

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA CAROLINA TESKE

**AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES DIETAS NA PRODUÇÃO DE OVOS DO
COPEPODE *Acartia tonsa* (Dana 1849)**

PONTAL DO PARANÁ

2013

JÉSSICA CAROLINA TESKE

**AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES DIETAS NA PRODUÇÃO DE OVOS DO
COPÉPODE *Acartia tonsa* (Dana 1849)**

Monografia apresentada à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial à conclusão do curso superior de Tecnologia em Aquicultura, Setor de Ciências da Terra, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho

PONTAL DO PARANÁ

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

JÉSSICA CAROLINA TESKE

AVALIAÇÃO DO USO DE DIFERENTES DIETAS NA PRODUÇÃO DE OVOS DO COPÉPODE *Acartia tonsa* (Dana 1849)

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau superior no curso de Tecnologia em Aquicultura, Setor de Ciências da Terra, Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho
Setor de Ciências da Terra/ CEM, UFPR

Prof^a.Dr.^a Erica Alves Gonzales Vidal
Setor de Ciências da Terra/ CEM, UFPR

Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Júnior
Setor de Ciências da Terra/ CEM, UFPR

Pontal do Sul, ____ de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho à força maior que faz com que nossos olhos brilhem a cada manhã ao ver as belezas deste mundo e faz da ciência uma forma de progresso para a humanidade, a minha família que com seu mais sincero amor e carinho me deram e dão todo o apoio nesta jornada de aprendizado que é a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que por alguns minutos ou mesmo anos compartilharam aquilo que sabem comigo e que de alguma forma me ajudaram a realizar este trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. José Guilherme Bersano Filho pela orientação, paciência, auxílio e toda a ajuda ofertada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Mafra Jr. pelo auxílio durante o trabalho e também por disponibilizar seu laboratório para a produção das microalgas.

A Prof^a. Dra. Hedda Elizabeth Kolm por abrir as portas do seu laboratório e ceder os materiais que foram essenciais e de grande ajuda para a realização deste trabalho.

A todos os Professores do curso de Aquicultura do CEM que se dedicaram e se esforçaram para tornar o curso cada vez melhor, contribuindo para a minha formação.

A todos meus colegas do GRR2009, turma pioneira de Aquicultura, pelo companheirismo durante esses anos.

A todos que me ajudaram em coletas, análises estatísticas, e passaram para mim o seu conhecimento e sua ajuda.

As minhas companheiras do laboratório de Zooplâncton, pela ajuda em meio a lupas, coletas, bichos vivos ou bichos mortos. As companheiras do laboratório de microbiologia que me ajudaram em vários momentos, nem que fosse só para tomar um cafezinho ou papear.

A todos meus amigos que de perto ou mesmo de longe me proporcionaram sorrisos sinceros, momentos agradáveis, dedicando um tempinho da sua vida para tornar a minha vida mais doce e divertida.

E agradeço principalmente a minha família por tudo, Pai, Mãe, Leno e Fabi vocês são extremamente especiais para mim, sem vocês nada disso seria possível,

agradeço por todo apoio, compreensão, paciência, amor, dedicação, risada, carinho, proteção, amizade, alegria, união, cuidado, aprendizado, por zelarem e acreditarem em mim, me ajudando a evoluir como pessoa, por batalharem cada dia para tornar todos os dias sempre melhores. Amo muitíssimo vocês!

E para finalizar agradeço ao Universo por me proporcionar tudo que tenho, as pessoas que conheci, os irmãos sensacionais que a vida me deu, os momentos que vivi, o que aprendi e o que irei aprender, as experiências trocadas, oportunidades, aos sentimentos e carinho que todos me proporcionaram.

Grata a todos e tudo!

E nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro.

Albert Einstein

RESUMO

A utilização de alimentos vivos alternativos a rotíferos e artêmias para o uso na aquicultura, vem crescendo em anos recentes. Entre eles os copépodes têm se mostrando bastante efetivos em algumas larviculturas de peixes marinhos, devido ao tamanho adequado e elevado valor nutricional. No entanto, os métodos de cultivo existentes ainda necessitam ser aprimorados e novas alternativas alimentares para maximizar a produção dos copépodes vêm sendo estudadas, pois os custos elevados e problemas de interrupção na produção de microalgas acabam impossibilitando o fornecimento contínuo deste organismo alimento. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso de diferentes dietas, entre elas dietas de biomassa de microalga congelada e alimento comercial, na produção de ovos e na taxa de ingestão do copépode Calanoida *Acartia tonsa*. A fim de testar a influência das diferentes dietas, indivíduos de *A. tonsa* foram submetidos a cinco dietas diferentes: uma composta por *Thalassiosira weissflogii* in natura na concentração de $2 \cdot 10^4$ cél.mL⁻¹; outra com *T. weissflogii* sob a forma de biomassa congelada e outros três tratamentos com concentrações diferentes do alimento comercial Reef PhytoplanktonTM. As unidades experimentais foram conduzidas em béqueres de 300 mL, com 14 copépodes adultos (10 fêmeas/4 machos), em salinidade de 20 ups, temperatura de $20 \pm 1^\circ$ C e fotoperíodo natural de 14 h claro: 10 h escuro. Após 24 h de experimento o material dos béqueres foi retido em malha de 20 μ m, o número de organismos mortos foi computado e, alguns ovos foram separados e incubados por outras 24 h para avaliar o sucesso de eclosão. O restante do material dos béqueres foi fixado em solução de formaldeído 4% para posterior contagem de ovos e pelotas fecais. Após as contagens sob microscópio estereoscópico verificou-se que a produção de ovos, pelotas fecais e sobrevivência apresentaram diferenças significativas (ANOVA, $p < 0,05$) conforme as dietas fornecidas, sendo que a dieta de *T. weissflogii* in natura apresentou a maior produção de ovos (25 ± 4 ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹) e de pelotas fecais (93 ± 16 pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹), enquanto o alimento comercial obteve os menores valores médios $3 \pm 0,3$ ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ e $13 \pm 0,5$ pelotas.copépode⁻¹.dia⁻¹, sendo considerado inadequado para o cultivo de *A. tonsa*. Os maiores percentuais de sobrevivência foram de 100% e 93%, encontrados nas dietas com alimento comercial na concentração de 50 e 75 μ L L⁻¹ e o menor valor foi de 76% na dieta com biomassa congelada de *T. weissflogii*. Embora a dieta da biomassa congelada de *T. weissflogii* tenham proporcionado uma produção de ovos em torno de 3 vezes menor do que *T. weissflogii* in natura, os resultados apontam para o grande potencial desta dieta na manutenção de cultivos de *A. tonsa*, sobretudo em momentos de quebra de produção de microalgas. Estudos futuros deverão investigar métodos mais eficientes de aeração ou circulação que permitam que as partículas alimentares inertes fiquem por mais tempo em suspensão no meio de cultivo. A avaliação mais detalhada da composição bioquímica de dietas compostas por microalgas congeladas, principalmente dos ácidos graxos essenciais, também deverá ser considerada.

Palavras-chave:, Produção de copépodes, Alimento Inerte, Produção de ovos.

ABSTRACT

The use of alternative food organisms to rotifers and brine shrimp in aquaculture has been growing in recent years. Among them, copepods have shown to be very effective in some marine finfish hatcheries due their to proper size and high nutritional value. However, existing methods of cultivation still need to be improved and new food alternatives to maximize copepods production have been studied, since the high costs and problems of interruption in microalgae production can slow down the continuous cultivation and supply of live copepods. This study aims to evaluate the use of different diets, including inert diets, on the egg production and fecal pellets of the Calanoid copepod *Acartia tonsa*. In order to test the influence of different diets, individuals of *A. tonsa* were fed five different diets: a live culture of *Thalassiosira weissflogii* ($2 \cdot 10^4$ cél.mL⁻¹); frozen *T. weissflogii* and, other three treatments consisting of different concentrations of the commercial food solution Reef Phytoplankton™. The experiments were carried out in 300 mL beakers filled with seawater (salinity= 20, temperature = 20 ± 1 ° C) containing 14 adult copepods (10 females / 4 males) under a natural photoperiod of 14 hours light: 10 hours dark. After 24 hours the beakers material was collected in a 20 um sieve in order to allow the counting of dead organisms and the sorting of some eggs that were separated and incubated for additional 24 hours, aiming to assess the eggs hatching success. The fecal pellets, eggs and copepods was preserved in a 4% formaldehyde solution for latter counting of eggs and fecal pellets under a stereoscope microscope. The results showed statistical differences (ANOVA, $p < 0.05$) among the diets provided. The live *T. weissflogii* diet resulted in the highest production of eggs (25 ± 4 eggs. female⁻¹. day⁻¹) and fecal pellets as well (93 ± 16 pellets. copepod⁻¹. day⁻¹), while the commercial food resulted in 3 ± 0.3 eggs. female⁻¹. day⁻¹ in average, with 13 ± 0.5 pellets.copepod⁻¹.day⁻¹, being considered inadequate for the cultivation of *A.tonsa*. The highest percentages of survival were 100% and 93%, found in commercial food in concentrations of 50 and 75 $\mu\text{L L}^{-1}$ and the lowest was 76% in the frozen *T. weissflogii* biomass. Although the frozen *T. weissflogii* biomass diet has provided an egg production about 3 times lower than the live *T. weissflogii* diet, the results pointed out the great potential of this diet for maintaining *A. tonsa* cultures, especially in occasional events of breakage in the microalgae production. Future studies should investigate new methods of aeration and/or circulation that would allow food particles to stay longer periods in suspension. Evaluation of the biochemical composition of frozen microalgae diets, the fatty acids composition also considered.

Keywords:, Copepods culture, Inert feed, Egg production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Fêmea do copépode *Acartia tonsa*: Vista ventral (A) e vista lateral (B). 10
- FIGURA 2 - Células da microalga *Thalassiosira weissflogii* utilizada nas unidades experimentais. 12
- FIGURA 3 - Células das microalgas do produto comercial Reef Phytoplankton™ utilizada nas unidades experimentais. 13
- FIGURA 4 - Representação esquemática do experimento para obter a produção de ovos, produção de pelotas fecais e sucesso de eclosão. (A) Manutenção do copépode *Acartia tonsa* em laboratório, (B) Separação dos copépodes e preparação das unidades experimentais, (C) Copépodes em inanição pelo período de 10 h, (D) Distribuição das dietas nos tratamentos e realização do experimento pelo período de 24 h, (E) Separação dos ovos, contagem dos copépodes vivos e fixação do material em formaldeído 4%, (F) Incubação dos ovos e obtenção da taxa de sucesso de eclosão dos ovos. 16
- FIGURA 5 - Valores médios e desvio padrão da produção de ovos dada em nº. ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas (p< 0,05)..... 17
- FIGURA 6 - Sucesso de eclosão dos ovos de *Acartia tonsa* nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas (p< 0,05). 18
- FIGURA 7 - Formato e tamanho dos ovos dos copépodes nas diferentes dietas testadas: células vivas de *Thalassiosira weissflogii* (A); biomassa congelada de *T. weissflogii* (B); Alimento comercial Reef Phytoplankton™ a 25 µL L⁻¹ (C); 50 µL L⁻¹ (D) e a 75 µL L⁻¹ (E)..... 18
- FIGURA 8 - Valores médios e desvio padrão da produção de pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹ nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas (p< 0,05)..... 19
- FIGURA 9 - Formato e tamanho das pelotas fecais dos copépodes nas diferentes dietas testadas: células vivas de *Thalassiosira weissflogii* (A); biomassa congelada de *T. weissflogii* (B); Alimento comercial Reef Phytoplankton™ a 25 µL L⁻¹ (C); 50 µL L⁻¹ (D) e a 75 µL L⁻¹ (E)..... 20
- FIGURA 10 - Valores percentuais da sobrevivência dos copépodes ao final do experimento nas diferentes dietas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas (p< 0,05)..... 21

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AA - Ácido Araquidônico

cél.mL⁻¹ - Quantidade de células por mililitros

CEM - Centro de Estudos do Mar

DHA - Ácido Docosahexanóico

EPA - Ácido Eicosapentaenóico

h - Horas

HUFA - Ácido graxo altamente insaturado

ind L⁻¹ - Indivíduos por litro

L- Litros

m- Metros

mL – Mililitros

mm - Milímetros

ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ - Produção de ovos por fêmea por dia

pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹ - Produção de pelotas fecais por copépodes por dia

ups - Unidade Padrão de Salinidade

μE.m⁻².s⁻¹ - Microeinstein por metro quadrado por segundo

μg C.L⁻¹ - Microgramas de carbono por litro

μL - Microlitro

μm - Micrômetros

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Local e período de estudo.....	10
3.2 Obtenção e cultivo dos copépodes	10
3.3 Cultivo de fitoplâncton	11
3.3.1 Biomassa de microalga congelada	11
3.4 Alimento Comercial	12
3.5 Protocolo Experimental	13
3.6 Unidades experimentais e coletas de dados.....	14
3.7 Análises Estatísticas	15
4. RESULTADOS	17
4.1 Produção de ovos	17
4.2 Produção de Pelotas Fecais	19
4.3 Sobrevivência.....	20
5. DISCUSSÃO.....	22
5.1 Produção e sucesso de eclosão dos ovos	22
5.2 Produção de pelotas fecais	26
5.3 Sobrevivência.....	27
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura consiste na criação e desenvolvimento de organismos aquáticos, como plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo uma atividade muito diversificada, que abrange uma vasta gama de espécies, sistemas e práticas. O cultivo implica na intervenção do homem no processo de criação para aumentar a produção por meio da melhoria de funções como a reprodução e alimentação (FAO, 1997).

A exploração indiscriminada dos estoques pesqueiros naturais levou a uma crise do setor da pesca, tornando a aquicultura uma alternativa importantíssima para regularizar a oferta de alimento de alto valor proteico, proveniente tanto do cultivo continental como marinho, o que torna esta atividade um mercado em franca expansão (CAMARGO *et al.*, 2005). Em 2010, a aquicultura foi responsável por produzir 59,9 milhões de toneladas de alimentos de origem aquática (peixes, crustáceos, moluscos, répteis, e plantas aquáticas) consumidos por humanos e, esta demanda tende a aumentar no futuro (FAO, 2012). No entanto, o sucesso da aquicultura depende do desenvolvimento de alimentos que atendam todas as exigências nutricionais das espécies cultivadas e que apresentem viabilidade técnica e comercial para produção em larga escala (BLANCO e TACON, 1989).

Pode-se considerar que os maiores problemas para o cultivo de animais marinhos em nível comercial são a disponibilidade e qualidade de alimento, bem como o custo de produção desse alimento (ARANA, 2004). Uma vez que o mesmo deve ter um conteúdo nutricional adequado, possuindo características como forma, tamanho e textura que sejam atrativas para as espécies cultivadas, para que os organismos apresentem um crescimento ótimo, principalmente nas fases iniciais do ciclo de vida (LAVENS e SORGELOOS, 1996).

De acordo com Sargent *et al.* (1997) e Prieto *et al.* (2008), um dos pontos críticos no ciclo de produção de peixes, é sem dúvida a fase larval, que requer alimentos externos apropriados tanto em quantidade como em qualidade. Por isso o cultivo de fitoplâncton e zooplâncton deve ser realizado para garantir um

fornecimento confiável e contínuo de alimento durante a larvicultura (KOLKOVSKI, 2001; PAYNE e RIPPINGALE, 2001).

As larvas de peixes marinhos são geralmente alimentadas com zooplâncton vivo para assegurar um suprimento adequado de proteínas, lipídios e carboidratos, com ênfase em aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (HAMRE *et al.*, 2005). A maioria das espécies de peixes comerciais produzem ovos planctônicos relativamente pequenos, os quais possuem reservas vitelinas escassas, e quando as larvas recém eclodidas iniciam a alimentação exógena apresentam o trato digestivo ainda incipiente (STØTTRUP, 2000; KOLKOVSKI, 2001). Esta fase é crítica, pois a larva deve ser capaz de capturar, ingerir e assimilar o alimento. Desta forma, esta etapa requer um desenvolvimento de uma dieta especial, com partículas pequenas, de textura suave, facilmente digeríveis e com alto valor nutritivo (STØTTRUP, 2000).

As larvas de peixes marinhos necessitam de altos níveis de ácidos graxos altamente insaturados da família ômega três (HUFA n-3). Entre estes, o ácido docosahexanóico (DHA) 22:6(n-3) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) 20:5(n-3) são considerados essenciais (SARGENT *et al.*, 1993,1997). Estes ácidos graxos possuem um papel importante tanto na função como na estrutura das membranas celulares. Por esta razão, existe um requerimento essencial de DHA e EPA que deve ser suprido através da alimentação. Além do DHA e EPA, outro ácido graxo essencial é o ácido araquidônico (AA) 20:4(n-6), que é o principal precursor das prostaglandinas e dos leucotrienos, substâncias importantes para a resposta fisiológica ao estresse, aos processos de coagulação e anti-inflamatórios (SARGENT *et al.*, 1997). Alguns estudos têm indicado que não só o conteúdo total de HUFA, e o conteúdo individual dos ácidos graxos DHA, EPA e AA são importantes, mas sim, um balanço adequado das proporções de EPA/DHA e EPA/AA (IZQUIERDO, 1996; SARGENT *et al.*, 1999b).

A disponibilidade de alevinos em quantidade e de boa qualidade é considerada um fator crítico para o êxito da produção intensiva de peixes marinhos, na qual a alimentação e a nutrição são consideradas como os principais fatores responsáveis pelos frequentes desacertos na larvicultura (PRIETO *et al.*, 2008). Por isso, a produção larval de peixes marinhos é considerada o gargalo tecnológico que

impede a expansão e desenvolvimento da piscicultura marinha (SARGENT *et al.*, 1993).

Nas atividades de larvicultura de peixes marinhos aproximadamente 80% dos organismos zooplanctônicos utilizados para alimentação são de origem marinha. Atualmente o microcrustáceo do gênero *Artemia* sp. e o rotífero *Brachionus* spp. são os alimentos vivos mais utilizados na aquicultura (EVJEMO *et al.*, 1997; SARGENT *et al.*, 1997, 1999a; STØTTRUP, 2000). A razão para o relativo sucesso no uso da *Artemia* sp., está na praticidade e conveniência na sua obtenção, visto que os mesmos produzem embriões dormentes, popularmente chamados de cistos, os quais são facilmente obtidos e armazenados a seco em grandes quantidades para comercialização (DUERR *et al.*, 1998). Porém, tanto as artêmias quanto os rotíferos possuem baixos níveis de HUFA, sendo necessário o suplemento com emulsificantes ricos em ácidos graxos para garantir o desenvolvimento das larvas durante a metamorfose (SARGENT *et al.*, 1997,1999a). Ainda assim, mesmo enriquecidos, estes organismos não fornecem todos os nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência das larvas de algumas espécies (SORGELLOOS *et al.*, 2001).

Desta forma, alternativas de alimentos vivos vêm sendo desenvolvidas, sendo que cerca de 25 espécies de organismos zooplanctônicos como copépodes, misidáceos e eufausiáceos têm sido explorados comercialmente em pequena escala. Alguns países utilizam o zooplâncton selvagem na aquicultura industrial, como a Noruega (capturas entre 20 a 50 toneladas por ano), o Canadá e o Japão (DELBARE *et al.*, 1996).

Os copépodes são um recurso potencial de proteína, mas a sua exploração baseada na captura comercial é difícil, pois depende da sazonalidade ambiental e demanda um alto custo econômico (EVJEMO *et al.*, 1997; MAUCLINE, 1998; STØTTRUP, 2000). Além disso, copépodes oriundos da natureza podem em alguns casos contaminar os cultivos intensivos de peixes com parasitas, bactérias e vírus (STØTTRUP, 2000).

De acordo com Støttrup (2000) e Payne *et al.* (2001) a inclusão de copépodes na indústria da aquicultura poderá reduzir a mortalidade das larvas e aumentar a qualidade e o número de espécies de peixes cultivados. Em função disso, o interesse no desenvolvimento de técnicas de cultivo massivo de copépodes para o uso na larvicultura de peixes marinhos vem aumentando gradativamente, tanto em forma isolada como em conjunto com outros tipos de alimentos vivos (DRILLET *et al.*, 2011).

Os copépodes são pequenos crustáceos marinhos, geralmente com 0,2 -12 mm de comprimento. São os produtores secundários mais importantes do ambiente marinho, pois constituem um elo fundamental da cadeia trófica pelágica, fazendo ligação entre o fitoplâncton e os níveis tróficos superiores (HUYS e BOXHALL, 1991; MAUCLINE 1998; BOLTOVSKOY, 1999). Devido a sua importância na cadeia trófica marinha, diversos estudos sobre a fisiologia e as propriedades bioquímicas dos copépodes vêm sendo realizados, e.g Björnberg, 1981.

O uso de copépodes como alimento vivo apresenta várias vantagens, pois é um alimento altamente nutritivo, possuindo um perfil nutricional que corresponde melhor às exigências requeridas pelas larvas de peixes em relação aos alimentos vivos comumente utilizados (WATANABE *et al.*, 1983). Também proporcionam maior nível de fosfolipídios na sua composição em relação aos triglicerídeos; altas concentrações de 22:6(n-3), 20:5(n-3): 20:4(n-6) e ótimos níveis de antioxidantes naturais (SARGENT *et al.*,1997). Além das qualidades nutricionais, os copépodes possuem níveis elevados de enzimas digestivas, podem ser oferecidos sob diferentes formas e tamanhos, além de possuírem um movimento natatório que gera estímulo mecânico e visual importante para muitas larvas (DELBARE, 1996; DRILLET *et al.*,2011).

Alguns cultivos massivos de copépodes foram realizados e demonstraram uma produção adequada para utilização no mercado comercial (PAYNE e RIPPINGALE, 2000). Entre os copépodes mais comumente estudados e cultivados nas larviculturas de peixes destacam-se os Calanoida como: *Acartia* spp. (OHNO e OKAMURA; 1988; TOLEDO *et al.*, 1997; SCHIPP *et al.*, 1999); *Eurytemora* spp. (SHIELDS *et al.*, 1999); *Pseudodiaptomus* spp. (TOLETO *et al.*, 1999); *Gladioferens*

spp. (PAYNE e RIPPINGALE, 2001); e os Harpacticoida: *Tisbe* spp. (STØTTRUP e NORSKER, 1997; NANTON e CASTELL, 1998).

Os copépodes Harpacticoida apresentam maior produtividade e densidade nos cultivos intensivos, porém eles são bentônicos e não estão disponíveis para as larvas na coluna d' água (STØTTRUP e NORSKER, 1997; PAYNE e RIPPINGALE, 2001), em compensação, os Calanoida são na sua grande maioria pelágicos, o que favorece a alimentação das larvas, mas apresentam baixas taxas de produtividade e de densidades nos cultivos intensivos (STØTTRUP *et al.*, 1986, SCHIPP *et al.*, 1999).

Cultivos em larga escala de cópodes marinhos vêm se mostrando biologicamente e economicamente viáveis para atividades comerciais, (STØTTRUP, 2000), como por exemplo, na Noruega, onde os copépodes são usados com relativa frequência como alimento vivo na larvicultura de peixes marinhos de águas frias. Eles têm se mostrado bastante efetivos quando utilizados em conjunto com artêmias na larvicultura do bacalhau *Gadus morhua* e do linguado do Atlântico *Hippoglossus hippoglossus* (EVJEMO *et al.*, 1997). Na Austrália, Payne e Rippingale (1998) verificaram que o uso do copépode *Gladioferens imparipes* mostrou-se adequado para alimentar durante os seis primeiros meses juvenis do peixe cachimbo (*Stigmatopora argus*), resultando em 99% de sobrevivência. Em 2001, os mesmos autores, relataram que espécies de peixes da família Lutjanidae e Serranidae quando alimentados com náuplios de copépodes apresentaram bom crescimento larval e boa sobrevivência.

Para o Lutjanidae de valor comercial *Lutjanus johnii*, Schipp *et al.* (1999) obtiveram uma taxa de sobrevivência de 40% usando *Acartia* spp. por vinte e um dias após a eclosão, em comparação com 30% de sobrevivência alcançado usando zooplâncton selvagem. Payne e Rippingale (2000) também encontraram maior sobrevivência e digestibilidade utilizando náuplios de copépodes no cultivo de *Hippocampus subelongatus* do que utilizando náuplios de *Artemia* spp. enriquecidos.

Copépodes Calanoida do gênero *Acartia* são considerados candidatos promissores para o cultivo em massa, pois possuem uma ampla distribuição em nível mundial, sendo muito frequentes e abundantes em águas costeiras (OHNO e OKAMURA, 1988). Estes copépodes são suspensívoros e predadores seletivos,

apresentando um amplo hábito alimentar (MAUCHLINE 1998; BOLTOVSKOY, 1999). A espécie *Acartia tonsa* está entre as mais estudadas no momento, sendo amplamente distribuída pelo Atlântico Ocidental, Indo-Pacífico, Europa, Mar Báltico e Mar Negro através do Mar Mediterrâneo. É uma espécie eurialina (0-38 ups) e euritérmica (0-30° C) que não produz sacos ovígeros, liberando seus ovos diretamente na coluna d'água (MAUCHLINE,1998).

Segundo Boltovskoy (1999) e Mauchline (1998), a taxa de produção de ovos das fêmeas de copépodes Calanoida depende da quantidade e da qualidade do alimento ingerido, e o desenvolvimento embrionário depende da temperatura e das condições ambientais. Tem sido observado que algumas espécies de copépodes podem produzir ovos em diapausa, uma adaptação fisiológica pelas quais certos processos reprodutivos são alterados para permitir a sobrevivência dos ovos sob condições ambientais adversas, e o uso destes ovos poderá ser também uma opção para favorecer o emprego dos copépodes em sistemas de cultivo marinho (MARCUS, 2005).

O cultivo intensivo de copépodes buscando a obtenção segura de um alimento rico nutricionalmente e com baixo risco de contaminação, ainda está em desenvolvimento em vários países (STØTTRUP, 2000) e, embora as perspectivas sejam otimistas, pesquisas relacionadas com as necessidades nutricionais destes organismos são necessárias, pois a qualidade e a quantidade alimentar são provavelmente os fatores mais importantes que regulam a produtividade de copépodes em cultivo (CAMUS *et al.*, 2009; DRILLET *et al.*, 2011).

Copépodes Calanoida podem ser suspensívoros e também predadores, apresentando uma ampla dieta, mas há ainda relativamente pouca informação sobre suas preferências alimentares na natureza e também sobre o valor nutricional do fitoplâncton ingerido pelos copépodes no ambiente natural. Por esta razão a identificação de dietas de microalgas que permitam melhores taxas de reprodução, sobrevivência e crescimento em sistemas de cultivo, é de suma importância para o desenvolvimento da aquicultura, em especial para o sucesso na larvicultura de peixes marinhos (PUELLO-CRUZ *et al.*,2009).

Estudos focados em definir uma dieta ideal para otimizar o cultivo dos copépodes vem sendo realizados (DRILLET *et al.*, 2011). Segundo Støttrup e

Jensen (1990) o tamanho e o valor nutricional das espécies de microalgas utilizadas na alimentação de *Acartia tonsa*, podem influenciar o seu crescimento e sua fecundidade, por isso há uma grande preocupação que dietas unialgais possam provocar uma diminuição no seu valor nutricional.

A microalga *Isochrysis galbana* foi considerada eficaz para maximizar a produção de copépodes, por possuir altos valores de HUFA e tamanho adequado para todos os estágios de desenvolvimento dos copépodes (PAYNE e RIPPINGALE, 2000). A microalga *Thalassiosira weissflogii* também possui um tamanho adequado e perfil nutricional rico em ácidos graxos para a *A. tonsa* (STØTTRUP *et al.*, 1990, 1999). Além disso, dietas compostas por mais de uma microalga também apresentam benefícios a *Acartia* spp. (SCHIPP *et al.*, 1999).

Os altos custos associados com a produção de microalgas, os riscos de contaminação, e as variações temporais no valor bioquímico das algas, ainda dificultam a operação de grandes volumes de cultivos em atividades de aquicultura. A fim de superar os problemas e as limitações associadas com os cultivos de algas, investigadores têm buscado substituir as algas usando dietas inertes e/ou artificiais, como um suplemento ou como a principal fonte alimentar. Diferentes métodos foram desenvolvidos para tentar reduzir a necessidade de produção de algas no local de cultivo, como pastas de algas, algas secas e biomassa congelada (COUTTEAU, 1996). Certamente, a aplicação de dietas alternativas é uma opção interessante para reduzir os altos custos de produção de microalgas, principalmente em termos de mão de obra, infraestrutura e requerimento de espaço (ANNUNCIAÇÃO, 2011). Ao mesmo tempo, a otimização do método de cultivo de *A. tonsa* por meio do uso de dietas inertes ou artificiais seria um grande avanço para a melhoria do sistema de cultivo intensivo, já que poderia representar um suprimento confiável de copépodes para a larvicultura de espécies comerciais (ALMEIDA, 2006).

O presente estudo tem como objetivo testar o uso de diferentes dietas na taxa de reprodução do copépode *A. tonsa*, representada neste estudo pela produção de ovos, bem como o sucesso de eclosão dos ovos e a sobrevivência dos adultos. As dietas inertes oferecidas, caso proporcionem taxas de reprodução aceitáveis, poderão representar uma alternativa como substitutas das microalgas cultivadas, o

que poderá contribuir para a redução de gastos e riscos de quebra da produção, favorecendo a otimização do cultivo da *Acartia tonsa* para uso na aquicultura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e testar o sucesso do cultivo do Calanoida *Acartia tonsa*, com diferentes dietas alternativas em comparação com a dieta tradicional de *Thalassiosira weissflogi* viva, a fim de otimizar o cultivo em larga escala desta espécie .

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevivência dos adultos e a produção de ovos de *A. tonsa* quando submetido a uma dieta composta por:
 - A. Alimento inerte comercial em diferentes concentrações;
 - B. Biomassa congelada da diatomácea *Thalassiosira weissflogii*;
- Analisar de forma indireta a ingestão das dietas ofertadas, por meio da quantificação das pelotas fecais dos copépodes (pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e período de estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Zooplâncton do Centro de Estudos do Mar, situado no Balneário de Pontal do Sul - PR. O cultivo dos copépodes iniciou-se algumas semanas antes dos experimentos, que foram realizados em Dezembro de 2012.

3.2 Obtenção e cultivo dos copépodes

Os copépodes *Acartia tonsa* (FIGURA 1) utilizados nos cultivos foram coletados no estuário da Baía de Paranaguá, em pontos onde a salinidade era de 10 a 15 ups, através de arrastos realizados em profundidades de aproximadamente 1-1,5 m, com uma rede de zooplâncton cilíndrico-cônica de 1,5 m de comprimento, 0,5 m de diâmetro de boca e malha de 300 μm . Após os arrastos os copépodes foram levados para o Laboratório de Zooplâncton, onde foram triados sob microscópio estereoscópico (Olympus SZX7) e acondicionado em dois baldes, um com 35 L e outro com 10 L, preenchidos com água do mar filtrada, com aeração suave, salinidade de 15 a 20 ups e alimentados com uma dieta mista de algas composta por *Thalassiosira weissflogii* e *Isochrysis galbana* em excesso até a realização dos experimentos. Os cultivos de copépodes foram desenvolvidos numa sala com temperatura mantida em $20 \pm 4^\circ \text{C}$, com fotoperíodo natural de aproximadamente 14 h claro: 10 h escuro.

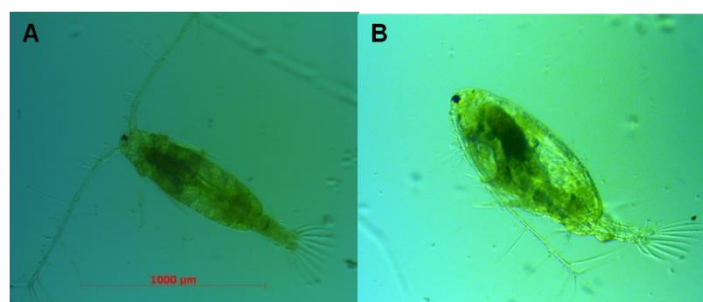


FIGURA 1 - Fêmea do copépode *Acartia tonsa*: Vista ventral (A) e vista lateral (B).

3.3 Cultivo de fitoplâncton

Os cultivos das microalgas *Thalassiosira weissflogii* (FIGURA 2) e *Isochrysis galbana* foram realizadas no Laboratório de Microalgas/CEM. As duas espécies de microalgas foram cultivadas em meio de cultura semidefinido, mantidas em frascos de Erlenmeyer de 2 L com água do mar filtrada a vácuo em filtro de membrana Millipore, autoclavada, enriquecida com meio de cultura f/2 (Guillard, 1975), com adição de silicato para o meio de cultura da diatomácea *T. weissflogii*, sob condições de temperatura controlada ($20 \pm 1^\circ \text{C}$), salinidade de 35 ups, intensidade luminosa de $100\text{-}140 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 h claro:12 h escuro, proveniente de iluminação artificial.

O cultivo de *T. weissflogii* foi acompanhado diariamente, sendo realizada a contagem das células utilizando a câmera de Neubauer e o microscópio óptico (Olympus CX31) no aumento de 100X, com a finalidade de obter a concentração e avaliar o crescimento das células. As algas utilizadas para os experimentos foram coletadas principalmente na fase exponencial de crescimento.

3.3.1 Biomassa de microalga congelada

Para a realização dos experimentos, uma parte do cultivo de *T. weissflogii* foi transformada em biomassa congelada, para ser utilizada na mesma concentração da *T. weissflogii* in natura. Quando o cultivo atingiu a fase exponencial de crescimento, 280 mL de cultivo de microalga foram colocados em uma forma de gelo, e mantidos a temperatura de -10°C até o momento de uso.

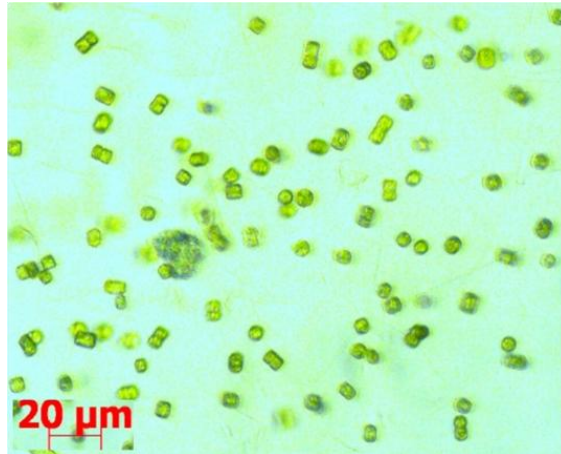


FIGURA 2- Células da microalga *Thalassiosira weissflogii* utilizada nas unidades experimentais.

3.4 Alimento Comercial

O tratamento com alimento comercial foi constituído do produto comercial Reef Phytoplankton™, facilmente encontrado em lojas especializadas de aquários. Este produto constitui de um concentrado líquido de *Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* (FIGURA 3), e é usado na alimentação de corais. Possui um perfil nutricional balanceado para oferecer em proporção adequada: ácidos graxos essenciais, proteínas, vitaminas e aminoácidos para dieta de invertebrados. Sua composição consiste em 0,40% de proteínas, 0,15% de gordura bruta, 0,5% de fibra bruta, 96,8% de umidade, 3,0% de cinzas. Além disso, Reef Phytoplankton™ contém uma fonte natural de carotenóides que proporciona benefício extra na atividade antioxidante, além de uma fonte de pigmentação mais biodisponível quando comparado com outras fontes naturais e pigmentos sintéticos. Suas partículas variam de 1-20 µm, podendo alimentar uma ampla variedade de invertebrados (SEACHEM, 2012).

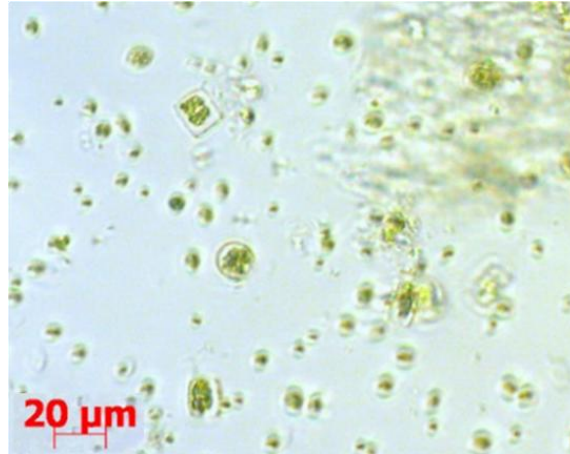


FIGURA 3 - Células das microalgas do produto comercial Reef Phytoplankton™ utilizada nas unidades experimentais.

3.5 Protocolo Experimental

Foram testados cinco dietas com três réplicas cada, num total de 15 unidades experimentais. Como controle, foram utilizadas células vivas de *Thalassiosira weissflogii* ($2 \cdot 10^4$ cél. mL⁻¹). A concentração de *T. weissflogii* foi definida com base na curva de saturação da produção de ovos para a *Acartia tonsa*, obtida nos estudos de Kiørboe *et al.*(1985), no qual a *A. tonsa* alcançou uma estabilização na produção de ovos em aproximadamente 500 µg C.L⁻¹ quando alimentada com a microalga *Rhodomonas báltica*. Considerando a quantidade de carbono e o volume celular de *R. báltica* e de *T. weissflogii*, o equivalente em biovolume requerido para alcançar 500 µg C.L⁻¹ seria $2 \cdot 10^4$ cél.mL⁻¹ de *T. weissflogii*.

As outras dietas consistiram em: biomassa congelada de *T. weissflogii*, que era previamente descongelada, e posteriormente realizada a contagem de células na câmara de Neubauer, para ser utilizada nos experimentos na concentração de $2 \cdot 10^4$ cél.mL⁻¹, e o alimento comercial Reef Phytoplankton™ em três concentrações diferentes: 25, 50 e 75 µL L⁻¹ para 1 L de água do mar filtrada. Segundo o fabricante deve-se utilizar 5 mL do produto para 200 L de água para alimentar corais, baseado neste valor, por meio de cálculos, obteve-se a concentração equivalente de 25 µL L⁻¹ do produto. Com a finalidade de avaliar a concentração mais adequada, optou-se

por dobrar e triplicar a concentração do alimento comercial nas unidades experimentais.

3.6 Unidades experimentais e coletas de dados

As unidades experimentais foram conduzidas em béqueres de 300 mL, com 14 copépodes adultos (10 fêmeas/4 machos), separados com pipeta de Pasteur sob microscópio estereoscópico. Os copépodes foram mantidos em inanição pelo período de 10 h antes do experimento para descartar ovos e pelotas fecais provenientes da alimentação pretérita ofertada no cultivo de manutenção (FIGURA 4).

Os indivíduos testados foram mantidos sob salinidade de 20 ups, temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo natural de 14 h claro: 10 h escuro pelo período de 24 h. Os béqueres foram suavemente agitados a cada 4 h para a ressuspensão dos alimentos ofertados. Após 24 h de incubação, os copépodes vivos foram contabilizados sob microscópio estereoscópico e o conteúdo de cada béquer foi retido em uma peneira de malha de 20 μm e fixado em solução de formaldeído 4% para posterior contagem de ovos e pelotas fecais em placas de Petri quadriculadas. A produção de ovos foi expressa em ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ considerando o número de fêmeas vivas no final do experimento, e as pelotas fecais foram expressas em pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹, considerando o número de copépodes vivos no final do experimento.

A fim de quantificar o sucesso de eclosão dos ovos para cada dieta, no final do experimento e antes da fixação com formol, um número de 15 ovos foram separado de cada tratamento e transferido para placas de Petri, onde foram mantidos sob as mesmas condições que as unidades experimentais durante 24 h. O sucesso de eclosão foi obtido em porcentagem, sendo o número de náuplios eclodidos contabilizado e dividido pelo número de ovos separados multiplicados por 100.

Ao final do experimento foram obtidas imagens dos ovos, pelotas fecais, e partículas celulares das dietas através do microscópio invertido Zeiss Axiophot acoplado a uma câmera AxioCam ERc5s, editadas no programa AxionVisionRel.4.8.

3.7 Análises Estatísticas

A homogeneidade das variâncias dos dados foi testada pelo teste Cochran, e quando necessário os dados de produção foram transformados em raiz quadrada. Posteriormente foi aplicada a Análise de Variância Unifatorial (ANOVA) para verificar se houve diferença significativa na produção de ovos, pelotas fecais e sobrevivência nos tratamentos com diferentes dietas. Para identificar entre quais tratamentos havia valores significativamente diferentes, foram realizadas comparações das médias pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls). Ambas as análises utilizaram nível de significância de 5%. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados pelo pacote estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM).

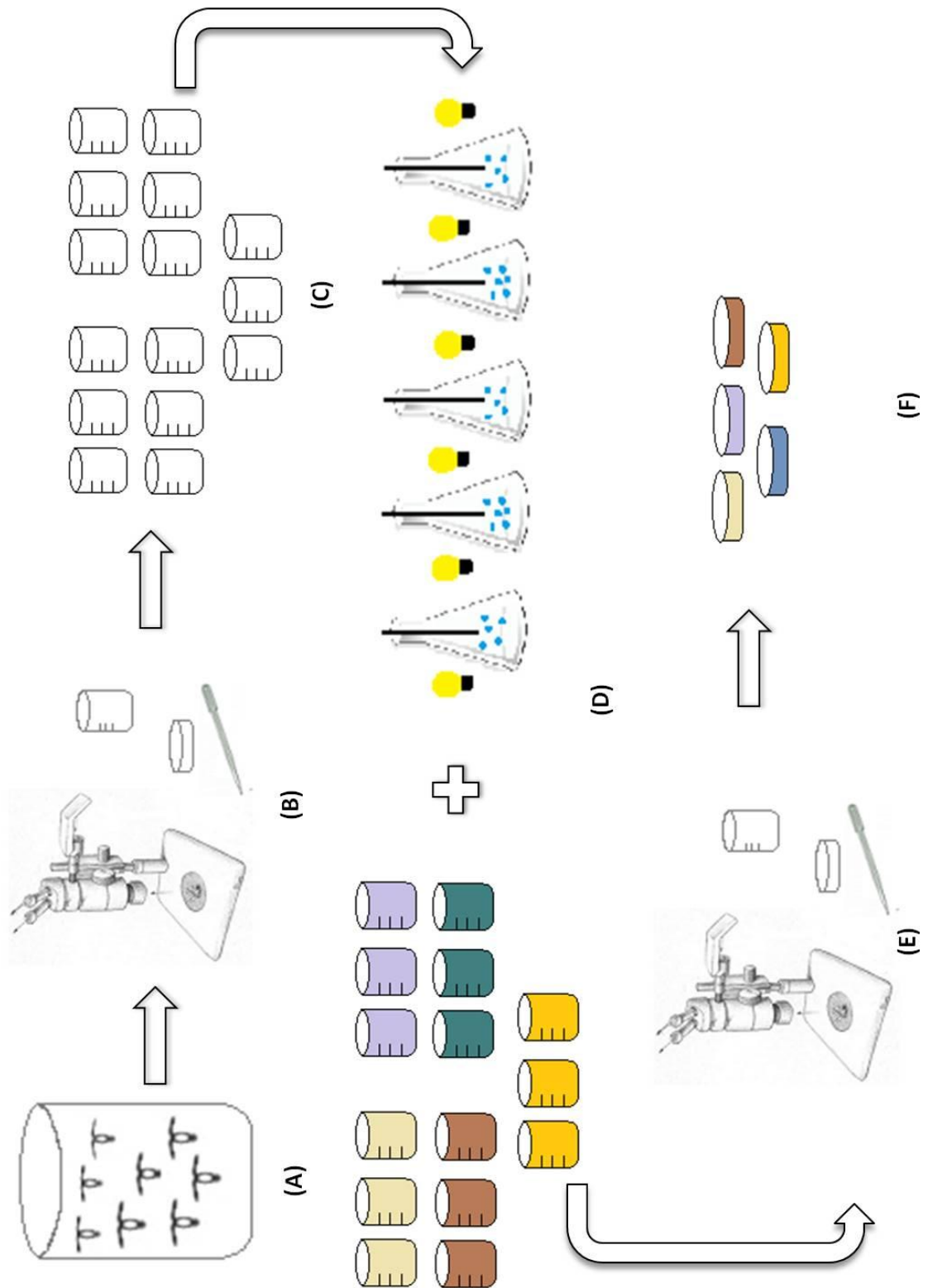


FIGURA 4 - Representação esquemática do experimento para obter a produção de ovos, produção de pelotas fecais e sucesso de eclosão. (A) Manutenção do copépode *Acartia tonsa* em laboratório, (B) Separação dos copépodes e preparação das unidades experimentais, (C) Copépodes em inanição pelo período de 10 h, (D) Distribuição das dietas nos tratamentos e realização do experimento pelo período de 24 h, (E) Separação dos ovos, contagem dos copépodes vivos e fixação do material em formaldeído 4%, (F) Incubação dos ovos e obtenção da taxa de sucesso de eclosão dos ovos.

4. RESULTADOS

4.1 Produção de ovos

A produção de ovos variou conforme as dietas, com o maior valor médio observado (ANOVA, $p < 0,05$) no tratamento controle (células vivas de *Thalassiosira weissflogii*) com 25 ± 4 ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹. Para a dieta composta por biomassa congelada de *T. weissflogii*, houve uma produção significativamente menor em relação à biomassa natural ($8 \pm 0,5$ ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹), porém superior ao tratamento com alimento comercial (FIGURA 3).

Com relação ao alimento comercial inerte Reef PhytoplanktonTM, a produção de ovos foi baixa e significativamente menor do que a obtida com as outras dietas anteriores. Em adição, não houve diferenças significativas entre as três concentrações testadas de alimento comercial, sendo obtidos os valores de $2,4 \pm 0,5$, $3,2 \pm 0,5$ e $3,5 \pm 0,2$ ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ para as concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{L L}^{-1}$ respectivamente (FIGURA 5).

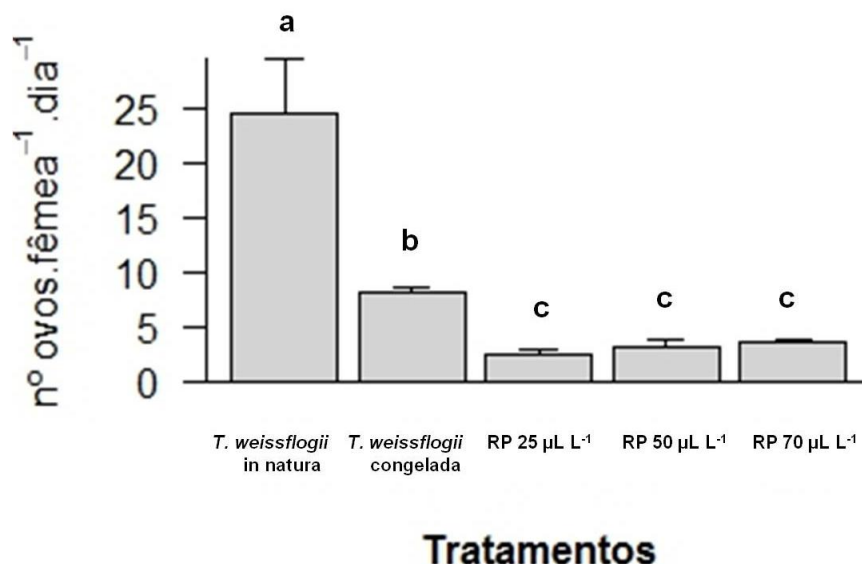


FIGURA 5 - Valores médios e desvio padrão da produção de ovos dada em nº. ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹ nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$).

O sucesso de eclosão dos ovos (FIGURA 7) variou pouco entre os tratamentos, a maior taxa de eclosão ocorreu na dieta com células vivas de *Thalassiosira weissflogii*, no qual 95% dos ovos eclodiram. A menor taxa foi na dieta com alimento comercial na concentração de $25 \mu\text{L L}^{-1}$ com 73% de eclosão dos ovos (FIGURA 6).

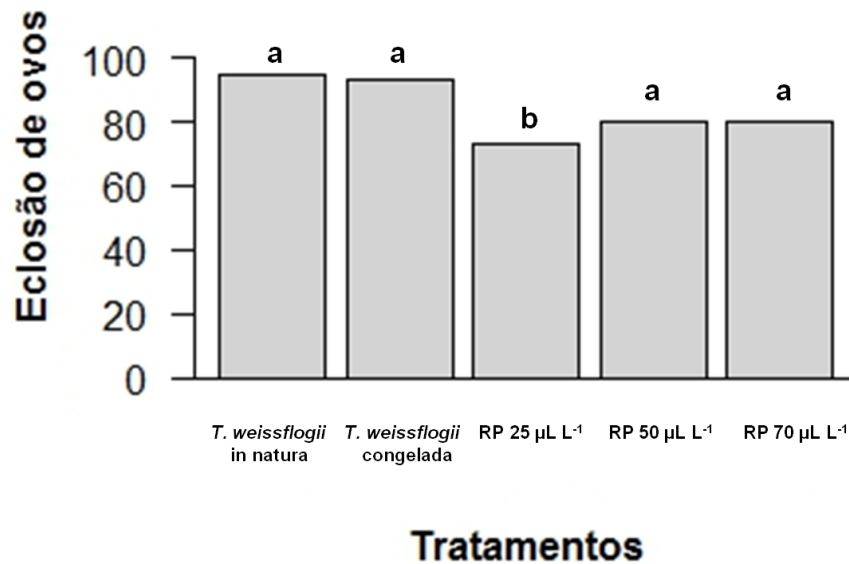


FIGURA 6 - Sucesso de eclosão dos ovos de *Acartia tonsa* nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$).

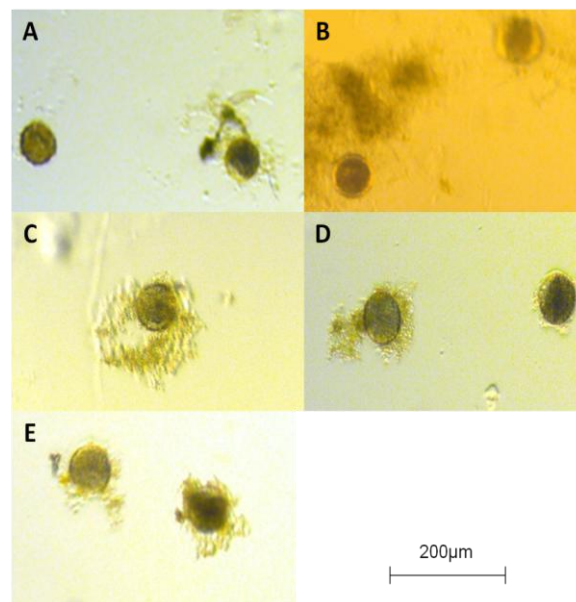


FIGURA 7 - Formato e tamanho dos ovos dos copépodes nas diferentes dietas testadas: células vivas de *Thalassiosira weissflogii* (A); biomassa congelada de *T. weissflogii* (B); Alimento comercial Reef Phytoplankton™ a $25 \mu\text{L L}^{-1}$ (C); $50 \mu\text{L L}^{-1}$ (D) e a $75 \mu\text{L L}^{-1}$ (E).

4.2 Produção de Pelotas Fecais

Os valores obtidos na produção de pelotas fecais (FIGURA 9) entre as diferentes dietas variaram de 11 ± 3 a 92 ± 16 pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹. A dieta com *Thalassiosira weissflogii* in natura apresentou o maior valor, seguido da dieta com biomassa congelada de *T. weissflogii* (42 ± 4). Para os experimentos com alimento comercial não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações na produção de pelotas fecais (FIGURA 8).

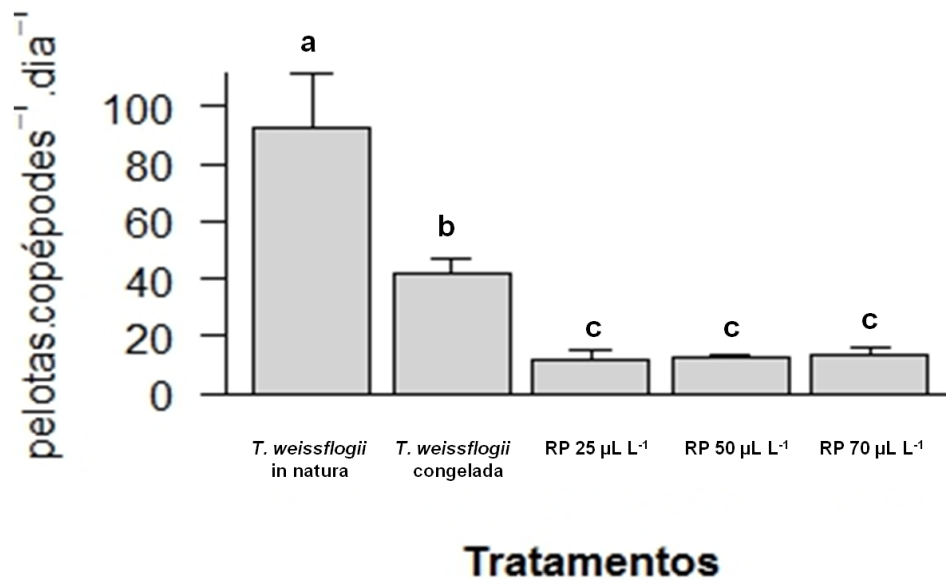


FIGURA 8 - Valores médios e desvio padrão da produção de pelotas. copépode⁻¹. dia⁻¹ nas diferentes dietas testadas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$).

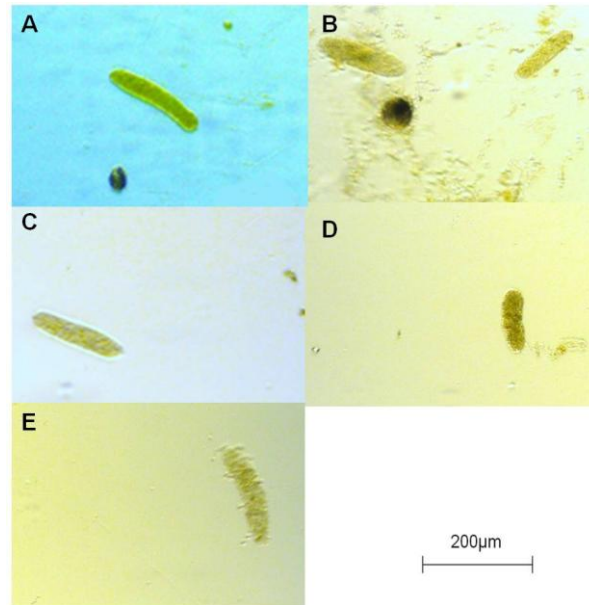


FIGURA 9 - Formato e tamanho das pelotas fecais dos copépodes nas diferentes dietas testadas: células vivas de *Thalassiosira weissflogii* (A); biomassa congelada de *T. weissflogii* (B); Alimento comercial Reef Phytoplankton™ a $25 \mu\text{L L}^{-1}$ (C); $50 \mu\text{L L}^{-1}$ (D) e a $75 \mu\text{L L}^{-1}$ (E).

4.3 Sobrevivência

Os maiores percentuais de sobrevivência dos copépodes ao final do experimento foram de 100% e 93%, encontrados nas dietas com alimento comercial na concentração de 50 e $75 \mu\text{L L}^{-1}$ e o menor valor encontrado foi de 76% na dieta com biomassa congelada de *Thalassiosira weissflogii*. O tratamento com biomassa congelada de *T. weissflogii* apresentou diferenças significativas em relação as dietas com alimento comercial, mas não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com *T. weissflogii* in natura, porém esta dieta teve sobrevivência significativamente menor em relação a dieta com alimento comercial na concentração de $50 \mu\text{L L}^{-1}$ (FIGURA 10).

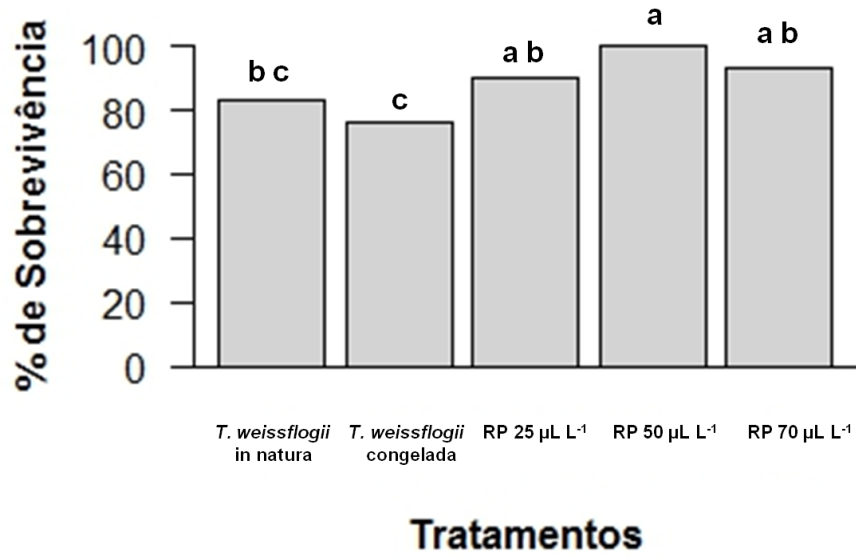


FIGURA 10 - Valores percentuais da sobrevivência dos copépodes ao final do experimento nas diferentes dietas. Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Produção e sucesso de eclosão dos ovos

Os resultados do presente trabalho indicaram importantes diferenças entre as dietas consideradas. A produção de ovos de *Acartia tonsa* obtida no tratamento controle com a dieta in natura de *Thalassiosira weissflogii* foi a mais elevada (25 ± 4 ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹) e ficou dentro da média encontrada em estudos similares desenvolvidos no sul do Brasil com ambas as espécies (TEIXEIRA *et al.*, 2010). Este resultado está de acordo com outros trabalhos que relatam *T. weissflogii* como sendo uma dieta eficiente para produção de ovos de *A. tonsa* (STØTTRUP e JENSEN, 1990; JÓNASDÓTTIR e KIØRBOE, 1996). O sucesso de eclosão dos ovos também foi maior com esta dieta, confirmando que a mesma foi a mais adequada quando comparada aos outros alimentos ofertados, pois de acordo com Jónasdóttir e Kiørboe (1996), alimentos carentes em nutrientes essenciais, promovem diminuição na produção de ovos e no sucesso de eclosão.

A dieta com biomassa congelada de *T. weissflogii* não proporcionou uma produção elevada de ovos, mas mesmo assim ainda foi maior do que valores de produção relatados na literatura sob outras dietas congeladas. Milione *et al.*(2007) alimentaram *Acartia sinjiensis* com duas dietas de microalgas congeladas, uma composta por *Tetraselmis* sp. e outra composta por *Nannochloropsis* sp, sendo que ambas as dietas apresentaram baixas taxas de produção de ovos (0 a 4 ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹).Puello- Cruz *et al.* (2009) também obtiveram valores relativamente baixos de produção de ovos alimentando o copépode *Pseudodiaptomus euryhalinus* com *Tetraselmis* sp. congelada (cerca de 20% dos organismos alimentados com esta dieta eram náuplios, enquanto no tratamento alimentado com a dieta de células vivas de *Chaetoceros muelleri*, 43% dos organismos eram náuplios).

Por outro lado, diversas dietas de microalgas congeladas vêm sendo utilizadas com sucesso na aquicultura de organismos filtradores, como foi verificado por Navarro (1999), que não encontrou diferenças significativas na composição

nutricional e nas características morfológicas de um grupo de rotíferos alimentado com microalgas vivas e outro grupo alimentado com microalgas congeladas.

Embora a dieta com *Thalassiosira weissflogii* congelada tenha propiciado valores relativamente baixos na produção de ovos, o sucesso de eclosão foi alto, não tendo diferença significativa em relação ao sucesso de eclosão do tratamento com *T. weissflogii* in natura. Apesar da pequena quantidade alcançada na produção de ovos, a biomassa congelada de *T. weissflogii* mostrou ser uma dieta viável para substituir dietas com microalgas vivas, caso haja problemas na produção de fitoplâncton, e certamente pode manter cultivos de copépodes por vários dias enquanto não houver outro recurso disponível.

Recentemente o uso de alimento comercial inerte, como pastas de algas, tornou-se mais popular na aquicultura, pois pode ser usado como uma fonte alternativa de alimento no caso de falha no cultivo de algas, ocorrência não muito atípica (MILIONE *et al.*, 2007). Entretanto no presente estudo, o tratamento com alimento comercial resultou na menor produtividade observada, e mesmo com o aumento da concentração deste alimento os resultados não diferiram estatisticamente entre si, sendo todos inferiores àqueles obtidos com células vivas ou congeladas de *T. weissflogii*. Em experimentos piloto realizados em nosso laboratório, o produto foi usado numa concentração dez vezes maior do que a recomendada pelo fornecedor, e também foi observada baixa produtividade, sugerindo que neste caso a concentração não influenciou na produtividade e que talvez, o perfil nutricional deste alimento não seja o mais adequado. Resultados semelhantes foram encontrados por Kaminski (2004) utilizando AlgaMac e por Almeida (2006) com Culture Selco 3000[®] para alimentação da *A. tonsa*. Com relação ao sucesso de eclosão dos ovos, os tratamentos com produto inerte tiveram a menor taxa de sucesso de eclosão, o que comprovou a ineficácia deste produto como alternativa alimentar para *A. tonsa*.

Uma outra possibilidade a ser considerada, é que copépodes Calanoida são suspensívoros seletivos (MAUCHLINE 1998; STØTTRUP, 2000) e isto leva a crer que *A. tonsa* pode ter preferência por selecionar células vivas de microalgas, levando em consideração não só a composição bioquímica mas também a motilidade como requisito de boa qualidade alimentar. O trabalho de Kiørboe *et al.*

(1996), avaliou o comportamento alimentar de *Acartia tonsa* e verificou que esta espécie prefere se alimentar de diatomáceas em relação a ciliados. Uma das suas hipóteses foi que a presença das diatomáceas na coluna d' água estimula a predação pelos copépodes, em comparação aos ciliados que ficavam mais ao fundo, o que assume que os copépodes preferem alimentos que fiquem em suspensão, porém quando o ciliado e a diatomácea foram oferecidos em um ambiente de constante movimento, notou-se que a quantidade de ciliados ingeridos aumentou, pois eles estavam mais presentes na coluna d' água, ou seja em suspensão.

Tanto no tratamento com biomassa congelada de *Thalassiosira weissflogii* como na dieta comercial, as células não permaneceram tanto tempo em suspensão, ao contrário do tratamento com alga viva que possui maior capacidade de ficar na coluna d' água, deste modo, *A. tonsa* pode ter evitado alimentar-se das células mortas da dieta comercial. Talvez níveis mais elevados de agitação possam ajudar a evitar a deposição das células de algas e aumentar a ingestão.

Vale também ressaltar que possíveis diferenças na disponibilidade de substâncias químicas bioativas, tais como enzimas, presentes nas algas vivas e em pouca concentração nas algas mortas, podem ter afetado os resultados. Obviamente, mais pesquisas são necessárias para esclarecer essas questões.

De acordo com Støttrup e Jensen (1990), dietas ricas em HUFA maximizaram a fecundidade do Calanoida *A. tonsa*, pois a proporção de DHA e EPA podem afetar a fecundidade dos copépodes. Estudos relacionados à importância dos HUFAs na produtividade dos copépodes relataram que dietas com quantidades diferentes de ácidos graxos em sua composição proporcionaram diferentes taxas de produção de ovos no copépode Harpacticoida *Tisbe holothuriae* (NORSKER e STØTTRUP, 1994). Outros trabalhos como os de Payne e Rippingale (2000) e Nanton e Castell (1998) também verificaram que níveis de ácidos graxos nos copépodes variam conforme a microalga oferecida na alimentação.

Camus *et al.*, (2009) alimentou copépode *Bestiolina similis* com 10 dietas microalgais diferentes, sendo que uma dieta era composta por três microalgas e duas por duas microalgas diferentes. Ele verificou que a maior produção de ovos foi no tratamento com a dieta composta por três microalgas (44.1 ± 2.8 ovos. fêmea⁻¹. dia⁻¹), seguida das dietas com duas microalgas, sugerindo que para maximizar a

produção dos copépodes o ideal seria oferecer dietas compostas por mais de uma microalga.

No entanto, o alto custo e os riscos atribuídos à produção de microalgas tem levado a busca por novas dietas (LOURENÇO, 2006), e o uso de três microalgas para alimentação dos copépodes resultaria em um alimento vivo menos atrativo economicamente. Já Puello-Cruz *et al.* (2009) alimentou os copépodes com dietas mistas e unialgais, e teve como resultado a maior produção com dieta monoalgal de *Chateoceros*. O que sugere que a alimentação do copépode varia de espécie para espécie, cada qual com sua exigência nutricional particular, podendo necessitar tanto de uma dieta mista ou de uma dieta única.

Uma microalga para ser viável à aquicultura deve apresentar altas taxas de crescimento, ser de fácil cultivo, robusta, ser atóxica, apresentar tamanho e forma adequada para ser ingerida pelo animal de interesse, ter altas qualidades nutritivas e apresentar parede celular digerível (ou ausente) para facilitar a ingestão dos nutrientes contidos na célula (LOURENÇO, 2006).

A composição bioquímica do alimento deve ser estudada sempre que possível, pois podem influenciar na seleção pelos copépodes por detecção química e tátil. A composição de lipídeos nos copépodes depende da dieta de algas fornecida, pois a dieta pode alterar o ciclo de desenvolvimento do copépode, por isso é essencial alimentá-los com uma alga que supra as necessidades nutricionais tanto dos copépodes como das larvas de peixes marinhos (SARGENT *et al.*, 1997). Isto sugere que se concentrações de DHA e EPA forem incluídas nas dietas artificiais em proporções adequadas, poderão evitar o efeito negativo no desenvolvimento dos copépodes (SARGENT *et al.*, 1999b).

É importante enfatizar que é necessário saber a composição dos ácidos graxos nos alimentos vivos utilizados nas larviculturas, pois cada espécie de peixe possui necessidades diferentes e precisa ser administradas com presas de boa qualidade durante seus estágios de desenvolvimento (DRILLET *et al.*, 2011). Entre as dietas ofertadas neste trabalho, a *Thalassiosira weissflogii* foi a que mais apresentou ter qualidade para o cultivo de copépodes, porém a busca por novas dietas deve continuar, já que o uso de alimento inerte para maximizar a produção de copépodes vem se mostrando inviável até o momento.

5.2 Produção de pelotas fecais

Por meio dos resultados obtidos, foi possível verificar que a produção de pelotas fecais seguiu o mesmo padrão da produção de ovos. A taxa de produção fecal reflete de forma indireta a taxa de ingestão que conseqüentemente pode afetar a produção de ovos. Isso reflete tanto em termos quantitativos como qualitativos (DRILLET *et al.*,2011), conseqüentemente a taxa de ingestão será proporcional à concentração e qualidade do alimento (KLEPPEL, 1993). Neste trabalho ficou evidente que a dieta com células vivas de *Thalassiosira weissflogii* resultou em maior produção de pelotas fecais e também na maior produção de ovos.

No relato de Støttrup e Jensen,(1990) o tamanho e o valor nutricional das espécies de algas utilizadas nas dietas influenciam o crescimento e a fecundidade do Calanoídeo *Acartia tonsa*. É importante enfatizar que o tamanho da célula pode ser um empecilho para a ingestão do alimento pelo copépode, contudo não foi o caso de nenhum dos alimentos ofertados, inclusive em relação ao alimento comercial, que apesar de possuir em sua composição a microalga *Nannochloropsis* apresentou partículas de tamanhos apropriados. Segundo Berggreen *et al.* (1988) os copépodes reduzem a captura quando as partículas alimentares estão na faixa de 2 a 4 µm, e se alimentam com maior eficiência de partículas com cerca de 7 a 14 µm. Neste estudo, tanto as partículas do alimento comercial, como de *T. weissflogii* in natura e sob forma congelada, possuíam tamanhos aproximados ou até mesmo na faixa considerada ideal para *A. tonsa*.

Os resultados demonstraram que *A. tonsa* ingeriu todos os alimentos ofertados, mas em maior quantidade a dieta de *T. weissflogii* in vivo e em segundo lugar a biomassa congelada, em detrimento da dieta comercial. Portanto, os resultados obtidos na produção de ovos podem estar diretamente ligados às quantidades de células ingeridas, que por sua vez podem ter sido determinadas pelo valor nutricional (e palatabilidade) da dieta ofertada e talvez pela maior ou menor disponibilidade das células na coluna d'água (maior deposição das células mortas).

5.3 Sobrevivência

Em relação à sobrevivência os dados foram contraditórios, pois nos tratamentos onde a produtividade de pelotas fecais e ovos foram maiores (*Thalassiosira. weissflogii* congelada e in natura), a taxa de sobrevivência durante o experimento foi menor e vice-versa.

A partir dos resultados, e levando em consideração que as taxas de produtividade e pelotas fecais indicam que o alimento é adequado, a baixa taxa de sobrevivência pode estar relacionada ao manuseio dos copépodes durante a realização dos experimentos, pois ao realizar a contagem dos copépodes no final do experimento, foi possível verificar que a maioria dos copépodes mortos não possuía algumas partes do corpo, como apêndices, antenas, o que leva a conclusão que ao serem retidos nas peneiras, ou durante a transferência para os frascos, alguma colisão deve ter ocorrido, causando as mortalidades.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de ovos e de pelotas fecais do copépode *Acartia tonsa* foi influenciada pelo tipo de alimento oferecido, sendo que a dieta ofertada de forma in natura apresentou os melhores resultados.

A microalga *Thalassiosira weissflogii* in natura proporcionou a maior produção de ovos, mostrando-se bastante adequada para o cultivo de *A. tonsa*, fato já registrado por outros autores.

A biomassa congelada de *T. weissflogii* apresentou grande potencial para ser utilizada como uma dieta alternativa na manutenção de cultivos de *A. tonsa*, sobretudo em situações emergenciais quando ocorre quebra na linha de produção de microalgas. Apesar da biomassa congelada de *T. weissflogii* ter apresentado taxas adequadas de produção, novos estudos devem ser realizados para verificar o uso de outras dietas inertes que maximizem o cultivo de *A. tonsa*. Estudos relacionados a forma de congelamento e manutenção da biomassa de microalgas também devem ser realizados.

O alimento comercial Reef PhytoplanktonTM não foi adequado para a alimentação desta espécie de copépode, assim como já observado para outras dietas inertes disponíveis no mercado.

Estudos relacionados com a resuspensão e flutuabilidade de alimentos inertes aos copépodes devem ser feitos, pois talvez a taxa de ingestão de alguns alimentos “inertes”, como o caso da biomassa congelada de *T. weissflogii* possa aumentar se estiverem em um ambiente com agitação homogênea.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. De M. **Uso de Copépodes na Alimentação de Larvas de Linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) e Otimização do Cultivo do Copépode *Acartia tonsa*, Dana, 1849. 36 f. Dissertação(Pós- Graduação em Aquicultura) – Programa de Pós- Graduação em Aquicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.**
- ANNUNCIACÃO, W. F. **Cultivo do Copépode(*Acartia tonsa*), Em Sistema Intensivo, Alimentado com Espirulina Comercial Liofilizada(*Arthrospira sp.*). 72 f. – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.**
- ARANA, L.V. **Cultivo de plantas aquáticas e moluscos. In: Fundamentos em Aquicultura**, Editora da USFC, Florianópolis, 2004.
- BERGGREEN, U.; HANSEN, B.; KIØRBOE, T. **Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development: implications for determination of copepod production.** Mar Biol, v. 99, p. 341–352,1988.
- BJÖRNBERG, T.K.S. Copepoda. In: BOLTOVSKOY, D. (Ed.). **Atlas Del Zooplankton Del Atlántico Sudoccidental y Métodos de Trabajo com el Zooplankton Marino.** INIDEP, Mar Del Plata, Argentina, p. 587-679,1981.
- BLANCO, L. T.; TACON, A. G. J. **La produccion de alimento vivo y su importância en acuicultura.** AQUILA - Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para America Latina y el Caribe. Programa Cooperativo Gubernamental FAO – ITALIA. Documento de campo, p.12 – 90,1989. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S00.htm>. Acesso em: 23/11/2012.
- BOLTOVSKOY, D. **Copepoda.** In **South Atlantic Zooplankton vol 2.** Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, v. 2, p. 869-1098, 1999.
- CAMARGO, S.; POUHEY, G. O.; JUVÊNCIO, K. O. F. **Aquicultura – Um mercado em expansão.** Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396,2005.
- CAMUS, T.; ZENG, C.; McKINNON, A.D. **Egg production, egg hatching success and population increase of tropical paracalanid copepod, *Bestiolina similis***

(Calanoida: Paracalanidae) fed different microalgal diets. *Aquaculture*, Austrália, v.297, p.169-175, 2009.

COUTTEAU, P. Micro-Algae. In: **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**, FAO Fisheries Technical Paper, Roma, v.361, p. 7 - 47, 1996.

DELBARE, D.; DHERT, P.; LAVENS, P. Zooplankton. In: **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**, FAO Fisheries Technical Paper, Roma, v.361, p. 252 -282, 1996.

DRILLET, G.; FROUËL, S.; SICHLAU, M.H.; JEPSEN, Per M.; HØJGAARD, J.K.; JOARDER, A.K.; HANSEN, B.W. **Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed: A Review.** *Aquaculture*, Dinamarca, v.315, p.155-166, 2011.

DUERR, E. O.; MOLNAR, A.; SATO, V. **Cultured microalgae as aquaculture feeds.** *Journal of Marine Biotechnology*, v.7, p. 65-70, 1998.

EVJEMO, J.O.; OLSEN, Y. **Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods.** *Hydrobiologia*, Bélgica, v. 358, p. 159-162, 1997.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **El Estado Mundial de La Pesca y la Acuicultura (SOFIA)**. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma, 2012, p. 9, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.ht>> . Acesso em: 27/11/2012.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries Aquaculture Development**. Roma, v. 5, p. 6, 1997. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/003/W4493E/W4493E00.HTM>>. Acesso em: 27/11/2012.

GUILLARD, R. L. R. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. I.; CHANLEY, M. H. (Ed.) **Culture of marine invertebrates**. New York: Plenum, p. 29-59, 1975.

HAMRE, K.; MOREN, M.; SOLBAKKEN, J.; OPSTAD, I.; PITTMANZE, K. **The impact of nutrition on metamorphosis in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)**. *Aquaculture*, Noruega, v.250, p.555–565, 2005.

HUYS, R., BOXSHALL, G.A. **Copepod Evolution**. Ray Soc. Publ.Londres, v. 159, p.595-605,1991.

IZQUIERDO, M.S; **Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae**. Aquaculture Nutrition, Espanha, v.2, p.183-191, 1996.

JÓNASDÓTTIR, S.H.; KIØRBOE, T. **Copepod recruitment and food composition: do diatoms affect hatching success?**. Marine Biology, Dinamarca, v. 125, p. 743-750, 1996.

KAMINSKI, S.M. **Influência da Alimentação sobre a Reprodução e o Desenvolvimento do Copépode Calanoíde *Acartia tonsa* (Dana 1849) em cultivo intensivo**. 66 f. Dissertação(Pós- Graduação em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

KIØRBOE, T.; MOHLENBERG, F.; HAMBURGER, K. **Bioenergetics of the planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action**. Marine Ecology Progress Series, Dinamarca, v. 26, p. 85–97,1985.

KIØRBOE, T.; SAIZ, E.; VIITASALO, M. **Prey switching behaviour in the planktonic copepod *Acartia tonsa***. Marine Ecology, Dinamarca, v.143, p.65-75, 1996.

KLEPPEL, G.S. **On the diets of calanoid copepods**. Mar Ecol.Prog.Ser.,EUA, v.99, p.193-195, 1993.

KOLKOVSKI, S. **Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets** .Aquaculture, Austrália, v. 200(1/2),p.181-201, 2001.

LAVENS, P; SORGELOOS, P. In: **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**, FAO Fisheries Technical Paper, Roma,v.361, p. 7 - 47, 1996.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas, Princípios e Aplicações**. São Carlos,Rima Editora, 2006.

MARCUS, N.H. **Calanoid copepods, resting eggs, and aquaculture**. In: LEE, C.S; BRYEN, P.J.O´;MARCUS, N.H. (Ed.) Copepods in Aquaculture, p. 3-9. 2005.

MAUCHLINE, J. **The Biology of Calanoid Copepods.** In *Advances in Marine Biology*, Blaxter, Southward and Tyler (Ed.) v. 33, p. 1-710, 1998.

MILIONE, M.; ZENG, C. **The effects of algal diets on population growth and egg hatching success of the tropical calanoid copepod, *Acartia sinjiensis*.** *Aquaculture*, Austrália, v. 273, p. 656-664, 2007.

NANTON, D.A.; CASTELL, J.D. **The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae.** *Aquaculture*, Holanda, v. 163, p. 251–261, 1998.

NAVARRO, N. **Feeding behaviour of the rotifers *Brachionus plicatilis* and *Brachionus rotundiformis* with two types of food: live and freeze-dried microalgae.** *Experimental Marine Biology and Ecology*, Espanha, v. 237, p. 75-87, 1999.

NORKER, N. H.; STØTTRUP, J.G. **The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes.** *Aquaculture*, Dinamarca, v. 125, p.155-166, 1994.

OHNO, A.; OKAMURA, Y. **Propagation of Calanoid Copepod, *Acartia tsuensis*, in Outdoor Tanks.** *Aquaculture*, Japão, v. 70, p.39-51, 1988.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J.; LONGMORE R.B. **Growth and survival of juvenile pipefish (*Stigmatopora argus*) fed live copepods with high and low HUFA content.** *Aquaculture*, Austrália, v.167, p. 237-245, 1998.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J. **Evaluation of diets for culture of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*.** *Aquaculture*, Austrália, v. 187, p. 85–96, 2000.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J. **Intensive cultivation of calanoid copepod *Gladioferens impatipe*.** *Aquaculture*, Austrália, v. 201, p.329-342, 2001.

PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J.; CLEARLY, J.J. **Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae.** *Aquaculture*, Austrália, v. 194, p. 137–150, 2001.

PRIETO, M.; ATENCIO, V. **Zooplankton in larviculture of neotropical fishes.** *Revista MVZ Córdoba*, v.13(2), p.1415-1425, 2008.

PUELLO-CRUZ, A.C.; MEZO-VILLALOBOS, S.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, B.; VOLTOLINA, D. **Culture of the calanoid copepod *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Johnson 1939) with different microalgal diets.** *Aquaculture*, México, v. 290, p. 317-319, 2009.

SARGENT, J.R.; BELL, J.G.; BELL, M.V.; HENDERSON, R.J.; ROCHER, D.J. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: LAHLOU, B., VITIELLO, P. (Ed.) **Aquaculture: Fundamentals and Applied Research. Coastal and Estuarine Studies** 43, American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 103-124, 1993.

SARGENT, J.; McEVOY, L.A.; BELL, J.G. **Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds.** *Aquaculture*, Reino Unido, v. 155, p. 117-127, 1997.

SARGENT, J.; McEVOY, L.; ESTEVEZ, A.; BELL, G.; BELL, M.; HENDERSON, J.; TOCHER, D. **Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions.** *Aquaculture*, Reino Unido, v. 179, p. 217-229, 1999a.

SARGENT, J.; BELL, G.; McEVOY, L.; TOCHER, D.; ESTEVEZ, A. **Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish.** *Aquaculture*, Reino Unido, v. 177, p. 191-199, 1999b.

SCHIPP, G.R.; BOSMANS, J.M.P.; MARSHALL, A.J. **A method for hatchery culture of tropical calanoid copepods, *Acartia* spp.** *Aquaculture*, Austrália, v. 174, p. 81-88, 1999.

SEACHEM . Seachem Laboratories, In. All Rights Reserved. Disponível em: <http://www.seachem.com/Products/product_pages/ReefPhytoplankton.html> . Acesso em: 05/12/2012.

SHIELDS, R.J.; BELL, J.G.; LUIZI, F.S.; GARA, B.; BROMAGE, N.R.; SARGENT, J. **Natural copepods are superior to enriched artemia nauplii as feed for halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in terms of survival, pigmentation and retinal morphology:** Relation to dietary essential fatty acids. 1999. American Society for Nutritional Sciences, 1186-1194, 1999.

SORGELOOS, P.; DHERT, P.; CANDREVA, P. **Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture.** *Aquaculture*, v. 200, p. 147-159, 2001.

STØTTRUP, J.G.; RICHARDSON, K.; KIRKEGAARD, E.; PIHL, N.J. **The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae.** *Aquaculture, Dinamarca*, v. 52, p. 87–96, 1986.

STØTTRUP, J.G.; JENSEN, J. **Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana.** *J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Dinamarca*, v. 141, p. 87–105, 1990.

STØTTRUP, J.G.; NORSKER, N.H. **Production and use of copepods in marine fish larviculture.** *Aquaculture, Dinamarca*, v. 155, p. 231–247, 1997.

STØTTRUP, J.G.; BELL, J.G.; SARGENT, J.R. **The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets.** *Aquaculture, Dinamarca*, v. 176, p. 257–269, 1999.

STØTTRUP, J.G. **The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture.** *Aquac. Res, Dinamarca*, v. 31, p. 703–711, 2000.

TEIXEIRA, P.F.; KAMINSKI, S.M.; AVILA, T.R.; CARDOZO, A.P.; BERSANO, J.G.; BIANCHINI, A. **Diet influence on egg production of the copepod *Acartia tonsa* (Dana, 1896).** *An Acad Bras Cienc*, v. 82(2), p.333-339, 2010.

TOLEDO, J.D.; GOLEZ, S.N.; DOI, M.; OHNO, A. **Food selection of early grouper, *Epinephelus coioides*, larvae reared by the semi-intensive method.** *Suisanzoshoku*, v. 45, p.327–337, 1997.

TOLEDO, J.D.; GOLEZ, M.S.; DOI, M.; OHNO, A. **Use of copepod nauplii during early feeding stage of grouper *Epinephelus coioides*.** *Fish. Sci.* v. 65, p. 390–397, 1999.

WATANABE, T.; KITAJIMA, C; FUJITA, S. **Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review.** *Aquaculture* 34, p. 115-143, 1983.