquando da abertura da boca (Rønnestad *et al.*, 2013).

Da mesma forma que a maioria dos peixes teleósteos, as larvas das espécies em estudo apresentaram um sistema digestivo indiferenciado e rudimentar, com um tubo indiferenciado linear, situado dorsalmente ao saco vitelino, com a boca e o ânus fechado, sendo estes eventos consistentes em descrições feitas em outros peixes teleósteos, como *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Solea solea* (Boulhic e Gabaudan, 1992), *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), *Sparus aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995), *Dentex dentex* (Santamaría *et al.*, 2004), *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *Pagrus pagrus* (Roo *et al.*, 1999), *Argyrosomus regius* (Papadakis *et al.*, 2013).

O desenvolvimento do olho é um processo notavelmente rápido em espécies de peixes teleósteos. À eclosão, as principais camadas do olho podiam ser distinguidas, mas os olhos não estavam pigmentados, nem funcionais até à primeira alimentação exógena. Ao 3º dia de vida, foi possível distinguir uma estrutura pigmentada com diferentes camadas. Este fato é uma característica típica de espécies com



desenvolvimento indireto. Por outro lado, espécies com desenvolvimento direto têm os olhos ricamente pigmentados e funcionais antes de eclodir (Falk-Petersen, 2005). Por exemplo algumas larvas marinhas como o arenque (*Clupea harengus*), a retina é diferenciada, à eclosão, mas na maioria dos peixes planos e sparídeos o desenvolvimento do olho é um pouco mais lento (McFarlane *et al.*, 1991, Kvenseth *et al.*, 1996), aparecendo cápsulas óticas redondas pouco desenvolvidas, com neuromastos livres ao redor dos olhos, coincidindo com a incapacidade de nadar na horizontal, estando limitada a nadar para cima e para baixo na coluna de água (Dunaevskaya *et al.*, 2012). Nos dias subsequentes, as larvas já conseguiam nadar mais ativamente, podendo nadar horizontalmente por curtos períodos de tempo. Este comportamento foi associado ao desenvolvimento de canais semicirculares, que permitem uma melhor visibilidade e natação. Os neuromastos desempenham um papel importante no início da relação entre as larvas e o ambiente, uma vez que o comportamento das larvas é alterado de acordo com a disponibilidade de alimentação, tipo de presas, a luminosidade e o ambiente (Padrós *et al.*, 2011). Estes resultados estão de acordo com Fuiman *et al.* (2004), que sugeriram que este desenvolvimento de uma matriz de neuromastos pode conferir maior capacidade funcional às larvas, funcionalidade que pode ser aumentada durante o desenvolvimento larvar através da proliferação de neuromastos sobre a superfície da larva. Este rápido desenvolvimento do olho pode ser um indicador do crescimento das larvas, permitindo a detecção de movimentos mínimos na água, que pode ser utilizado pelas larvas para detetar as presas (Pankhurst, 2007; Otsuka, 2003).

De acordo com Padrós *et al.* (2011), antes da alimentação exógena, as larvas possuem um aparelho circulatório pouco desenvolvido e não têm respiração branquial. Com o aumento do desenvolvimento larvar, o desenvolvimento do sistema cardiovascular é regulado pelas necessidades sistémicas para o transporte de oxigénio, dióxido de carbono e nutrientes, os quais são acionados por alterações morfológicas, fisiológicas, comportamentais e ecológicas, associadas a uma vida pelágica.

Em comparação com outros sistemas de órgãos, as brânquias formam-se relativamente tarde e vão substituindo gradualmente a pele, como o local onde ocorrem a maioria das trocas gasosas (Rombough, 2004). Assim, após a eclosão, a osmorregulação é realizada pelo tegumento que ainda é fino (Santamaría *et al.*, 2004), e por células de cloreto, que aparecem dispersas ao longo da epiderme, particularmente no epitélio buco-faríngeo, sendo estas células responsáveis pelo equilíbrio de iões (Padrós

*et al.*, 2011). Estes processos já foram confirmados em estudos com outras espécies de peixe, como *Oreochromis mossambicus* (Li *et al.*, 1995) e *Clupea harengus* (Walles & Tytler, 1996).

Ainda que à abertura de boca se tenham observado resíduos do saco vitelino, as larvas em estudo mostraram uma taxa muito elevada de consumo das reservas e um desenvolvimento mais rápido que outras espécies, como gadídeos que se desenvolvem mais lentamente (a 4°C) (*Gadus morhua*) (Falk-Petersen, 2005; Frommel *et al.*, 2013). O alto consumo do saco vitelino está relacionado com um elevado consumo de energia em temperatura temperadas, devido às mudanças morfológicas (desenvolvimento de estruturas ósseas da cabeça) e fisiológicas (capacidade natatória, processos de captura, ingestão e digestão das presas) que ocorrem durante as fases iniciais de desenvolvimento, e ao mesmo tempo confere vantagens que melhoram o desempenho e a eficiência de crescimento em estágios larvares mais avançados (Geffen *et al.*, 2007).

Aos 2 DAE, larvas de *Dicologlossa cuneata* são capazes de se alimentar de forma exógena, como outros Pleuronectiformes: *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), *Solea solea* (Boulhic e Gabaudan 1992), *Paralichthys dentatus* (Bisbal & Bengtson, 1995) e *Scophthalmus rhombus* (Hachero- Cruzado *et al.* 2009). As diferenças na funcionalidade e diferenciação das regiões do trato digestivo pode estar relacionado a diversos fatores, como a posição taxonómica, tamanho do ovo, a temperatura da água, e estratégias de alimentação (Herrera *et al.*, 2009). Como *Dicologlossa cuneata* é uma espécie de crescimento rápido e de pequeno porte, o sistema digestivo diferencia-se um dia antes do que o normal em outros peixes teleósteos. Neste sentido, o processo pode ser adiantado se a temperatura da água for mais elevada. Assim, a duração da fase endotrófica iria encurtar o início da alimentação exógena.

A abertura da cavidade bucal e do ânus é um dos desenvolvimentos mais importantes do sistema digestivo, salientando a rápida preparação e transição das larvas para a fase da alimentação exógena (Papadakis *et al.*, 2013). A diferenciação do trato digestivo começa com a distinção histológica de quatro segmentos (isto é, cavidade buco-faríngea, esófago, estômago incipiente e intestino, dividido em intestino anterior e posterior), que ocorrem antes da abertura da boca (Zambonino-Infante *et al.*, 2008), coincidindo com a primeira alimentação exógena. O trato digestivo dos teleósteos marinhos, como o sargo, a corvina e o linguado, desenvolve-se a partir de um canal

direto e indiferenciado à eclosão para um sistema digestivo complexo e segmentado na fase juvenil, o que garante processos de digestão e absorção mais eficientes (Rønnestad *et al.*, 2013). Embora a idade da primeira alimentação exógena tenha variado com a idade e com a temperatura a que as espécies foram cultivadas, resultados semelhantes foram descritos para outras espécies, como pregado (*Scophthalmus maximus*) (Cousin & Baudin-Laurencin, 1985), solha (*Limanda ferrugínea*) (Baglolle *et al.*, 1997) e linguado (*Solea senegalensis*) (Ribeiro *et al.*, 1999).

A rápida segmentação do intestino de peixes teleósteos ocorre durante a sobreposição da fase da alimentação exógena, estando correlacionado com a abertura de boca (aos 3 DAE, a 18°C), como descrito em outros peixes (Elbal *et al.*, 2004). O desenvolvimento simultâneo das vilosidades intestinais, especialmente no intestino posterior, e com a formação do estômago incipiente, aos 2-3 DAE, indica um aumento na capacidade de absorção e sugere que o intestino posterior é mais ativo que os restantes segmentos, em termos de absorção, durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Ostaszewska, 2005). O estômago incipiente distingue-se aos 2-3 DAE como um alargamento do trato digestivo após o esófago, cujo desenvolvimento e funcionalidade 2 a 3 semanas após a abertura da boca e consoante a espécie (Rønnestad *et al.*, 2013) está relacionado principalmente com a diferenciação das glândulas gástricas e com a otimização da digestão mecânica e enzimática de alimentos (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

O fígado e o pâncreas desenvolveram-se enquanto a larva foi consumindo as reservas endógenas, estando estes órgãos funcionais à abertura de boca (Herrera *et al.*, 2010). À abertura de boca das espécies em questão, observou-se a distinção do pâncreas exócrino e endócrino funcionais, indicando que a larva já tem a função enzimática a funcionar (Ostaszewska, 2005). O pâncreas exócrino produz e segrega enzimas digestivas no intestino, em que a quantidade de enzimas aumenta com o desenvolvimento da larva (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Da mesma forma, o fígado estava funcional a partir dos 3 DAE, como relatado em outras espécies, como *Solea solea* (Boulhic & Gabaudan, 1992) e *Paralichthys dentatus* (Bisbal & Bengston, 1995).

A principal variabilidade interespecífica encontrada na organogénese reside no desenvolvimento da musculatura, em que se verificou que a corvina apresentou um desenvolvimento do músculo mais rápido do que as outras espécies em estudo. Uma vez que as espécies foram mantidas nas mesmas instalações, nas mesmas condições de

temperatura e salinidade da água. Esta diferença pode ser atribuída a diferentes hábitos alimentares, sendo a corvina uma espécie carnívora (Mylonas *et al.*, 2013) e também ao seu rápido desenvolvimento como *U. cirrosa* (Papadakis *et al.*, 2013) quando comparado com outras espécies, como *Sparus aurata* (Elbal *et al.*, 2004).

O crescimento muscular em larvas de peixe ocorrem tanto por hiperplasia (produção de novas fibras musculares) como por hipertrofia (aumento no tamanho das fibras musculares) (Pittman *et al.*, 2013). A proliferação e diferenciação destas células leva à formação de novas fibras, que podem ser influenciadas pelo ambiente (temperatura), parâmetros nutricionais (Valente *et al.*, 2013), e por características fisiológicas, como capacidade natatória e captura de presas. Tais efeitos foram observados em muitos teleósteos (Alani-Durante *et al.*, 2006), como salmão (*Salmo salar*) (Albokhadaim *et al.*, 2007) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Alani-Durante *et al.*, 2006).

## **6. Considerações Finais**

Este trabalho indica que as espécies pelágicas estudadas não estão imunes ao impacto da acidificação dos oceanos. No entanto, *Diplodus sargus* e *Solea senegalensis* demonstraram substancialmente maior suscetibilidade à acidificação dos oceanos do que *Argyrososmus regius* que está presumivelmente melhor adaptada às variações das condições ambientais.

Neste estudo verificou-se que as larvas nascem com maiores dimensões, mas com menos reservas vitelinas, indicando que o período que podem estar sem se alimentar é menor, o que poderá levar a problemas de recrutamento. Ainda assim, os resultados deste estudo, em combinação com a nossa compreensão da capacidade fisiológica de peixes marinhos (por exemplo, Ishimatsu *et al.*, 2008; Melzner *et al.*, 2009), sugerem que o desenvolvimento dos estágios iniciais de vida de alguns peixes podem não ser seriamente afetados pelas alterações das concentrações de CO<sub>2</sub> que estão previstas para ocorrer no oceano ao longo dos próximos 50 a 100 anos.

A organogênese das larvas pelágicas descrita neste trabalho pode ser útil para estabelecer as capacidades sistêmicas funcionais e requisitos fisiológicos das larvas para garantir o bem-estar ideal e crescimento sob condições de acidificação a curto prazo. Um breve resumo dos eventos envolvidos no desenvolvimento larval de peixes teleósteos indica que os primeiros estágios larvares pelágicos são caracterizados por um rápido desenvolvimento sensorial (visão) e dos órgãos digestivos. Estes últimos órgãos são responsáveis pela alimentação, a digestão e a utilização das reservas endógenas, a fim de acelerar o crescimento das larvas e maximizar a sobrevivência. Como Youson (1988) afirmou, o desenvolvimento larvar está claramente correlacionado com alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, incluindo alimentação e digestão.

Embora estes resultados ofereçam uma perspectiva otimista para o futuro de espécies de ovos pelágicos com a acidificação dos oceanos, a investigação sobre espécies pelágicas continua a ser limitada.

## **7. Perspetivas futuras**

Atualmente, é impossível generalizar os efeitos da AO em larvas de peixes, provavelmente por causa da diversidade dos mecanismos de ação sobre os processos de desenvolvimento e estágios iniciais de vida. Se as espécies serão capazes de se adaptar às rápidas mudanças climáticas ainda é incerto. No entanto, algumas espécies de peixes sofrem elevada mortalidade devido à pesca, além de outros fatores ambientais, como poluição, aquecimento global e hipoxia, que afetam o desenvolvimento larval. Portanto, os potenciais efeitos da acidificação dos oceanos devem ser adicionados à lista crescente de perturbações antrópicas que levam a um aumento da mortalidade nas fases iniciais de vida, e devem ser incorporadas em futuros modelos de avaliação.

São necessários estudos em outros ambientes costeiros, incluindo ambientes variáveis de pH (por exemplo, zonas de ressurgência, sistemas de ventilação de CO<sub>2</sub> e áreas estuarinas) para explorar se a exposição a um ambiente de pH mais variável confere potencial de adaptação. São necessários mais estudos fisiológicos de forma a entender como essas respostas individuais afetam o desenvolvimento de organismos marinhos, que mais tarde poderão ter consequência ecológicas nos ecossistemas marinhos. Também é necessário prolongar o tempo de experiência de forma a avaliar uma possível aclimatação ou respostas adaptativas à exposição de ambientes acidificados.

Trabalhos recentes sobre ostras e peixes de recife de coral têm demonstrado que a sensibilidade dos estágios iniciais de vida a níveis elevados de CO<sub>2</sub> pode ser afetada pelo ambiente parental. A exposição dos pais a níveis elevados de CO<sub>2</sub> mostrou moderar os efeitos negativos do CO<sub>2</sub> sobre a descendência (Munday, 2014; Miller *et al.*, 2012), com diferenças específicas da população. Portanto, sugere-se em futuros trabalhos sujeitar os reprodutores a diferentes níveis de acidificação de modo a avaliar o efeito dos baixos níveis de pH nas fases iniciais de vida, como os ovos e as larvas, a longo prazo, sendo estas fases mais vulneráveis às alterações climáticas.

Deve-se considerar também, os potenciais efeitos combinados de temperatura/salinidade com o aumento da pCO<sub>2</sub> ambiental em estágios iniciais de vida. Tanto a temperatura como os elevados níveis de CO<sub>2</sub> reduzem a performance aeróbia dos peixes (Pörtner *et al.*, 2004; Pörtner & Farrell, 2008), consequentemente, os seus efeitos podem

interagir e ter impactos significativos no desempenho individual e na sustentabilidade da população.

Em relação aos peixes marinhos, a acidificação dos oceanos pode afetar processos de calcificação, como a formação de esqueletos e otólitos (Checkley *et al.*, 2009), devido ao aumento da concentração do ião carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) exigida pelos organismos marinhos calcificados que sintetizam carbonato ( $\text{CaCO}_3$ ) e minerais, tais como a calcite e aragonite. As últimas estruturas mencionadas são importantes na detecção do som, na orientação do corpo, na aceleração, na posição dos otólitos no ouvido interno e do movimento dos otólitos sobre as células pilosas sensitivas (Checkley *et al.*, 2009; Réveillac *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2014). Quaisquer mudanças no tamanho, forma ou densidade de otólitos poderá ter sérias implicações para o desempenho ecológico e aptidão individual (Munday *et al.*, 2009), diminuindo as suas probabilidades de sobrevivência (Réveillac *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2014). Os otólitos são compostos de aragonite, que irá tornar-se menos abundante, pois o oceano tornar-se-á mais ácido, e isso pode afetar o crescimento dos otólitos, tal como também pode influenciar o seu acoplamento com o crescimento do esqueleto estrutural (Munday *et al.*, 2011; Checkley *et al.*, 2009). Se os otólitos asseguram funções de audição e equilíbrio biológico do peixe, eles também são uma ferramenta essencial usada em biologia pesqueira de reconstruir a história de vida individual em termos de idade, crescimento, escolha de habitats e evitar os predadores. Caso a acidificação afete negativamente o desenvolvimento dos otólitos, irá prejudicar a sobrevivência dos peixes (Réveillac *et al.*, 2015; Checkley *et al.*, 2009).

Atualmente, e na continuidade deste trabalho, estão a ser processados os otólitos, de forma a avaliar o efeito da acidificação dos oceanos em estruturas calcificadas nas larvas de *Solea senegalensis*, *Diplodus sargus* e *Argyrososmus regius*

## 8. Referências Bibliográficas

- Abreu, N., Socorro, J., Betancor, M., Caballero, M. J., Fernández-Placios, H., Hernández-Cruz, C. M., Roo, J., Schuchardt, D. (2009). Nuevas aportaciones al estudio de la organogénesis en larvas de corvina (*Argyrosomus regius* Asso, 1801). en Beaz, D., Villarroel, M., Cárdenas, S., eds. XII Congreso Nacional de Acuicultura: Com la acuicultura alimentamos tu salud. Marm, Sea y Foesa. Madrid, Espanha: 501- 511
- Abellan, E. & Garcia-Alcazar, A. (1995). Pre-growout and growout experiences with white seabream (*Diplodus sargus*, Linnaeus, 1758) and sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti, 1977). Instituto Espanol de Oceanografia, Murcia (Spain). Centro Oceanográfico de Murcia.
- Ahlstrom, E. H., Amaoka, K., Hensley, D. A., Moser, H. G., Sumida, B. Y. (1984), Pleuronectiformes: development. In: Moser, H. G.; Richards, W. J.; Cohen, D. M.; Fahay, M. P.; Kendall, A. W., Richardson, S. L. (Eds.). *Ontogeny and Systematics of Fish. American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, La Jolla (Ca). 640-670.
- Alami-Durante, H., Rouel, M., Kentouri, M. (2006) New insights into temperature-induced white muscle growth plasticity during *Dicentrarchus labrax* early life: a developmental and allometric study. *Marine Biology*, 149: 1551–1565.
- Albokhadaim, I., Hammond, C. L., Ashton, C., Simbi, B. H., Bayol, S., Farrington, S. (2007) Larval programming of post-hatch muscle growth and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology*, 210: 1735–1741.
- Andrades, J. A., Becerra, J., Fernández-Llebrez, P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141: 1-11
- Anthony, K. R. N., Kline, D. I., Diaz-Pulino, G., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O. (2008) Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(45): 17442-17446
- Antolovic, N., Kozul, V., Safner, R., Glavic, N., Bolotin, J. (2010) Embryonic and yolk-sac larval development of saddled bream, *Oblada melanura* (Sparidae). *Cybium*, 34 (4): 381- 386
- Araújo-Lima, C., Kirovsky, A., Marca A. (1993) As larvas dos pacus, *Mylossoma* spp. (Teleostei, Characidae), da Amazônia Central. *Revista Brasileira de Biologia*, 53: 591-600
- Arufe, M. I., Arellano, J., Moreno, M. J., Sarasquete, C. (2004) Toxicity of a comercial herbicide containin terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 209- 2016



- Baglole, C. J., Murray, H. M., Goff, G. P., Wright, G. M. (1997) Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.*, 51: 120–134.
- Basallote, M. D., Rodríguez-Romero, A., Blasco, J., DelValls, A., Riba, I. (2012) Lethal effects on different marine organisms, associated with sediment- seawater acidification deriving from CO<sub>2</sub> leakage. *Environmental Science Pollution Research*, 19: 2550- 2560.
- Baumann, H., Talmage, S. C., Gobler, C. J. (2011) Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nature Climate Change*, 2: 38-41
- Ben-Asher, R., Seginer, I., Mozes, N., Nir, O., Lahav, O., (2013) Effects of sub-lethal CO<sub>2</sub> (aq) concentrations on the performance of intensively reared gilthead seabream (*Sparus aurata*) in brackfish water: Flow-through experiments and full-scale RAS results. *Aquacultural Engineering*, 56: 18-25
- Bigname, S., Susponagle., Cowen, R. K. (2013) Response to ocean acidification in larvae of large tropical marine fish, *Rachycentron canadum*. *Global Change Biology*, 19: 996-1006
- Bigname, S., Sponagle, S., Cowen, R. K. (2014) Effects of ocean acidification on the larvae of a high-value pelagic fisheries species, mahi-mahi *Coryphaena hippurus*. *Aquatic Biology*, 21: 249- 260
- Bisbal, G.A. & Bengston, D.A. (1995) Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology*, 47: 277–291
- Blaxter, J. H. S. & Hempel, G. (1963) The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus*). *Journal Cons. C. I. E. M.*, 28: 211-240
- Bolner, K. C. S., Copatti, C. E., Rosso, F. L., Loro, V. L., Baldisserotto, B. (2014) Water pH and metabolic parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 56: 202- 208
- Borges, A. V. e Gypens, N. (2010) Carbonate chemistry in the coastal zone responds more strongly to eutrophication than to ocean acidification. *Limnology and Oceanography*, 55 (1): 346-353
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L. M. (2009) Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British journal of nutrition*, 102 (07), 1007-1014.
- Boulhic, M. & Gabaudan, J. (1992) Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*, 102: 373–396.

- Braak, C. J. F. & Smilauer, P. (2002) CANOCO Reference manual and Cano Draw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5) Microcomputer Power (Ithaca, NY, USA): 500
- Caldeira, K., & Wickett, M. E. (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature Publishing Group*, 425: 365
- Caldeira, K. & Wickett, M. E. (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysical Research*, 110: 1- 12
- Catalán, I. A., Jiménez, M. T., Alconchel, J. I., Prieto, L., Muñoz, J. L. (2006) Spatial and temporal changes of coastal demersal assemblages in the Gulf of Cadiz (SW Spain) in relation to environmental tal conditions. *Deep-Sea Research II*, 53: 1402-1419
- Cerqueira, V. R. (2005) Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (3): 459- 465
- Chambers, R. C., Candelmo, A. C., Habeck, E. A., Poach, M. E., Wiczorek, D., Cooper, K. R., Greenfiel, C. E., Phelan, B. A. (2014) Effects of elevated CO<sub>2</sub> in the early life stages of summer flounder, *Paralichthys dentatus*, and potential consequences of ocean acidification. *Biogeosciences*, 11: 1613- 1626
- Chanet, B. & Dettai, A. (2008) Presence of juvenile *Diplodus sargus* on the seashore of North Brittany (France). *Cybiurn*, 32 (4): 339- 340
- Checkley, D. M., Dickson, A. G., Takahashi, M., Radich, J. A., Eisenkolb, N., and Asch, R. (2009) Elevated CO<sub>2</sub> enhances otolith growth in young fish, *Science*, 324: 1683–1683
- Coban, D., Suzer, C., Yildirim, S., Saka, S., Firat, K. (2012) Morphological development and allometris growth of shapsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) larvae. *Turkish of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12: 883- 891
- Conceição, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragão, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., Dinis, M.T. (2007) Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268, 64-81.
- Cossarini, G., Lazzari, P., Solidoro, C. (2014) Space-time variability of alkalinity in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences Discuss*, 11: 12871- 12893
- Cousin, J. C. B., Baudin-Laurencin, F. (1985) Morphogénese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 47: 305–319.
- Cruz, W., Grau, A., Pastor, E., Crespo, S., Sala, R. (2007) Desarrollo ontogénico de la larva de corvina (*Argyrososmus regius*): estudio preliminar. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Xunta de Galicia
- Darias, M. J., Ortiz-Delgado, J. B., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M. (2007) Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histology and Histopathology*, 22: 753:768

- Deigweier, K., Koschnick, N., Pörtner, H., Lucassen, M. (2008) Acclimation of ion regulatory capacities in gills of marine fish under environmental hypercapnia. *American Journal of Physiology*, 295: 1660- 1670
- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Le Corre, N., Letty, Y. (1987) Spawning of Solea (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, 66: 125- 147
- Devine, B. M., Munday, P. L., Jones, G. P. (2012) Rising CO<sub>2</sub> concentrations affect settlement behaviour of larval damselfishes. *Coral Reefs*, 31: 229-238
- Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., da Conceição, L. E., Gomes, E. F., Dinis, M. T. (2004) Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research*, 35 (12), 1122-1130.
- Diaz, J.P., Mani-Ponset, L., Blasco, C., Connes, R. (2002) Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquatic Living Resources*, 15: 169–178.
- Dickson, A.G., Millero, F.J., (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res.* 34, 1733-1743.
- Dinis, M.T. (1986). Quatre soleidae de l'estuaire du Tage. Reproduction et croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup. Thèse de Doctorat *Æs-Sciences Naturelles*, Université de Bretagne Occidentale, Brest: 348
- Dinis, M.T. (1992) Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to na artificial diet. *Aquac. Fish. Manage.* 23, 515–520.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F. and Sarasquete, C. (1999) A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27 38.
- Dixson, D. L., Munday, P. L., Jones, G. P. (2010) Ocean acidification disrupts the innate ability of fish to detect predator olfactory cues. *Ecology Letters*, 13: 68-75
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., and Kleypas, J. A. (2009) Ocean acidification: The other CO<sub>2</sub> problem, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 1: 169–192
- Domenici, P., Allan, B., McCormick, M. I., Munday, P. L. (2015) Elevated carbon dioxide affects behavioural lateralization in a coral reef fish. *Biology Letters*, 8: 78-81
- Drake, P., Arias, A.M., Rodriguez, A. (1984) Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cadiz): II. Características de la producción de peces. *Inf. Tec. Inst. Inv. Pesq.* 116, 1–23.
- Dunaevskaya, E., Amin, A. B., Ottesen, O. H. (2012) Organogenesis of Ballan Wrasse *Labrus Bergylta* (Ascanius 1767) Larvae. *Aquaculture Research and Development*, 3 (5): 1-6

- Dupont, S. & Thorndyke, M. C. (2009) Impact of CO<sub>2</sub>- driven ocean acidification on invertebrates early life-history- What we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discussions*, 6: 3109- 3131
- Dupont, S., Lundve, B., Thorndyke, M. (2010) Near future ocean acidification increases growth rate of the Lecithotrophic larvar and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *Journal of Experimental Zoology: Part B Molecular and Development Evolution*, 314: 1-8
- Elbal, M. T., García Hernández, M. P., Lozano, M. T., Agulleiro, B. (2004) Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*, 234: 215–238.
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., Orr, J. C. (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *Journal of Marine Science*, 65: 414-432
- Falk-Petersen, I. B. (2005). Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 397– 412
- FAO (2014a) Cultured Aquatic Species Information Programme – *Solea solea* (Quensel, 1806). *FAO Fisheries & Aquaculture*. <http://www.fao.org/fishery/species/3367/en>
- FAO (2014b) Cultured Aquatic Species Information Programme – *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758). *FAO Fisheries & Aquaculture*. <http://www.fao.org/fishery/species/2370/en>
- Faranda F., Cavallere A., Lo Paro G., Manganaro A., Mazzola, A. (1985) Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin, 1789) under controlled conditions. *Aquaculture*, 49:111-123
- Feely, R. A., Alin, S. R., Newton, J., Sabine, C. L., Warner, M., Devol, A., Krembs, C., Maloy, C. (2010) The combined effects of ocean acidification, mixing and respiration on pH and carbonate saturation in na urbanized estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 88: 442-449
- Feely, R. A., Sabine, C. L., Lee, L., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V. J., Millero, F. J. (2004) Impact of Anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans. *Science*, 305: 362- 366
- Feidantsis, K., Pörtner, H., Antonopoulou, E., Michaelidis, B. (2014) Synergistic effects of acute warming and low pH on celular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Comparative Physiology B*, 185:1-21
- Fernandez- Palacios, H., Montero, D., Socorro, J., Izquierdo, M. S., Vergara, J. M. (1994) First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture*, 122: 63-73

- Ferrari, M. C. O., McCormick, M. L., Munday, P. L., Meekan, M. G., Dixon, D. L., Lönnstedt, O., Chivers, D. (2012) Effects of ocean acidification on visual risk assessment in coral reef fishes. *Functional Ecology*, 26: 553- 558
- Firat, K., Saka, S., Kamaci, H. O. (2005) Embryonic and larval development of striped sea bream (*Lithognathus mormyrus* L. 1758). *The Israeli Journal of Aquaculture*, 57 (2): 131- 140
- Fishbase (2015) <http://www.fishbase.org/summary/69>
- Franke, A. & Clemmesen, C. (2011) Effect of ocean acidification on early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Biogeosciences Discussions*, 8: 7097- 7126
- Frommel, A. Y., Maneja, R., Lowe, D., Malzahn, A. M., Geffen, A. J., Folkvord, A., Piatkowski, U., Reusch, T. B. H., Clemmesen, C. (2011) Severe tissue damage in Atlantic Cod larvae under increasing ocean acidification. *Nature Climate Change*, 2: 42-46
- Frommel, A.Y., Schubert, A., Piatkowski, U., Clemmesen, C. (2012) Egg and early larval stages of Baltic cod, *Gadus morhua*, are robust to high levels of ocean acidification. *Marine Biology*. doi: 10.1007/s00227-011-1876-3
- Frommel, A. Y., Schubert, A., Piatkowski, U., Clemmesen, C. (2013) Egg and early larval stages of Baltic cod, *Gadus morhua*, are robust to high levels of ocean acidification. *Marine Biology*, 160: 1825- 1834
- Frommel, A. Y., Maneja, R., Lowe, D., Pascoe, C. K., Geffen, A. J., Folkvord, A., Piatkowski, U., Clemmesen, C. (2014) Organ damage in Atlantic herring larvae as a result of ocean acidification. *Ecological Applications*, 24 (5): 1131- 1143
- Fuiman, L. A., Higgs, D. M. & Poling, K. R. (2004) Changing structure and function of the ear and lateral line system of fishes during development. *American Fisheries Society Symposium*, 40: 117–144.
- Geffen, A. J., van der Veer, H. W. & Nash, R. D. M. (2007). The cost of metamorphosis in flatfishes. *Journal of Sea Research* 58, 35 – 45
- Gisbert, E., Piedrahita, R. H. & Conklin, D. E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232: 455– 470
- Godinho, H. P. (2007) Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (3): 351- 360
- Godinho H.P., Godinho A. L. (2003) (Org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas: 361-372.
- Golomazou, E., Athanassopoulou, F., Vagianou, S., Sabatakou, O., Tsantilas, H., Rigos, G. & Kokkokiris, L. (2006) Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30 (4), 389-396.

- Gooding, R. A., Harley, C. D. G., and Tang, E. (2009) Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 9316–9321
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y. (1986) The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology Fish*, 16 (1- 3): 59– 77
- Guinotte, J. M., & Fabry, V. J. (2008) Ocean acidification and its potential effects on marine Ecosystems. *Annual New York Academy of Sciences*, 1134: 320- 342
- Gutowska, M. A., Melzner, F., Langenbuch, M., Bock, C., Claireaux, G., and Poertner, H. O. (2010) Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia, *J. Comp. Physiol. B*, 180: 323–335
- Guyot, E., Díaz, J.P., Connes, R., (1995) Organogenesis of the liver in sea bream *Sparus aurata*. *Journal Fish Biology*, 47: 427– 437.
- Hachero-Cruzado, I., Ortiz-Delgado, J. B., Borrega, B., Herrera, M., Navas, J. I. & Sarasquete, C. (2009). Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 286, 138– 149
- Hamlin, H.J., Hunt von Herbing, I., Kling, L.J. (2000) Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal Fish Biology*, 57: 716– 732.
- Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thomber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L., Williams, S. (2009) The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters*, 9 (2): 1- 14
- Hayashi, M., Kita, J., Ishimatsu, A. (2004) Acid-base responses to lethal aquatic hypercapnia in three marine fishes. *Marine Biology*, 144: 153-160
- Hempel, G. (1979) Early Life History of Marine Fish. The Egg Stage. University of Washington Press, Seattle, WA: 71
- Hendriks, I. E., Duarte, C. M., Álvarez, M. (2010) Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86: 157- 164
- Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Naranjo, A., Mancera, J. M. (2010) Organogenesis and histological development of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* M. larva with special reference to the digestive system. *Rev Fish Biol Fisheries*, DOI 10.1007/s11160-010-9161-y
- Hofmann, G. E., Smith, J. E., Johnson, K. S., Send, U., Levin, L. A., Micheli, F., Paytan, A., Price, N., Peterson, B., Takeshita, Y., Matson, P. G., Crook, E. D., Kroeker, K. J., Gambi, M. C., Rivest, E. B., Frieder, C. A., Yu, P. C., Martz, T. R. (2011) High-frequency dynamics of ocean pH: a multi-ecosystem comparison. *PLoS ONE*, 6 (12): 1-11.
- Honisch, B., Ridgwell, A., Schmidt, D. N. (2012) The geological record of ocean acidification. *Science*, 335, 1058–1063.

- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Pedro, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A., Hatziolos, M. E. (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318: 1737- 1742
- Hurst, T. P., Fernandez, E. R., Mathis, J. T. (2013) Effects of ocean acidification on hatch size and larval growth of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *ICES Journal of Marine Science*, 70 (4): 812- 822
- Hurst, T. P., Laurel, B. J., Mathis, J. T., Tobosa, L. R. (2015) Effects of elevated CO<sub>2</sub> levels on eggs and larvae of a North Pacific flatfish. *ICES Journal of Marine Science*, 70 (4): 1- 6
- Imslund, A.K., Dragsnes, M. and Stefansson, S.O. (2003) Exposure to continuous light inhibits maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 219, 911–919.
- Ishimatsu, A., Kikkawa, T., Hayashi, M., Lee, K., Kita, J. (2004) Effects of CO<sub>2</sub> on marine fish: Larvae and adults. *Journal of Oceanography*, 60: 731- 741
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., and Kikkawa, T. (2008) Fishes in high-CO<sub>2</sub>, acidified oceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 373: 295–302
- Jug-Dujaković, J., Dulčić, J., Katavić, I. (1995) Embryonic and yolk-sac larval development of the sparid *Dentex (Dentex) dentex* (Linnaeus, 1758). *Fisheries Research*, 24: 91- 97
- Kikkawa, T. J., Kita, U. N., Ishimatsu, A. (2002) Effects of CO<sub>2</sub> on early development and growth of red sea bream (*Pagrus major*). *Fisheries Science Research*, 68: 637– 638
- Kikkawa, T., Ishimatsu, A., Kita, J. (2003) Acute CO<sub>2</sub> tolerance during the early development stages of four marine teleosts. *Environmental Toxicology*, 18: 375- 382
- Kikkawa, T. & Kita, J. (2005) Physiology effects on fishes in a high-CO<sub>2</sub> world. *Journal of Geophysical Research*, 110: 1-8
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995) Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Development Dynamics*, 203: 253- 310
- Kleypas, J. A. and Yates, K. (2009) Coral Reefs and Ocean Acidification. *Oceanography*, 22 (4): 108- 117
- Klimogianni, A., Kalanji, M., Pyrenis, G., Zoulioti, A., Trakos, G. (2011) Ontogeny of embryonic and yolk-sac larval stage of the sparid sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6 (1): 62-73
- Klimogianni, A., Pagoulatou, M., Trageli, M., Hotos, G. N. (2013) Investigation on early development, the feeding ability and larval survival under starvation in

- common meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Journal of Aquatic Science*, 1 (1): 1-6
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M. (1996) Embryonic and yolk-sac development of *Dentex dentex* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes, Sparidae). *Marine Life*, 6 (1-2): 41-50
- Koutsikopoulos, C., Desaunay, Y., Dorel, D., Marchand, J. (1989) The role of coastal areas in the life history of sole (*Solea solea* L.) in the Bay of Biscay. *Scient. Mar.*, 53: 567-575.
- Kreiss, C. M., Michael, K., Lucassenm M., Jutfelt, F., Motyka, R., Dupont, S., Pörtner, H-O. (2015) Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Comp. Physiol. B*. DOI 10.1007/s00360-015-0923-7
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. G., Duarte, C. M., Gattuso, J. (2013) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology*, 19: 1884-1896
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N., Singh, G. G. (2010) Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters*, 13: 1419- 1434
- Kvenseth, A. M., Pittman, K. & Helvik, J. V. (1996). Eye development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): differentiation and development of the retina from early yolk sac stages through metamorphosis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2524– 2532
- Lachkar, Z. (2014) Effects of upwelling increase on ocean acidification in the California and Canary Current systems. *Geophysical Research Letters*, 41: 90-95
- Li, J., Eygensteyn, J., Lock, R.A.C., Verboost, P.M., Van der Heijden, A.J.H., Wendelaar-Bonga, S.E.W., Flick, G. (1995) Branchial chloride cells in larvae and juveniles of freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal Experimental Biology*, 198: 2177– 2184.
- Machinandiarena, L., Müller, M., López, A. (2003) Early life stages of development of the red porgy *Pagrus pagrus* (Pisces, Sparidae) in captivity, Argentina. *Invest. Mar*, 31 (1): 5- 13
- Mangor-Jensen, A., Harboe, T., Hennø, J. S., Troland, R. (1998) Design and operation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., egg incubators. *Aquacult Res*, 29:887– 892
- Marinaro, J. (2009) Eggs and larvar in some species of the genus *Solea* (Pisces, Soleidae) of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. *Bolletino di zoologia*, 58: 163- 169



- McFarlane, G. A., Jensen, J. O. T., Andrews, W. T. & Groot, E. P. (1991). Egg and yolk sac larval development of the Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*). *International Pacific Halibut Commission Technical Report*, 24.
- Mehrbach, C., Culberson, C.H., Hawley, J.E., Pytkowicz, R.M., (1973) Measurements of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.* 18: 897-907
- Melzner, F., Göbel, S., Langenbuch, M., Gutowska, M. A., Pörtner, H., Lucassen, M. (2009) Swimming performance in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following long-term (4-12 months) acclimation to elevated seawater  $P_{CO_2}$ . *Aquatic Toxicology*, 92: 30-37
- Melzner, F., Thomsen, J., Koeve, W., Oschlies, A., Gutowska, M. A., Bange, H. W., Hansen, H. P., Körtzinger, A. (2013) Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology*, 160: 1875- 1888
- Metzger, R., Sartoris, F. J., Langenbuch, M., Pörtner, H. (2007) Influence of elevated  $CO_2$  concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer parugus*. *Journal of Thermal Biology*, 32: 144- 151
- Micale, V., Di Giancamillo, A., Domeneguini, C., Mylonas, C. C., Nomikos, N., Papadakis, I. E., Muglia, U. (2008) Ontogeny of the digestive tract in sharpnose sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Histology and Histopathology*, 23: 1077- 1091
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., Pörtner, H. (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 293: 109-118
- Michaelidis, B., Spring, A., Pörtner, H. (2007) Effects of long-term acclimation to environmental hypercapnia on extracellular acid-base status and metabolic capacity in Mediterranean fish *Sparus aurata*. *Marine Biology*, 150: 1417- 1429
- Mihelakakis, A., Yoshimatsu, T. Tsolkas, C. (2001) Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 199 (3-4): 333-352.
- Miller, G. M., Watson, S. A., Donelson, J. M., McCormick, M. I., Munday, P. L. (2012) Parental environment mediates impacts of increased carbon dioxide on a coral reef fish. *Nature Climate Change*, 2, 858–861.
- Moran, D. and Støttrup, J. G. (2011) The effect of carbon dioxide on growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquatic Toxicology*, 102: 24-30
- Morato, T., Afonso, P., Lourinho, P., et al. (2003) Reproductive biology and recruitment of white sea bream in the Azores. *Journal of Fish Biology*, 63 (1), 59-72.
- Morrison, C. M. (1993) Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas. Part four: eleutheroembryo and larva. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 119: 496

- Mouine, N., Francour, P., Ktari, M. H., Marzouk, N.C. (2007) The reproductive biology of *Diplodus sargus* in the Gulf of Tunis (central Mediterranean). *Scientia Marina* 71(3): 461-469
- Munday, P. L., Dixson, D. L., McCormick, M. L., Meekan, M., Ferrari, M. C. O., Chivers, D. P. (2010) Replenishment of fish populations is threatened by ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (29): 12930- 12934
- Munday, P. L., Donelson, J M., Dixson, D. L., Endo, G. G. K. (2009) Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proceedings of Royal Society*, 276: 3275-3283
- Munday, P. L., Gagliano, M., Donelson, J. M., Dixson, D. L., Thorrold, S. R. (2011) Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 423: 211- 221
- Munday, P. L., Jones, G. P., Pratchett, M. S., Williams, A. J. (2008) Climate change and the future for coral reef fishes. *Fish and Fisheries*, 9: 261- 285
- Munday, P. L. (2014) Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. F1000 Prime Reports: doi:10.12703/P6-99
- Mylonas, C. C., Mitrizakis, N., Papadaki, M., Sigelaki, I. (2013) Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity I. Description of the annual reproductive cycle. *Aquaculture*, 414- 415: 309- 317
- O'Connell, C.P., (1981) Development of organ systems in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleosts. *Am. Zool*, 21: 429– 446
- Ostaszewska, T. (2005) Developmental changes of digestive system structures in pikeperch (*Sander lucioperca* L). *Electronic Journal of Ichthyology*, 2: 65–78.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R. M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R. G., Plattner, G., Rodgers, K. B., Sabine, C. L., Sarmiento, J. L., Schlitzer, R., Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M., Yamanaka, Y., Yool, A. (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437: 681- 686
- Ortiz-Delgado, J. B., Darias, M. J., Cañavate, J. P., Yúfera, M., Sarasquete, C. (2003) Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*. Histological and histochemical approaches. *Histology and Histopathology*, 18: 1141- 1154
- Otsuka, M. (2003). Neuromast formation in the prehatching embryos of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Acta Zoologica*, 84: 99–106.

- Padrós, F., Villalta, M., Gisbert, E., Estévez, A. (2011) Morphological and histological study of larval development of the Senegal sole *Solea senegalensis*: an integrative study. *Journal of Fish Biology*, 79: 3-32
- Pankhurst, P. M. (2007). Mechanoreception. In *Fish Larval Physiology* (Finn, R. N. & Kapoor, B. G., eds), Enfield, NH: Science Publishers: 305–330
- Papadakis, I. E., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C. C. (2013) Ontogeny of the digestive system of meagre *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from Hatching to juvenile. *Aquaculture*, 388- 391: 76-88
- Parker, L. M., Ross, P. M., O'Connor, W. A. (2011) Populations of the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, vary in response to ocean acidification. *Marine Biology*, 158: 689–697.
- Pasquad S. (2006) Les relations trophiques: elements de structurations des Peuplements ichthyologiques en milieu estuarien. These Doctorale. Université de Bordeaux I.
- Pérez, L., Infante, C., Ponce, M., Crespo, A., Zuasti, E., Funes, V., Catanese, G., Manchado, M. (2008) Characterization of eight microsatellite markers in the white sea bream, *Diplodus sargus* (Teleostei, Sparidae). *Molecular Ecology Resources* 8: 1291-1293
- Pimentel, M. S., Faleiro, F., Dionísio, G., Repolho, T., Pousão-Ferreira, P., Machado, J., Rosa, R. (2014) Defective skeletogenesis and oversized otoliths on fish early stages in a changing ocean. *The Journal of Experimental Biology*, 217: 2062- 2070
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortíz-Galindo, J.L. (2003) Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633–644.
- Pistevos, J. C. A., Calosi, P., Widdicombe, S., Bishop, J. D. D. (2011) Will variation among genetic individuals influence species responses to global climate change? *Oikos*, 120 (5): 675– 689
- Pittman, K., Yúfera, M., Pavlidis, M., Geffen, A. J., Koven, W., Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Tandler, A. (2013) Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Reviews in Aquaculture*, 5 (1): 224- 267
- Poli, B. M., Parisi, G., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P. and Bonelli, A. (2003) Preliminary results on quality and quality changes in reared in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillets traits and freshness changes in refrigerated comercial-size fish. *Aquaculture International*, 11 (3): 301- 311
- Pope, E. C., Ellis, R. P., Sclamacchia, M., Scolding, J. W. S., Keay, A., Chingombe, P., Shields, R. J., Wilcox, R., Speirs, D. C., Wilson, R. W., Lewis, C., Flynn, K. J. (2014) European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, in a change ocean. *Biogeosciences*, 11: 2519-2530

- Popper, A. N., Ramcharitar, J., Campana, E. (2005) Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Marine and Freshwater Research*, 56: 497-504
- Pörtner H., Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO<sub>2</sub> concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, 60: 705–718
- Pörtner, H. (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series*, 373: 203-217
- Pörtner, H. (2009) Oxygen and capacity limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 881- 893
- Pörtner, H. & Farrell, A. P. (2008) Physiology and Climate Change. *Science*, 322: 690-691
- Pousão-Ferreira, P., Ribeiro, L., Soares, F., Nicolau, L., Mendes, A. C., Castanho, S., Barata, M., Dâmaso-Rodrigues, L., Cabrita, E., Dinis, M. T. (2010) Adaptation to captivity and spawning induction of meagre (*Argyrosomus regius*) at IPIMAR aquaculture research station. *Aquaculture Europe* 10, Porto, Portugal.
- Pousão-Ferreira, P., Dores, E., Amaral, J. (1997) White sea bream (*Diplodus sargus*) juvenile production: perspectives for commercial aquaculture. Int. Conf. Martinique 97 – Island Aquaculture (Crewell, L. & Harache, Y. eds): 241-242.
- Quémérer, I (2002) La maigre commun, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). In: Infremer ed. Biologie, peche, marche et potential aquacole. Plouzane, France: 31
- Quéro, J.C. and Vayne, J.J. (1987) Le maigre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne et des eaux plus septentrionales. *Revue des Travaux de l'Office des Peches Maritimes*, 49 (1-2): 35-66.
- Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P. S., Riebesell, U., Shepherd, J., Turley, C., and Watson, A. J. (2005) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide, Policy Document 12/05, London: The Royal Society, 60
- Reum, J. C. P., Alin, S. R., Feely, R. A., Newton, J., Warner, M., McElhany, P. (2014) Seasonal carbonate chemistry covariation with temperature, oxygen and salinity in a fjord estuary: Implications for the design of ocean acidification experiments. *Plos ONE*, 9 (2): 1- 12
- Réveillac, E., Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyssié, J., Jeffree, R., Gattuso, J., Martin, S. (2015) Ocean acidification reshapes the otolith-body allometry of growth in juvenile sea bream. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463: 87-94

- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Dinis, M. T. (2002) Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed Artemia and a compound diet. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27 (1-2): 61-69.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Dinis, M.T. (1999). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179: 465- 473.
- Ries, J. B., Cohen, A. L., McCorkle, C. (2015) Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO<sub>2</sub>- induced ocean acidification. *Geological Society of America*, 37 (12) : 1131- 1134
- Rombough, P. J. (2004). Gas exchange, ionoregulation, and the functional development of the teleost gill. *American Fisheries Society Symposium*, 40: 47–83.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Øystein, S., Boglione, C. (2013) Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Aquaculture*, 5: 59-98
- Roo, F.J., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Caballero, M.J., Hernández-Cruz, C.M., Fernández, A., Fernández- Palacios, H. (1999) Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture*, 179: 499– 512
- Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. (2008) Dietary protein requerimento of while sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 14: 309–317
- Santamaría, C. A., Marín de Mateo, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C., Crespo, S. (2004) Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 237: 207- 228
- Sarasquete, C., Polo, A., Yúfera, M., (1995) Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130: 79–92.
- Simpson, S. D., Munday, P. L., Wittenrich, M. L., Manassa, R., Dixson, S. L., Gagliana, M., Yan, H. Y. (2014) Ocean acidification erodes crucial auditory behaviour in a marine fish. *Biology Letters*, 7: 917-920
- Solomon, S. D., Qin, M., Manning, Z., Chen, M., Marquis, K.B., Averyt, M., and Miller, H.L. (2014) IPCC, Climate Change 2014: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M., Dupont, S. T. (2011) CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 160: 331–340.

- Thomsen, J., Gutowska, M. A., Saphörster, J., Heinemann, A., Trübenbach, K., Fietzke, J., Hiebenthal, C., Eisenhauer, A., Körtzinger, A., Wahl, M., Melzner, F. (2010) Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO<sub>2</sub>-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences*, 7: 3879–3891
- Tim, L. L. (2005) Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Caderno La Salle XI*, 2 (1): 231- 239
- Valente, L. M. P., Moutou, K. A., Conceição, L. E. C., Engrola, S., Fernandes, J. M. O., Johnston, I. A. (2013) What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? *Reviews in Aquaculture* (in press).
- Vaquer-Sunyer, R. and Duarte, C. M. (2008) Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (40): 15451- 15457
- Vinagre, C., Cabral, H.N. & Costa, M.J. (2010) Relative importance of estuarine nurseries for species of the genus *Diplodus* (Sparidae) along the Portuguese coast. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 86 (2), 197-202.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J. B., Moyano, F. J. (2004) Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology*, 144: 863- 869
- Waldbusser, G. G. & Salisbury, J. E. (2014) Ocean acidification in the coastal zone from an organism's perspective: Multiple system parameters, frequency domains, and habitats. *The Annual Review of Marine Science*, 6: 221- 247
- Wallis, W. & Tytler, P. (1996) Changes in chloride cell distribution during early larval stages of *Clupea harengus*. *Journal Fish Biology*, 49: 801– 814.
- Wang, J., Ziheng, L., Chen, Y., Yang, Z. (2015) The combined effect of temperature and pH on embryonic development of obscure puffer *Takifugu obscurus* and its ecological implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58: 1-6
- Watson, W. (1982) Development of eggs and larvae of the white croaker, *Genyonemus lineatus* ayres (Pisces: Sciaenidae), of the Southern California coast. *Fishery Bulletin*, 80 (3): 1-15
- Wood, H. L., Spicer, J. I., and Widdicombe, S. (2008) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost, *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci*, 275: 1767–1773
- Wood, H. L., Spicer, J. I., Widdicombe, S. (2014) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 1767-1773
- Wunderink, Y. S., Engels, S., Halm, S., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., Flik, G., Klaren, P.H.H., Mancera, J. M. 2011. Chronic and acute stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The involvement of cortisol, CRH and CRH-BP. *General and comparative endocrinology*, 171 (2), 203-210.

- Zaiss, M.M., Papadakis, I.E., Maingot, E., Divanach, P., Mylonas, C.C. (2006) Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. *Aquaculture*, 260: 357–368
- Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130: 477–487
- Zambonino-Infante, J. L., Gibert, E., Sarasquete, S., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C. L. (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J. E. P., Bureau, D., Kapoor, B. G. (eds) *Feeding and Digestive Functions in Fishes*, pp. 281- 348. Science Publishers, Enfiels, NH.
- Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis*, Prentice-Hall/Pearson.

## ANEXOS

### Anexo I- Protocolo de Histologia (Resina)

#### a) Fixação

As dimensões do material a ser fixado foi entre 1-3mm, para que o fixador penetrasse de forma eficaz. As amostras foram fixadas durante 3 horas no fixador, composto por paraformaldeído tamponado a 10%, glutaraldeído, tampão cacodilato a 0,2M e água destilada. Após este período, fizeram-se 3 lavagens, com um intervalo de 1 hora, com tampão cacodilato a 0,1 M e por fim armazenaram-se as larvas em álcool a 70%, até posterior análise.

#### b) Desidratação

Utilizou-se uma gradação crescente de álcoois. As fases de desidratação foram realizadas à temperatura ambiente. Todas as alterações de álcool foram feitas com cuidado para evitar a exposição ao ar livre e minimizar a penetração de ar nas amostras.

Assim, fez-se banhos de álcool, durante 2 horas com álcool a 85% e mais 2 horas com álcool a 100%, em cada amostra.

#### c) Inclusão

##### c. 1) Preparação das Soluções

Durante o processo de inclusão foram utilizadas duas soluções (A e B) preparadas a partir do Kit Technovit 7100 adquirido comercialmente.

##### ○ Solução A- Solução de Infiltração:

Dissolveu-se 1g do endurecedor I (1 pacote) em 100mL do líquido base Technovit e agitou-se com um agitador magnético na *hotte*, até se dissolver completamente. Envolveu-se a garrafa com folha de alumínio e armazenou-se a 4°C.

##### ○ Solução B- Solução de Polimerização

Misturou-se 15 mL de solução de infiltração com 1 mL do endurecedor II, com a ajuda de uma vareta de vidro. Esta solução foi usada para a inclusão propriamente dita e deve ser feita no momento de usar e colocada no gelo; caso contrário, polimeriza em cerca de 10min.



#### c.2) Pré-Infiltração

Após as 4 horas de desidratação, e depois da solução de infiltração estar preparada, retirou-se o álcool das amostras e colocou-se as amostras numa proporção de 1:1 de álcool a 100% e solução de infiltração, durante 2 horas.

#### c. 3) Infiltração

Após 2 horas, retirou-se a solução de pré-infiltração dos frascos, e embebeu-se as amostras em solução de infiltração durante 20H.

#### c. 4) Polimerização

Despejou-se um pouco da solução de polimerização nos moldes da *cuvette* e incluiu-se as amostras no interior da *cuvette* na posição desejada com o auxílio de agulhas. Depois encheu-se os moldes com a solução de polimerização até acima e colocou-se um pedaço de plástico transparente na superfície. Este procedimento serve para que a polimerização ocorra de forma homogénea em todo o bloco, pois se a superfície ficar em contacto com o ar demora mais a polimerizar.

Deixou-se polimerizar à temperatura ambiente, durante 48 horas. Depois de polimerizar, retirou-se os blocos da forma.

#### d) Seccionamento das amostras

Os blocos obtidos foram colados a suportes de madeira (4x 2,8x 0,5cm) com a cola Historesin Mounting Media (LEICA).

Ligou-se o aparelho e o estabilizador de voltagem. Apertou-se o botão TRIM e ajustou-se a micragem para 2 $\mu$ m para trimar o bloco.

Colocou-se o bloco no suporte e ajustou-se a sua posição com a ajuda dos botões laterais após destravá-los, girando a trava em forma de L que fica em cima à esquerda.

Colocou-se a lâmina e travou-se com a alavanca da direita no próprio suporte de lâmina. Verificou-se se o carrinho da lâmina estava travado (botão na frente do aparelho) e confirmou-se a medida desejada para o corte (botão preto à direita do aparelho em cima). Seguidamente, os blocos de resina foram desbastados e cortados num micrótomo Microm Leitz® HM340E, com uma espessura de 2  $\mu$ m.

#### e) Recolha dos Cortes

Os cortes obtidos a partir do micrótomo foram transferidos para um banho-maria circular, Electrothermal® a uma temperatura próxima dos 37°C, com o auxílio de pinça e agulha, com o objetivo de esticar os cortes e melhorar a aderência à lâmina de microscopia. Nesta etapa, foram retiradas as dobras e evitadas as bolhas. Após, a distensão, os cortes foram separados individualmente ou em grupos, conforme a conveniência, utilizando lâminas de vidro previamente limpas e secas.

As lâminas foram secas à temperatura ambiente, durante 24 horas, até ao momento da coloração.

#### f) Coloração Hematoxilina-Eosina

##### f. 1) Preparação das Soluções

Para a **Solução de Hematoxilina** fez- 2 soluções: Solução A e Solução B. Para a solução A misturou-se 100 ml de álcool etílico (absoluto) com 2 g de hematoxilina. Para a solução B, misturou-se 100 ml de água destilada, 100 ml de glicerol, 10 ml de ácido acético e 3 g de sulfato alumino-potássico. Misturaram-se as duas soluções (A+B), sendo depois deixadas a reagir à luz solar directa durante algumas semanas (cerca de 3 meses). É no entanto possível envelhecer artificialmente esta solução através da adição de 0.2 g de iodato de potássio por cada grama de hematoxilina na solução original. Os prazos de validade do corante devem ser verificados, sendo utilizado um filtro sempre que necessário.

Para a **Solução de Eosina** (1%) misturou-se 100 ml de água destilada com 1 g de eosina solúvel. Os prazos de validade do corante devem ser verificados, sendo utilizado um filtro sempre que necessário.

##### f. 2) Procedimento para Coloração

Para a coloração dos cortes, mergulhou-se as lâminas com os respetivos cortes nas soluções e nos tempos indicados na tabela.

Tabela XI– Coloração de cortes de resina com Hematoxilina-Eosina

<b>Lavagens</b>	<b>Tempos</b>
Solução Hematoxilina	7 min
Água da Torneira	3 min
Água ácida (120 mM HCl)	5 seg
Água da Torneira	1 min
Eosina	3 min
Água da Torneira	5 min

Por fim, secou-se a lâmina numa estufa e deixou-se arrefecer.

g) Montagem Final da Lâmina

Este processo consistiu em depositar uma gota de DPX (meio de montagem) sobre o corte que estava aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamela. Nesta etapa deve-se evitar as bolhas de ar que se forma na resina durante a colocação da lamela. Finalmente a lâmina foi catalogada. Após a secagem das lâminas (aproximadamente 24h) procedeu-se à análise microscópica dos tecidos, tendo também sido tiradas fotografias às mesmas.

**Anexo II-** Análise descritiva (média ± desvio-padrão, *p-value*) com os diferentes parâmetros avaliados nas espécies em estudo. As diferentes letras indicam a existência de diferenças significativas entre tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Variáveis	<i>Solea senegalensis</i>				<i>Diplodus sargus</i>				<i>Argyrosomus regius</i>			
	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento	pH 8,0	pH 7,8	pH 7,6	Tratamento
	Média ± Desvio-padrão			<i>p-value</i>	Média ± Desvio-padrão			<i>p-value</i>	Média ± Desvio-padrão			<i>p-value</i>
<b>Taxa Ecloração (%)</b>	83,00 ± 1,41	76,00 ± 0,00	76,00 ± 2,83	-----	83,00 ± 9,89	78,00 ± 11,31	65,00 ± 1,41	-----	63,00 ± 12,73	89,00 ± 12,72	65,00 ± 1,41	-----
<b>Taxa Sobrevivência (%)</b>	74,00 ± 33,75	72,75 ± 14,24	82,25 ± 4,43	0,80	39,50 ± 20,95	30,75 ± 21,73	38,75 ± 20,81	0,81	44,50 ± 13,82	38,75 ± 21,61	44,75 ± 27,90	0,91
<b>Taxa Crescimento (%)</b>	13,20 ± 2,29 <sup>a</sup>	11,47 ± 2,33 <sup>b</sup>	12,21 ± 3,26 <sup>ab</sup>	<b>0,00</b>	5,43 ± 2,80 <sup>a</sup>	3,90 ± 2,88 <sup>b</sup>	3,84 ± 4,01 <sup>b</sup>	<b>0,01</b>	6,37 ± 4,67 <sup>b</sup>	10,44 ± 4,67 <sup>a</sup>	5,11 ± 3,73 <sup>b</sup>	<b>0,02</b>
<b>Diâmetro Ovos 12h (mm)</b>	1,00 ± 0,03	1,01 ± 0,02	1,01 ± 0,03	0,33	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,18	1,29 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,31 ± 0,04 <sup>c</sup>	<b>0,00</b>
<b>Diâmetro Ovos 24 (mm)</b>	-----	-----	-----	-----	0,98 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,99 ± 0,02	0,14	-----	-----	-----	-----
<b>Peso Seco (µg)</b>	51,47 ± 12,01	56,53 ± 20,58	62,50 ± 21,99	0,72	59,70 ± 12,08	64,00 ± 28,61	49,25 ± 20,89	0,60	59,72 ± 11,79	62,05 ± 5,74	73,35 ± 15,42	0,26

