



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE CISTOS E USO DE QUITINASE, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E
ÁCIDO ASCÓRBICO NA ECLOSÃO DE NÁUPLIOS DE BRANCHONETA**

Dendrocephalus brasiliensis (PESTA, 1921)

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

RECIFE

2016

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

**PRODUÇÃO DE CISTOS E USO DE QUITINASE, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E
ÁCIDO ASCÓRBICO NA ECLOSÃO DE NÁUPLIOS DE BRANCHONETA**

Dendrocephalus brasiliensis (PESTA, 1921)

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Pernambuco
como cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas**

Orientador: **Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra** –

Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE

Co-Orientadora: **Profa. Dr^a. Fabiana R. de Arruda Câmara** – Unidade
Acadêmica em Ciências Agrárias/EAJ/UFRN

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Leila Laise Souza

Produção de cistos e uso de quitinase, hidróxido de cálcio e ácido ascórbico na eclosão de náuplios de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)/ Leila Laise Souza Santos– Recife: O Autor, 2016.

70 folhas: Il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Fabiana R. de Arruda Câmara

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

- 1. Crustacea 2. Enzimas 3. Aquicultura I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Câmara, Fabiana R. de Arruda (coorientadora) III. Título**

595.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-270

LEILA LAISE SOUZA SANTOS

**PRODUÇÃO DE CISTOS E USO DE QUITINASE, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E
ÁCIDO ASCÓRBICO NA ECLOSÃO DE NÁUPLIOS DE BRANCHONETA**

Dendrocephalus brasiliensis (PESTA, 1921)

**Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Ciências Biológicas,
da Universidade Federal de Pernambuco
como cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas**

Data de aprovação: 14/06/2016

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (**Orientador**)
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira (**Examinador Externo**)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte/EAJ - UFRN

Prof. (a) Dra. Karina Ribeiro (**Examinador Externo**)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte/EAJ - UFRN

Aos meus pais, Aparecida e Jailson,
...por me apoiarem e dedicarem todo seu amor
nos momentos que mais precisei...

AGRADECIMENTOS

Principalmente a Deus por ter dado o dom da vida e ter concedido esta oportunidade e forças para que eu pudesse concluir mais esta etapa de minha vida.

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de ingresso na Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Ao meu orientador Dr. Ranilson Bezerra pela oportunidade de ser sua aluna e por todos os ensinamentos do dia-a-dia. Eternamente grata pela confiança em aceitar-me em seu laboratório; e minha Co-orientadora Fabiana R. de A. Câmara por estar comigo em mais uma etapa acadêmica a ser concluída; pela amizade, atenção, paciência e dedicação em me ajudar a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Um enorme carinho ao Dr. Thiago Cahú por sempre estar disponível a me ensinar; obrigada por aguentar meus aperreios e insistências. Você faz parte de cada pedaço do meu trabalho, sem seus conselhos parte dele não seria possível.

A equipe de professores da Escola Agrícola de Jundiá pelo apoio e incentivo e em especial aos professores Dárlio Inácio e Karina Ribeiro pela confiança, indicação ao programa de Pós-Graduação e palavras de incentivo. A todos os funcionários e colegas que estiveram presente nessa etapa, principalmente a Emerson, pelas palavras amigas. A equipe PRONATEC, Paulo Mário, Magno Hudson e Camila Fernanda pelos momentos de descontração, trabalhos e palavras de incentivo.

Aos laboratórios dos professores Dr. Hugo Rocha e Elizeu Antunes do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, que me receberam com muito carinho para a realização de algumas etapas desse trabalho.

A todos os colegas do LABENZ em que tive o prazer de conhecer e conviver, em especial a Lucas Valério, Rudã Fernandes, Flavia Thuane, Lidiane Cristina, Milena Marcia, Rafael Azevedo, Helane Costa, Raquel Pereira, Luiz Svintiskas, Karollina Lopes, Raquel Pereira, Andreia Cybelle e Marina Marcuschi.

As minhas amigas e companheiras da Pós-graduação, Iasmim Lucas, Isabela Andrade, Camila Borba, Wellma Oliveira e Nelânia Baptista.

A Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e apoio recebidos.

A meus pais (Antonio Jailson e Maria Aparecida) que me deram a vida, pela confiança depositada e esforço para que eu pudesse estar aqui; obrigada mãezinha pelas conversas todos os dias que estive fora de casa; a minha irmã Lilian Alaíde que me deu forças cada vez que eu desanimei (Suas palavras foram primordiais).

A todos de minha família que estiveram presente em mais uma etapa de minha vida, em especial a Mônica, Sergio e Tercia (Pelas palavras e incentivo); Chiquinho, Gaspar e Otavio (Pelas buscas até a Rodoviária); Tio Baltazar e Berg (Pelas viagens até Recife); e a minha afilhada, Clarissa, que tanto amo.

As minhas amigas de Graduação, Emanuely Peixoto e Aline Horácio, que apesar da distância nossa amizade continua a fortalecer. Enfim, seremos mestres!

As minhas futuras biólogas em que pude construir uma grande amizade: Luciane (Lú), Veronica, Láis e Fernanda. Amo vocês. Em especial a Aline, que apesar de alguns desencontros, a nossa amizade vem a se fortalecer.

A Flavia Garcia, grande irmã e amiga. Obrigada por me receber e por cada palavra, sorrisos, passeios e aventuras. Deus sabe cada pessoa que tem de colocar nas nossas vidas.

Finalmente, a todos que estiveram direta ou indiretamente presente em mais uma etapa de minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A produção de pescado no Brasil cresce em ritmo acelerado, devido principalmente ao desenvolvimento da aquicultura. No entanto, alguns setores da aquicultura, como a larvicultura, ainda apresentam entraves que limitam a produção de espécies promissoras para o cultivo. Dentre os problemas a serem solucionados é possível citar a demanda por alimento vivo ou inerte para aprimorar a produção durante a fase de larvicultura. A espécie *Dendrocephalus brasiliensis* tem sido alvo de estudos que objetivam conhecer mais detalhadamente o ciclo de vida para a sua utilização como alimento vivo e/ou inerte para o cultivo de organismos aquáticos buscando abordagens que promovam a eficiência de eclosão dos náuplios. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de cistos em condições experimentais e a ação enzimática da quitinase comparado com tratamentos químicos tradicionais no processo de eclosão de náuplios de branchoneta (*D. brasiliensis*). No ensaio experimental 1, foram testadas concentrações de 0,02mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL de quitinase comercial em 20 mg de cistos, obtendo a concentração ideal de eclosão a 0,2mg/mL com 88% de eficiência de eclosão. Assim, esta concentração foi utilizada no ensaio experimental 2 e consistiu de um controle (com água destilada) e cinco tratamentos com três réplicas: submetido à quitinase (T1), Hidróxido de cálcio (T2), ácido ascórbico (T3), hidróxido de cálcio e ácido ascórbico (T4) e com hidróxido de cálcio, ácido ascórbico e quitinase (T5). As concentrações de hidróxido de cálcio (HC) e ácido ascórbico (AA) foram estabelecidas de acordo com os resultados de melhor taxa de eclosão relatados na literatura. O T5 apresentou maior eficiência de eclosão (96%) estatisticamente, quando comparado aos demais tratamentos, possibilitando o uso desta enzima juntamente com HC e AA para elaboração de um protocolo de eclosão eficiente. Os resultados deste estudo certamente criarão mais subsídios tecnológicos para o estabelecimento da branchoneta como alimento vivo em cultivos de animais aquáticos.

Palavras chave: Aquicultura, Alimento vivo, Larvicultura, Enzima, quitina.

ABSTRACT

The fisheries production in Brazil grows in a fast pace due to the aquaculture development. However, some aquaculture sectors, such as the larviculture, have presented some issues which affect the production of species that are really valuable to the cultivation. Among the problems to be solved, it's possible to mention the live or inert food demand used to improve the production during the larviculture stage. The *Dendrocephalus brasiliensis* has been the subject of some recent studies that aim to find out its biology and use as live and/or inert food to cultivate aquatic organisms. One of the studied approaches is to increase the efficiency of the nauplii hatching which presents the major delicate lifespan factor of this animal. Therefore, the purpose of this paper was to evaluate the enzymatic action of the chitinase when compared with traditional chemical treatments in the brachoneta nauplii (*D. brasiliensis*) hatching process. In the first test, it was tested concentrations of 0.02mg/mL, 0.1mg/mL e 0.2mg/mL of commercial chitinase in 20mg of cyst, which resulted the ideal concentration to hatch at 0.2mg/mL with 88% of hatching efficiency. Thus, this concentration was used in the second test and consisted of a control (with distilled water) and five treatments with three replicas: subjected to chitinase (T1), calcium hydroxide (T2), ascorbic acid (T3), calcium hydroxide and ascorbic acid (T4), and calcium hydroxide, ascorbic acid and chitinase (T5). The concentrations of the calcium hydroxide (HC) and ascorbic acid (AA) were established according to the results of best hatching rate described in the literature. The T5 presented a higher hatching efficiency (96%) statistically, when compared to only the use of chitinase, enabling the use of this enzyme combined with HC and AA for the development of an efficient hatching protocol. The results of this study will create more technical support for the establishment of branchoneta as live feed in cultivations of aquatic animals.

Key words: aquaculture, live food, Larviculture, Enzyme, chitin.

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura:

	Página
Figura 1: Regionalização da Aquicultura Brasileira e principais espécies cultivadas em cada região	20
Figura 2: Espécie <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> em fase Juvenil (PESTA, 1921).	24
Figura 3: Exemplar fêmea (a) e macho (b) na fase adulta.	24
Figura 4: Fases de vida de <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> : Ovo (a), náuplio (b), jovem (c) e adulto (d).	25
Figura 5: Indivíduo macho com apêndices (a) e fêmea com ovissaco (b).	26
Figura 6: Náuplio de Artêmia (a) e de Branchoneta (b) após 24 horas da eclosão.	26
Figura 7: Estrutura da quitina (a) e celulose (b).	30
Figura 8: Representação das estruturas de quitina, na qual as setas representam as cadeias poliméricas no sentido terminal não-redutor.	31
Figura 9: Padrões de clivagem de quitinases. Em azul claro são representadas as subunidades da cadeia de quitina e o açúcar redutor em azul escuro. As ações enzimáticas são mostradas em tesoura.	35
Figura 10: (a) Estrutura cristalina da proteína calmodulina e os quatro sítios de ligação de afinidade ocupados pelo cálcio (Púrpura). (b) Calmodulina associada com o domínio helicoidal (vermelho) da enzima quinase II dependente de calmodulina curvada sobre si mesma ao se ligar ao domínio helicoidal do substrato.	37

Artigo Científico:

	Página
Figura 1: Fluxograma de produção e eclosão de cistos (A) e eclosão utilizando quitinase, ácido ascórbico e hidróxido de cálcio (B), correspondente ao tratamento com maior eficiência de eclosão para a espécie <i>D. brasiliensis</i> .	58
Figura 2: Número de náuplios eclodidos em 20 mg de cistos. (A) Em [0,02 mg/L], [0,1 mg/L], [0,2 mg/L] de quitinase, onde neste corresponde a 100% da	63

eclosão com 1620 náuplios. (B) Em [0,2 mg/L] de quitinase, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio, [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico + [0,02 mg/L] quitinase, onde neste corresponde a 100% da eclosão com 1771 náuplios. *Letras iguais não diferenciam os tratamentos pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Figura 3: Ação da quitinase e aditivos na morfologia do estágio larval 1 (A) e estágio larval 2 (B) para a espécie *D. brasiliensis*. I. [0,02 mg/L], II. [0,1 mg/L], III. [0,2 mg/L] de quitinase, IV. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio, V. [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, VI. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, VII. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico + [0,02 mg/L] quitinase e VIII. Morfologia da espécie *Streptocephalus dichotomus* (BERNICE, 1972). Olho mediano (ME), Primeira antena (1A), Secunda antena (2A), Antena (P), Mandíbula (MD), Primeira maxila (MX1), Secunda maxila (MX2), Segmentos torácicos (TAB), Seta anal (AS), Início da abertura anal (AI). * Indivíduos apresentaram deformações durante o estágio larval dois.

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura:

	Página
Tabela 1: Quitina de cistos, juvenis e adultos de espécies de anostracas.	31

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

FAO	Organização da Nações Unidas para Agricultura e Alimentos
OMS	Organização Mundial da Sade
EAJ	Escola Agrícola de Jundiaí
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
-NHCOCH ₃	Radical Acetamida
GlcNAc	β -D-N-acetilglucosamina (2-desoxi-2-acetamida B-D-glucose)
HCl	cido clorídrico
NaOH	Hidróxido de Sódio
DNSA	cido dinitrosalicílico
EE	Eficiência de eclosão
HC	Hidróxido de cálcio
AA	cido ascórbico
CaCO ₃	Carbonato de cálcio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Aquicultura no contexto geral.....	19
2.2. Uso de alimento vivo na Aquicultura	21
2.3. Generalidades da espécie em estudo <i>Dendrocephalus brasiliensis</i> (PESTA, 1921)	22
2.4. Uso de diferentes métodos para eficiência de eclosão de cistos de anostraca	28
2.5. Quitina.....	29
2.6. Enzimas	32
2.6.1. As Quitinases	33
2.7. Hidróxido de Cálcio e Ácido Ascórbico.....	36
3. REFERÊNCIAS.....	39
4. OBJETIVOS	50
4.3. Geral	50
4.4. Específicos	50
5. ARTIGO CIENTÍFICO	52
Resumo	54
Abstract	54
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos	56
2.1 Produção de branchonetas e cistos (<i>Dendrocephalus brasiliensis</i>)	56
2.2 Determinação de Quitina nos Cistos de Branchonetas	59
2.2.1 Atividade de Quitinase.....	59
2.3 Delineamento experimental.....	59
2.3.1 Ensaio Experimental 1: Quitinase.....	59
2.3.2 Ensaio Experimental 2: Hidróxido de Cálcio, Ácido Ascórbico e Quitinase.....	60
2.3.3 Parâmetros físicos e químicos da água	60
3. Resultados e Discussão.....	61
Referências.....	66

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A produção de pescado no Brasil vem crescendo em ritmo acelerado quando comparado a qualquer outro setor de produção de alimentos de origem animal (FAO, 2014). A aquicultura figura como uma das principais responsáveis por esse desenvolvimento, uma vez que supre a demanda por produtos pesqueiros e da pesca extrativa, que se aproxima do limite de extração para muitas espécies. No entanto, alguns setores da aquicultura como, por exemplo, a larvicultura, ainda apresenta alguns entraves que limitam a produção de algumas espécies promissoras para o cultivo. Dentre os problemas a serem solucionados é possível citar a demanda de alimento vivo ou inerte (biomassa congelada) para aprimorar a produção durante a fase de larvicultura (CÂMARA, 2000; LOPES *et al.*, 2007).

Atualmente, o microcrustáceo *Artemia sp.* é o principal alimento vivo de sustentação na larvicultura, devido ao domínio de técnicas que favorecem elevada taxa de eclosão dos náuplios. No entanto, seu elevado custo de produção de cistos e escassez no mercado restringe sobremaneira o cultivo de peixes e camarões (CÂMARA, 2000). Assim, novos estudos são necessários para viabilizar o cultivo de organismos e que possam agregar valor contribuindo para o avanço da larvicultura e proporcionando expansão, de maneira mais viável economicamente, rentável e de fácil acesso.

O microcrustáceo *Dendrocephalus brasiliensis*, conhecido popularmente como branchoneta é uma espécie que apresenta dimorfismo sexual de fácil identificação, crescendo em torno de 1 mm ao dia após o terceiro dia de vida até atingir um comprimento médio entre 3 e 3,5 cm. São essencialmente filtradores, alimentando-se de microalgas, protozoários, metazoários e matéria orgânica. Este microcrustáceo tem sido alvo de estudos que objetivam conhecer o seu comportamento, reprodução, produção de cistos e utilização na dieta de peixes carnívoros e ornamentais (CARNEIRO, 2000; LOPES, 2002), sendo mais recentemente introduzido em cultivos de engorda de camarões marinhos (YFLAAR e OLIVEIRA, 2003). Entretanto, outros estudos têm buscado aumentar a eficiência de eclosão dos náuplios, pois este é um dos principais obstáculos à sua utilização em substituição à artêmia (SILVA, 2000; YFLAAR e OLIVEIRA, 2003; LOPES, 2007).

O semi-árido apresenta condição climática favorável ao cultivo da branchoneta, uma vez que é caracterizado por períodos de estiagem que propiciam a secagem dos cistos no substrato e posteriores períodos chuvosos, quando é possível a eclosão dos náuplios e crescimento até atingir a fase adulta, iniciando a liberação de novos cistos. A liberação de cistos continua a ocorrer na fase

adulta do organismo com duração de aproximadamente três meses, e diminuindo a liberação para os meses seguintes. Os cistos podem posteriormente ser recolhidos e comercializados após a total secagem do substrato. Segundo Lopes *et al* (2007) e Medeiros (2003), cada grama de cisto gera 380.000 náuplios de Branchoneta, e na fase adulta, cada fêmea libera no substrato em torno de 150 a 200 cistos por deposição. De acordo com estes dados, é possível obter em média 2 kg de cistos/ha/ano ao se inocular 2g de cistos em um viveiro de 2000 m².

O gargalo da produção em larga escala está relacionado principalmente à reduzida taxa de eclosão e sobrevivência dos náuplios, devido à escassez de estudos e técnicas que propiciem o conhecimento da estrutura do cisto, eclosão e sobrevivência de náuplios. Diante deste problema, é indiscutível a necessidade de pesquisas que otimizam a eclosão, sendo primordial o conhecimento da atividade enzimática envolvida neste processo, como por exemplo a ação da enzima quitinase, que hidrolisa a quitina presente nos cistos de microcrustáceos e também o uso de reagentes capazes de inativar o estado de latência dos cistos por meio de liberação de íons e desfosfoliração enzimática.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aquicultura no contexto geral

Aquicultura é a produção de organismos aquáticos em cativeiro, desde seu estágio inicial (larval), até a fase adulta (fase de engorda) para fins comerciais. Nesta atividade é necessário um manejo produtivo, que vise o uso sustentável da atividade aquícola (VALENTI, 2002). O Sistema aquícola pode ser denominado de diferentes formas: pelo sistema de cultivo extensivo, intensivo e semi-intensivo; organismos cultivados (algas, peixes, moluscos e crustáceos); o meio em que se cultiva (água doce, salobra, salgada); ou outras características (cultivo de água quente, água fria, cultivo costeiro, em estuários, em ambiente fechado e com reaproveitamento de água) (YFLAAR e OLIVEIRA 2003).

O cultivo de organismos aquáticos é uma área jovem em comparação com as outras atividades de produção, como a pecuária. Teve início praticamente em 1950, na década de 70 foi responsável por menos de 1% da produção mundial de pescado para consumo humano, e seguiu crescendo, em média 8,7 % ao ano. De acordo com dados da FAO, em 2013 foram capturados 160 milhões de toneladas de pescado, contra 158 milhões do ano anterior (2012), na qual dos quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizados no consumo humano. Desses 136 milhões de toneladas, 69,6 milhões de toneladas (51,1%) tiveram origem na pesca, enquanto 66,6 milhões (48,9%) de toneladas tiveram origem na aquicultura (FAO, 2014). Assim, proporcionando a atividade pesqueira e a aquicultura a um novo recorde mundial.

O Brasil em produção aquícola está em 12º, na qual teve um crescimento de 8,6% em 22 anos, chegando a 66,6 milhões de toneladas/ano. Entre o período de 2000 e 2012 a produção de pescado em cativeiro foi de 6,7% quando comparado a produção de carne bovina (FAO, 2014). Para Aquicultura, a região Nordeste foi a maior produtora em 2013, com 140.748 toneladas de pescado, seguida pela região Sul, com 107.448 toneladas. Em 3º lugar veio a região Centro-Oeste, com 105.010 toneladas; em 4º lugar a região Norte, com 73.009 toneladas. Em 5º e último lugar apareceu a região Sudeste, com 50.297 toneladas (MPA, 2015). O sucesso da fauna aquática e regionalização da Aquicultura brasileira se deve aos mais de 8,5 milhões de quilômetros de litoral, clima favorável e dispondo de um quinto da reserva de água doce do planeta (Figura 1) (YFLAAR e OLIVEIRA 2003).

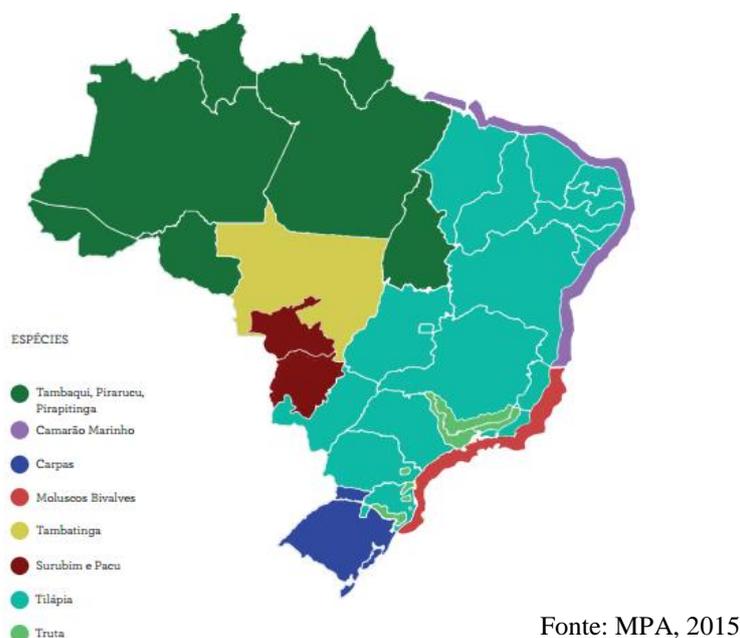


Figura 1: Regionalização da Aquicultura Brasileira e principais espécies cultivadas em cada região.

Em termos de consumo humano direto, no ano de 2014, a produção de peixes ultrapassou os capturados, em grande parte decorrente da redução de resíduos, bem como melhores equipamentos reduzindo capturas indesejadas e melhoria na gestão das pescas (FAO, 2014; AQUAFEED, 2015). O consumo global de peixe per capita aumentou de 9,9 kg em 1970 para 19,2 kg em 2015, embora as taxas variem substancialmente em algumas regiões (AQUAFEED, 2015; FAO, 2014). Entretanto, embora o Brasil concentre tantas características favoráveis, o consumo per capita de peixe, aumentou de 4 kg/ano para 10,63 kg/ano nos últimos anos, sendo baixo para os padrões exigidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). De acordo com a OMS é recomendado o consumo per capita de 12 kg de peixe por ano por habitante. A média global de consumo per capita é de 18 kg/ano, porém a média para a América Latina e Caribe é de 9kg/ano (FAO, 2014).

O setor de aquicultura vem demonstrando avanços no aumento da produção de pescado no mundo. E a FAO em projeção na publicação *Fish to 2030* estima que em 2030 a aquicultura será responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado para consumo humano (FAO, 2014). Assim, mostra o contínuo crescimento da aquicultura como sendo a maior atividade responsável por atender a demanda de pescado em nível mundial. Porém para a produção aquícola continuar neste ritmo é necessário que entraves para desenvolvimento total da atividade sejam solucionados.

O gargalo da produção de peixes e camarões está na fase de larvicultura das espécies para proporcionar um bom desenvolvimento inicial das larvas (TESSER *et al.*, 2005; AYRES, 2006). Estes alimentos podem ser na forma de alimento vivo (náuplios, larvas, zooplâncton ou larvas de outros peixes), líquido, encapsulado, biomassa congelada ou ração balanceada, porém o alimento vivo vem mostrando maior eficácia há décadas (LOPES *et al.*, 2007).

2.2. Uso de alimento vivo na Aquicultura

Na larvicultura, a alimentação inicial das espécies tem sido o fator determinante para o bom desenvolvimento inicial das larvas (TESSER *et al.*, 2005; AYRES, 2006), sendo esta alimentação inadequada, poderá ocasionar elevadas taxas de mortalidade e redução nos parâmetros de desenvolvimento (NASCIMENTO, 1989; HUNG, 1989). As larvas da maioria das espécies de peixes e camarões aceitam ou não as dietas artificiais, porém muitas não conseguem apresentar índices de crescimento satisfatórios. Assim, a maioria das larvas dependem da disponibilidade de organismos vivos para apresentar um ótimo desenvolvimento (HUNG, 1989).

Kubitza (1997) descreveu a importância do alimento vivo na fase de larvicultura, e que os peixes em ambientes naturais conseguem balancear suas dietas, escolhendo itens que melhor supram suas exigências. Porém, quando o cultivo é realizado em cativeiro, há necessidade de selecionar um alimento que satisfaça estas exigências. Isto se dá pelo fato do alimento natural contribuir com alto teor proteico e nutrientes essenciais para o crescimento e sobrevivência, uma vez que, as larvas dos organismos aquáticos não possuem sistemas digestório e enzimático completamente desenvolvidos. Desta forma, a disponibilidade de alimentos vivos com alto valor nutritivo, característica da maioria dos organismos planctônicos, é de grande importância para assegurar êxito nestes parâmetros durante a fase inicial (FURUYA *et al.*, 1999).

De acordo com Lopes *et al.* (1996), para a utilização de alimento vivo em cultivo de larvas de animais aquáticos, existem duas restrições básicas: qual espécie é a mais indicada na alimentação e como realizar a cultura destas espécies propriamente ditas. Assim, pesquisadores vêm realizando experimentos que busquem dietas naturais que supram as exigências nutricionais desde os primeiros dias de vida para organismos aquáticos e, o uso de náuplios de *Artemia* na larvicultura vem trazendo bons resultados de desempenho e sobrevivência das larvas de várias espécies (DANIELS & HODSON, 1999; JOMORI, 1999; TESSER *et al.*, 2005). Porém, um dos grandes problemas da utilização dos náuplios de *Artemia* (animal de água salgada) na larvicultura de água doce, é a falta de sucesso em cultivos de animais dulcícolas, uma vez que devido ao choque osmótico, o animal morre, não se tornando atrativo para o organismo cultivado por um período prolongado. Portanto,

são necessárias pesquisas que busquem alimentos vivos dulcícolas que supra a demanda em larviculturas de água doce. Nessa mesma linha, outro problema é a quantidade do produto no mercado, pois a produção de cisto, dependente das variações ambientais (CÂMARA, 2000). A utilização do zooplâncton, como rotíferos, copépodos e cladóceros na larvicultura intensiva também é citada na literatura (TAKATA, 2007; HAMRE *et al.*, 2002). Este pode ser obtido de maneira natural através da fertilização dos viveiros (HAMRE *et al.*, 2002; AYRES, 2006) ou produzidos em laboratório (SIPAÚBA-TAVARES, 2004). Mas pesquisas sobre sua utilização na larvicultura intensiva não tem demonstrado resultados satisfatórios, uma vez que pode ocorrer predação por esses organismos a larvas de peixes, o teor nutricional para algumas espécies pode ser variável e a possibilidade do zooplâncton e de seus metabólitos piorar a qualidade da água exigirá maior cuidado com a limpeza e manutenção dos tanques de criação (JOMORI *et al.*, 2003; AYRES, 2006; TESSER *et al.*, 2013).

Outra fonte de alimento vivo é o fitoplâncton que é de importância tanto nas fases iniciais como na engorda de alguns peixes e camarões marinhos. A produção em massa de organismos planctônicos, utilizados como alimento na fase larval, a qual é considerada o período crítico (GERKING, 1994), vem sendo indicada como o procedimento mais adequado para proporcionar melhores índices de crescimento e sobrevivência destes, já que o plâncton é de alto valor nutritivo, rico em proteínas e nutrientes essenciais (LUBZENS *et al.*, 1984; LUBZENS *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1993; SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 1994; PORTELLA *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1998; FURUYA *et al.*, 1999). Entretanto, em excesso o fitoplâncton causa depleção de oxigênio dissolvido juntamente com bactérias decompositoras aeróbias prejudicando a respiração dos organismos presente no meio (SÁ, 2012).

Em busca de alternativas para melhorar a sobrevivência e crescimento de animais aquáticos nas fases iniciais e engorda, estudos vem sendo desenvolvidos com a espécie *Denrocephalus brasiliensis*. Este microcrustáceo de água doce pode ser mais uma importante fonte alternativa de alimento de larvas e alevinos das diversas espécies de peixes carnívoros, pois também possui valores protéicos similares e/ou superiores aos de outros organismos utilizados em grande escala na larvicultura mundial (LOPES *et al.*, 1998).

2.3. Generalidades da espécie em estudo *Dendrocephalus brasiliensis* (PESTA, 1921)

O filo Arthropoda constitui um grande grupo do reino animal composto por 5 subfilos, na qual encontra-se o subfilo Crustacea. De formas aquáticas e vidas livre, este subfilo possui a classe Branchiopoda, que é composta por 4 ordens, sendo uma delas a ordem Anostraca. A fauna dos anostracas é composta por 258 espécies e 7 subespécies organizada em 21 gênero, registrados

mundialmente até 31 de dezembro de 1993. O gênero dominante é o *Streptocephalus*, seguido por *Chirocephalus* com 58 e 43 espécies descritas, respectivamente. Em sequência tem-se *Branchinecta* (35 espécies) e *Branchinella* (33 espécies) (BELK & BRTEK, 1995; RUPPERT, 2005). São confirmadas 8 famílias, na qual a maior parte, cinco delas se encontram na região Neotropical, são elas: *Artemidae*, *Branchinectidae*, *Streptocephalidae* e *Thamnocephalidae*. Nesta região, os estudos são limitados pela vasta área ainda a ser explorada, mas acredita-se que deverá existir um maior número de famílias (LOPES, *et al.*, 1998).

Outro gênero da ordem anostraca é o *Dendrocephalus* e se encontra distribuído entre as espécies *Dendrocephalus geayi*, *D. spartaenova*, *D. venezuelamus* e *D. affinis*, na Venezuela (PEREIRA, 1983, 1984); *D. argentinus*, na Argentina e países limnítrofes (PEREIRA & BELK, 1987); *D. conosuris*, em Venado Tuerto, província de Santa Fé na Argentina (PEREIRA; RUIZ, 1995); *D. goiasensis*, na região Centro-Oeste do estado de Goiás, Brasil (RABET; THIERY 1996) e *D. brasiliensis*, em que a ocorrência vai da Argentina ao estado do Piauí, no Brasil (CÉSAR, 1989, apud LOPES, 2002). A classificação sistemática da espécie *D. brasiliensis* é (BOWMAN & ABELE, 1982):

Reino: Animalia

Filo: Crustacea (Pennant, 1777)

Classe: Branchiopoda

Subclasse: Sarsostraca (Tasch, 1969)

Ordem: Anostraca (Sars, 1867)

Família: Thamnocephalidae (Simon, 1886)

Gênero: *Dendrocephalus* (Latreille, 1817)

Espécie: *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

O primeiro registro do gênero *Dendrocephalus* ocorreu no nordeste brasileiro pelo médico Dr. Adolfo Lutz em 1928, no município de Macaíba, estado do Rio Grande do Norte, cuja cor brilhante, fez com que Lutz, o reconhecesse como uma nova espécie, a *D. ornatus* (LUTZ, 1929). Entretanto, foi verificado que esta espécie, era na verdade *D. brasiliensis*, que o pesquisador Otto Pesta havia coletado em 1921 nos estados da Bahia e Piauí. Em outros estados, como no Ceará, foram coletados exemplares no rio Jaguaribe. Atualmente, a espécie é encontrada em regiões do

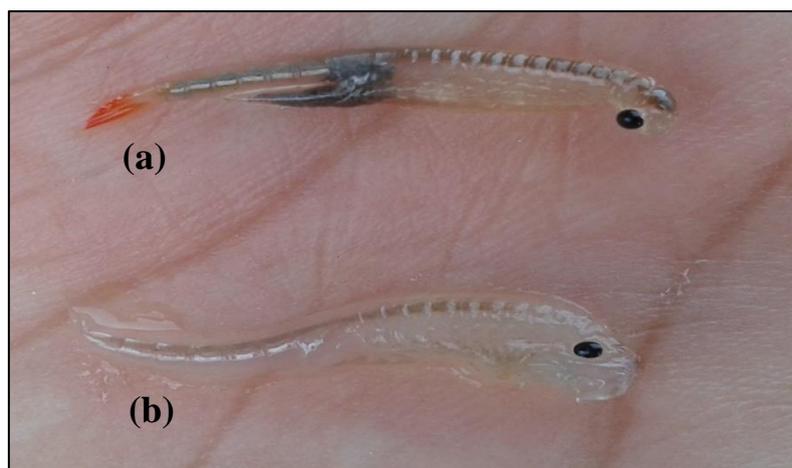
interior do estado do Rio Grande do Norte, devido ao clima favorável e estação climática bem definidas (LOPES, 2007).

Popularmente conhecida como branchoneta, camarãozinho ou artêmia de água doce, a espécie *Dendrocephalus brasiliensis* (Fig. 2) é um microcrustáceo dulcícola. Um animal de fácil identificação (fêmea e macho) (Fig. 3a e 3b), formam cistos (ovos), apresenta grande atratividade e atende os requerimentos nutricionais de espécies de peixes carnívoros, ornamentais e camarões valorizando a sua grande importância como alimento natural (LOPES *et al.*, 1998; ZANANDREIA, 2010). Possui um ciclo reprodutivo bastante curto, mas não se sabe ao certo o tempo de vida deste organismo. Porém na ausência de predação e enquanto houver disponibilidade de alimento, há relatos de sobrevivência de até quatro meses com produção contínua de cistos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL

Fig. 2: Espécie *Dendrocephalus brasiliensis* em fase Juvenil.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL

Fig. 3: Exemplar fêmea (a) e macho (b) na fase adulta.

A região Nordeste se destaca como uma das regiões do Brasil com grande potencial de exploração de *D. brasiliensis*, isto se deve à temperatura favorável e elevado número de ecossistemas temporários nesta região. Várias áreas com condições climatológicas e hidrológicas favorecem o desenvolvimento e a produção de cistos e biomassa de Branchoneta (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Esta habita tipicamente lagoas temporárias de água doce, poças, açudes e riachos formados durante a estação chuvosa em todo o Brasil. O ciclo de vida da branchoneta se resume em ovo (Fig. 4a), náuplio (Fig. 4b), juvenil (Fig. 4c) e adulto (Fig. 4d). A espécie se reproduz de forma sexuada, com a liberação de cistos, em condições ideais de temperatura em torno de 28° a 30°C, oxigênio dissolvido na faixa de 4 a 8 mg/L e pH entre 7.5 a 8.0 (dados adquiridos no Laboratório de Limnologia EAJ/UFRN em experimento realizado) além da abundância de microalgas na sua alimentação. O desenvolvimento da espécie é rápido, crescendo em torno de 1mm após o terceiro dia, chegando a aproximadamente 3,5cm com um mês de cultivo, em ambiente com elevada disponibilidade de alimento. As branchonetas apresentam alta capacidade de filtração, sendo a água de tanques de engorda e berçários de larviculturas, serem as melhores fontes para alimentação massiva para esses organismos (HIGA, 2015).

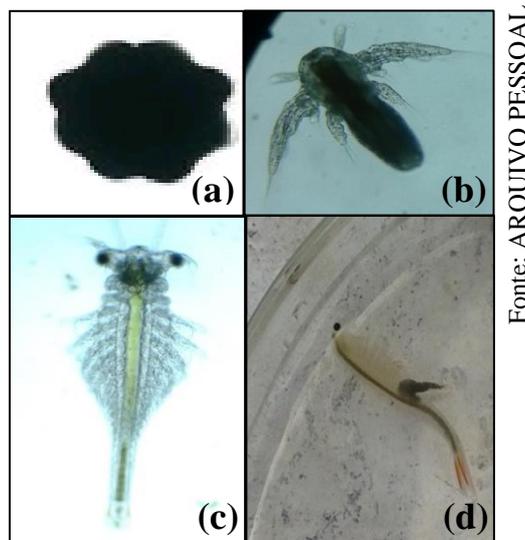


Fig. 4: Fases de vida de *Dendrocephalus brasiliensis*: Ovo (a), náuplio (b), jovem (c) e adulto (d).

Os machos apresentam coloração variando de branco a azul, sendo esta quando está em seu período reprodutivo; há presença de um apêndice vertical (Fig. 5a) na região da cabeça. Já as fêmeas apresentam coloração transparentes com caudas avermelhadas, e uma coloração marrom quando inicia seu período de reprodução, além da presença de um ovissaco (Fig. 5b), estrutura responsável para armazenar os cistos.

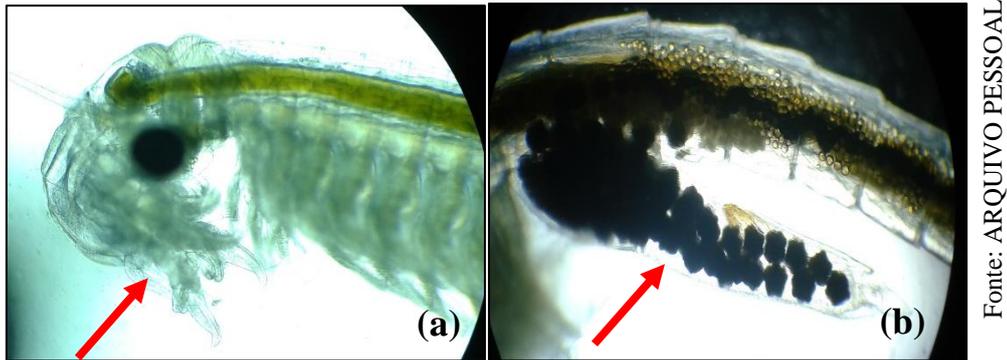


Fig. 5: Individuo macho com apêndices (a) e fêmea com ovissaco (b).

Na natureza, o aparecimento de adultos ocorre com 10 dias após a eclosão dos cistos, onde iniciam o seu período reprodutivo (reprodução sexuada) para desova de novos ovos. Durante o período de chuvas, ocorre a hidratação dos cistos que eclodem na forma de náuplios, estes são parecidos em formato com náuplios de artêmia (Fig. 6a e 6b). Os ovos que são liberados pelas fêmeas vão para o fundo, e precisam desidratar na estação seca para garantir a continuidade da espécie na próxima estação chuvosa (HIGA, 2015). Diferentemente das *Artêmia sp.*, que se reproduzem por ovoviviparidade (liberação de náuplios) em condições tolerantes e oviparidade (liberação de cistos) quando o ambiente está desfavorável ao crescimento da espécie, as branchonetas apenas se reproduzem por oviparidade (LOPES, 2002; IGARASHI, 2008).

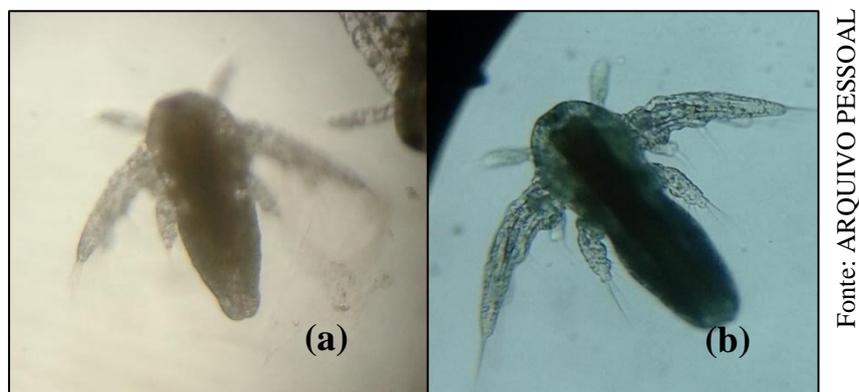


Fig. 6: Náuplio de Artêmia (a) e de Branchoneta (b) após 24 horas da eclosão.

A branchoneta possui hábito gregário, formando aglomerados de indivíduos, nadando em todas as direções, e muitas vezes no sentido vertical de cabeça para baixo, em outras nadam sobre o próprio dorso com os filopódios para cima. São organismos que apresentam telotaxia ventral, ou seja, nadam em direção a luz no ambiente em que se encontram. Por isso, a visualização dos náuplios, após a eclosão é facilitada por esta atração luminosa, quando é colocado luz em um único ponto e os indivíduos se direcionam para esse foco (LOPES, 2007).

O interesse por este animal e especificamente sua utilização na aquicultura, teve início quando foi testado como alimento vivo para *Astronotus ocellatus*, *Lophiosilurus alexandre* e *Cichla ocellaris* em pesquisas desenvolvidas por Lopes (1998), que verificou um incremento no crescimento e sobrevivências superiores a 200% quando comparados com outros alimentos convencionais a exemplo de peixes e rações balanceadas.

Em estudos por Lopes *et al* (2007), a branchoneta e o anelídio enquitréia (*Enchytraeus albidus*) foram utilizados na alevinagem do niquim (*Lophiosilurus alexandri*) sendo observado diferença significativa no comprimento, com uma grande superioridade para o tratamento com biomassa de branchoneta. Carneiro *et al* (2004), avaliou a Branchoneta, seca e triturada como atrativo na ração comercial oferecida a alevinos de tucunaré (*C. ocellaris*), e mostrou-se pouco eficaz como atrativo e baixo condicionamento alimentar de alevinos de tucunaré para o consumo de ração comercial. Porém, Moura *et al* (2000) relata à hipótese de que devido ao hábito alimentar carnívoro, o tucunaré não aceitaria voluntariamente dietas secas. Outras pesquisas mostram bons resultados de desempenho, metamorfose, crescimento em peso e comprimento e sobrevivência com introdução de Branchoneta na forma congelada na alimentação de larvas e pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* (YFLAAR; OLIVEIRA, 2003). Lopes *et al.*, (2007) realizou experimento testando ração floculada e branchoneta na alimentação das espécies *Astronotus ocellatus* (apairi) e *Pterophylum scalare* (acará bandeira). Para ambas as espécies a branchoneta apresentou resultados satisfatórios na sobrevivência, comprimento e peso médio, ficando claro a importância da branchoneta como alimento vivo para peixes ornamentais.

A espécie *Dendrocephalus brasiliensis* apresentam, em média, 67,05% de proteína bruta e comprimento médio de 3,5cm, superando os da *Artêmia sp.*, com valores médios de 61,6% e 11,0 mm, respectivamente (SILVA, 2000; LOPES, 2007). Portanto, o seu alto valor nutricional, atratividade para os organismos aquáticos (peixes e camarões), bons resultados na introdução na forma de alimento vivo e congelado foi percebido a possibilidade de realizar a produção deste microcrustáceo em pequenas escalas. Em 2010 foi iniciada a produção de branchoneta para ofertar a peixes ornamentais em um estabelecimento comercial situado em Mogi das Cruzes, São Paulo a partir de um projeto coordenado por Fábio Higa, Engenheiro de pesca. Resultados obtidos ao final de 2012, mostraram que as branchonetas proporcionaram uma ótima taxa de crescimento para alevinos de peixes ornamentais, principalmente carnívoros nacionais e importados, comercializados no Brasil.

As branchonetas se enquadraram na alimentação de organismos aquáticos e se tornaram alvos de novas pesquisas como incremento para toda a cadeia da aquicultura continental, piscicultura e carcinicultura. A possibilidade de melhorar o cultivo de *D. brasiliensis* utilizando a

água de rejeito (drenagem), o desenvolvimento de estratégias de eficiência de liberação e eclosão do cisto são objetivos a serem atingidos para atender a demanda do setor aquícola de forma sustentável (HIGA, 2015).

Assim, a branchoneta vem se tornando um alimento viável e de alto teor proteico para a aquicultura, porém com alguns entraves relacionados a eclosão de cisto e a sua produção, que limitam a sua produção e dificultam o desenvolvimento desta atividade entre os produtores aquícolas.

2.4. Uso de diferentes métodos para eficiência de eclosão de cistos de anostraca

A grande maioria dos crustáceos da ordem Anostraca, adaptado à vida em ambientes aquáticos temporários, evoluíram para ciclos de vida curtos e fases de latência resistentes a dessecação, sob a forma encapsulada, chamados de cistos ou ovos (BERNICE, 1972). Para estes organismos reiniciarem o ciclo precisam hidratar seus cistos para posterior eclosão. Porém, a eclosão ocorre de forma parcelada e desigual e o período de eclosão dependerá de cada espécie.

Os diferentes aspectos da biologia dos anostracas, o estudo de eclosão e desenvolvimento tem atraído a atenção de poucos pesquisadores. Portanto, o efeito da secagem e limpeza sobre a eclosão dos ovos/cistos tem sido uma das abordagens a ser investigada (HAY & HAY, 1889; BOND, 1934; DEXTER, 1946). Poucos estudos relatam a importância de metodologias para melhorar a eficiência de eclosão destes cistos, sendo os trabalhos mais recentes relatados por Lopes *et al.*, (2007) e Pereira & Neto (2010), este com o uso de produtos químicos.

Os ovos de anostracas podem ser de dois tipos, estes podem se desenvolverem sem secagem e em condições de dissecações a temperaturas extremas do meio (COTTARELLI, 1966). Os cistos de microcrustáceos são do tipo que resistem a dessecação e a temperaturas externas e voltam a sua forma ativa quando no ambiente as condições são favoráveis para eclosão e desenvolvimento do náuplio. Castle (1938) e Avery (1939) registraram a eclosão dos ovos da espécie *Eubbranchipus vernalis* depois de permanecer na água durante um ano. Hall (1953) fez observações sobre a eclosão dos ovos de *Chirocephalus diaphanus* em relação à temperatura, profundidade e secagem.

Bernice (1972), relata a influência da secagem na eclosão, onde em experimento relatou que ovos coletados e imersos em água destilada sem secagem não eclodem, sendo necessário um período de quatro meses de dormência após o procedimento de secagem. Já os ovos desidratados imersos em água destilada eclodem mais cedo e em maiores percentuais (MOORE, 1957; BAQAI, 1963; BERNICE, 1972). Hall (1953) e Pai (1958) descobriram que os ovos eclodem mais rápido em

água de lagoa do que em água destilada. Outros experimentos como o de Lake (1969) não demonstraram taxas de eclosões significativas usando água da torneira envelhecida (água dormida) para a eclosão de *Chirocephalus diaphanus*.

Para a Artêmia, a eclosão dos náuplios depende absolutamente de fatores físico-químicos durante o período de incubação, tais como temperatura (25-35°C), salinidade (15-35 ppt) e pH (em torno de 8,0) (LAVENS; SORGELOOS, 1996). Condições ideais para produção de náuplios de *D. brasiliensis* são descritas por Lopes (2007), na qual os cistos devem ser de boa procedência, 12 horas de pré-hidratação seguido de uma desidratação e incubação por 24 horas com a temperatura da água entre 26 a 30°C, pH em torno de 8,0 e luminosidade de 1500 lux, sendo esta variável indispensável para ativação do processo enzimático de eclosão. Entretanto, em experimentos realizados no laboratório de Limnologia da Escola Agrícola de Jundiá (UFRN) mostraram que a eclosão de *D. brasiliensis* ocorre de maneira mais simples, com a coleta, limpeza e secagem dos cistos, estes após secos devem passar por um período de dormência de 10 dias com a eclosão dos cistos em 48 horas com condições ideais temperatura (26 – 30 °C) e pH (7 – 8,5).

Os aspectos bioquímicos que envolvem a quebra do estado de dormência de cistos é verificado por Dumont *et al.*, (1992), na espécie de água doce, *Thamnocephalus platyurus*. Este autor utilizou o Ácido Retinóico como um agente morfogênico e uma fonte de íon Cálcio (Cálcio Inofórico) na reativação do cisto. Na qual testou a influência individual, e conjunta, destes reagentes, a uma mesma concentração, $0,5 \times 10^{-7}$ M (Molar). A influência do ácido Ascórbico e íons Cálcio na eclosão de *Dendrocephalus brasiliensis* foi verificada por Pereira & Santos-Neto (2010). Em dois experimentos, o primeiro foi testado a influência da concentração de ácido ascórbico (AA) na eclosão dos náuplios, para uma concentração constante de hidróxido de cálcio (HC) e o segundo, avaliou a influência da concentração dos íons Ca^{+2} , do HC, para uma mesma concentração de AA obtida do primeiro experimento. Os resultados mostraram que os dois produtos químicos apresentam uma forte influência na aceleração e eficiência de eclosão de cistos na espécie proposta.

Trabalhos têm buscado diversas técnicas na eficiência de eclosão dos náuplios de Anostracas e poucos envolvem metodologias que descrevam a atividade enzimática. Portanto, reduzidos estudos são descritos nesta linha de pesquisa necessitando novas buscas.

2.5. Quitina

O termo “quitina” é derivado da palavra grega “khitón”, que significa carapaça ou caixa de revestimento, uma vez que sua função na natureza é de revestimento e proteção de invertebrados

(ROSA, 2008). Este polímero, foi isolado por Braconnot em 1881, trinta anos antes do isolamento da celulose, mas a falta de conhecimento básico sobre suas propriedades, incluindo a reatividade química, limitou severamente suas aplicações industriais até o início dos anos 1970 (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007).

A quitina é um polissacarídeo encontrado em mais de 300 fontes comerciais de diferentes animais, constituindo o exoesqueleto de insetos, carapaça de crustáceos, em concha de moluscos, diatomáceas, fungos, bactérias e insetos. Este polímero é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos pois apresenta microestrutura predominantemente cristalina e a inviabilidade de dissolução um dos maiores problemas relacionado ao seu uso. Estruturalmente, é semelhante à celulose (Figura 7a e 7b) substituindo-se os grupos OH do carbono-2 de cada unidade glicosídica da celulose por grupos acetilados (-NHCOCH₃). Logo, a quitina é um polissacarídeo linear contendo cadeias de resíduos β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. A quitina é descrita como o biopolímero mais abundante da natureza depois da celulose. (THARANATHAN, *et al.*, 2003; ANTONINO, 2007).

Fonte: CAMPANA FILHO, 2007

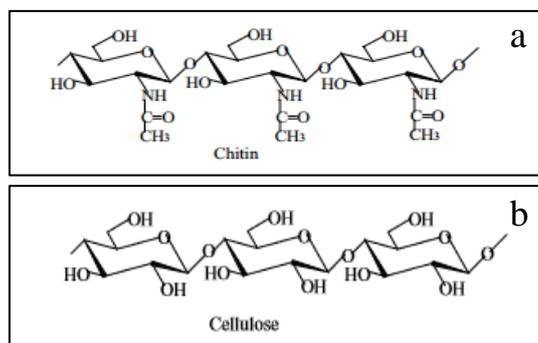


Figura 7: Estrutura da quitina (a) e celulose (b).

A quitina pode ocorrer em três formas, α , β e γ (Figura 8), dependendo de sua estrutura. A forma α é a mais abundante, estando presente em estruturas rígidas e resistentes como parede celular de fungos, krill, lagostas, tendões e carapaça de caranguejos, cascas de camarão e cutículas de inseto. A forma β - e γ -quitina é a mais rara, encontradas em estruturas menos rígidas, porém mais resistentes, apresentando grau de cristalinidade de aproximadamente 72% (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007). É ainda encontrada no esqueleto calcário de alguns organismos marinhos (microalga, *Thalassiosira fluviatilis*, por exemplo), ou onde uma certa flexibilidade é necessária, como nos gládios dos cefalópodes (TOLAIMATE *et al.*, 2000). A β é mais reativa que a α , sendo esta uma importante propriedade relacionada às transformações enzimáticas e químicas da quitina (RINAUDO, 2006).

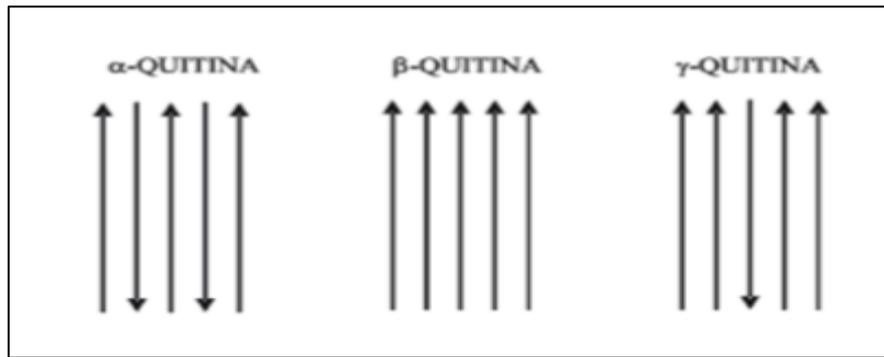


Figura 8: Representação das estruturas de quitina, na qual as setas representam as cadeias poliméricas no sentido terminal não-redutor.

Este polissacarídeo apresenta características interessantes para aplicações biotecnológicas e biomédicas (CAHÚ, *et al.*, 2012). Portanto, pesquisas que envolvam a quitina têm sido desenvolvidas e demonstrado a presença deste polissacarídeo nos cistos de Artêmia, que pode ser hidrolisada pela enzima quitinase, degradando-a e resultando na produção de oligômeros e monômeros de N-acetilglicosamina (PARISER; LOMBARDI, 1989; PAGEL, 1999; BARATTO, 2005, ULHOA; PEDERBY, 1991). Outros estudos estimam a produção deste polímero em machos, fêmeas e cistos em alguns crustáceos da ordem anostraca. Os níveis de quitina variam de fêmea para macho nos estágios de juvenis, sendo nos machos geralmente encontrados os maiores valores; e entre juvenis e adultos (Tabela 1) (CAUCHIE, *et al.*, 1997).

Tabela 1: Quitina de cistos, juvenis e adultos de espécies de anostracas.

Species	Sex or developmental stage	n	Chitin content (mg chitin (g dry mass) l
<i>Streptocephalus dichotomas</i>	males	3	29.2 ± 2.0
	females	3	26.8 ± 7.2
	adults (males = females)	6	28.0 ± 4.9
<i>Streptocephalus proboscdeus</i>	males	4	22.7 ± 6.2
	females	3	19.3 ± 2.2
	adults (males = females)	7	21.2 ± 4.9
<i>Streptocephalus simplex</i>	males	3	32.7 ± 2.7
	females	3	31.2 ± 2.2
	adults (males = females)	6	32.0 ± 2.4
	larvae	2	13.7 ± 4.4
<i>Streptocephalus torvicornis</i>	adults (males = females)	2	21.3 ± 0.2
<i>Tramnocephalus platyurus</i>	males	4	25.7 ± 2.3
	females	5	25.4 ± 1.6
	adults (males = females)	9	25.6 ± 1.8

Continuação da Tabela 1: Quitina de cistos, juvenis e adultos de espécies de anostracas

	cysts	1	11.4
<i>Dendrocephalus</i>	males	3	14.9 ± 0.6
	females	3	15.1 ± 1.1
	adults (males = females)	6	15.0 ± 0.8
<i>Chirocephalus diaphanus</i>	males	4	21.0 ± 1.3
	females	5	11.3 ± 1.9
	adults (males = females)	9	14.5 ± 7.1
<i>Artemia salina</i>	males	3	21.0 ± 2.6
	females	3	9.2 ± 0.9
	adults (males = females)	6	15.1 ± 6.7
	larvae	3	5.6 ± 0.7
	cysts	3	18.0 ± 1.5
<i>Branchipus schaefferi</i>	males	3	21.3 ± 4.9
	females	3	15.1 ± 2.7
	adults (males = females)	6	18.2 ± 4.9

Fonte: CAUCHIE, *et al.*, 1997

Em cistos, os níveis de quitina variam de 5.6-18.0 mg quitina (g de massa seca) nos anostracas. Para as espécies *Thamnocephalus platyurus* e *Artemia salina* o teor de quitina nos cistos é de 11.4 mg e 18.0 ± 1.5 respectivamente (Tabela 2) (CAUCHIE, *et al.*, 1997). Assim, o baixo teor de quitina de cistos de anostracas reflete a localização da quitina, que é apenas encontrado na cutícula do embrião e na membrana cuticular interior do cisto (FUNKE & SPINDLER, 1987). Poucos são os estudos relacionados aos níveis de quitina nos cistos em espécies de crustáceos, entretanto, sabe-se da existência deste polímero na composição dos ovos.

2.6. Enzimas

Enzimas são proteínas essenciais que atuam como catalizadores biológicos e são produzidas por células, estimulando ou desencadeando reações químicas importantíssimas para a vida, que dificilmente se realizam sem a presença delas. A sua descoberta reporta-se ao início do século XIX e avanços em experimentos iniciais sobre as enzimas foi a partir do isolamento e a cristalização da uréase, em 1926, por James Sunner. Em estudo, Sunner, descobriu que os cristais de uréase consistiam inteiramente de proteína, então relatou que todas as enzimas seriam proteínas. Porém, somente em 1930, com o incremento de novas pesquisas, com a cristalização da pepsina, tripsina, e outras enzimas digestivas, a ideia de James foi completamente aceita (CUNHA-SANTINO, 2003; LEHNINGER, 2008).

As enzimas atuam como catalizadoras a altas velocidades em condições de baixa necessidade energética. A sua atividade catalítica depende da integridade de sua conformação proteica nativa. Portanto, as estruturas protéicas primária, secundária, terciária e quaternária são essências para a sua atividade. Para serem ativadas, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além dos seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem componentes químicos adicionais chamados de cofatores. Um cofator pode ser um ou mais íons inorgânicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica complexa chamada de coenzima (AEHLE, 2004; VIEIRA, 2013; JUNIOR, 2014).

Esses biocatalizadores orgânicos são produzidos pelas células, mas podem evidenciar a sua atividade intra ou extracelular. A característica principal da ação enzimática sobre o organismo é a sua especificidade. Cada tipo de enzima atua sobre um composto ou substrato associado, cuja estrutura deve se encaixar à enzima de modo que os centros ativos coincidam perfeitamente (modelo chave-fechadura). O complexo enzima-substrato, modelo proposto por Adolphe Wurtz em 1880 foi fundamental para a ação das enzimas, tornando-se o ponto de partida para os tratamentos matemáticos que definem o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas, como também as descrições teóricas dos mecanismos enzimáticos (LEHNINGER, 2008; AEHLE, 2004; JUNIOR, 2014).

As enzimas apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos ou inorgânicos e sua grande utilidade ocorre pela ampla gama de substratos que as enzimas atuam, e reações complexas que as enzimas catalisam em rotas onde a geração de resíduos e subprodutos é reduzida. E é devido a sua ação como catalisador, que as enzimas possuem também importância em vários setores, produtivos, dentre os quais destacam-se a indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, limpeza e de química, ainda no tratamento de efluentes e produção de biodiesel (DEVAUX-BASSÉGUY *et al*, 1997; LEHNINGER, 2008). O mercado de utilização de enzimas como ferramentas biotecnológicas está em ampla expansão e atualmente é estimado em U\$\$ 2,3 bilhões. Dentre estas enzimas tem-se as quitinases.

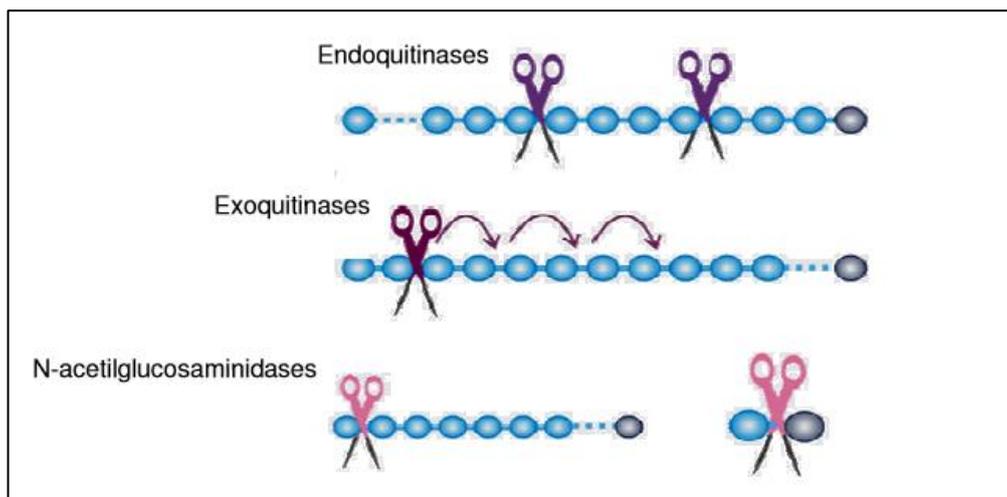
2.6.1. As Quitinases

O conjunto de enzimas envolvidas na degradação da quitina é denominado quitinase. Estas estão presentes em uma gama de organismos, inclusive os que não contêm quitina, tais como bactérias, vírus, plantas e animais desempenhando importantes papéis fisiológicos e ecológicos (GODONE, 2011). As quitinases são endoglicosil-hidrolases que clivam de forma específica as

ligações O-glicosídicas da quitina, entre os carbonos C1 e C4 dos resíduos de β -1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc).

As quitinases estão distribuídas por entre três numerosas famílias das 90 existentes de glicosil-hidrolases, 18, 19 e 20 que diferem em relação às suas estruturas primárias e terciárias (HENRISSAT, 1991) e ao mecanismo de catálise (KOGA, *et al.*, 1999). As quitinases da família 18 são encontradas em vírus, bactérias, fungos filamentosos ou leveduriformes, plantas e animais superiores. Formam produtos β -anoméricos, através de um mecanismo de retenção. Enquanto as enzimas da família 19 são quase que exclusivas de plantas e formam produtos α -anoméricos, por um mecanismo de inversão (SINNOTT, 1990; PERRAKIS *et al.*, 1994). Esta família apresenta um domínio catalítico em forma de estrutura bilobada e presença de α -hélices. A família 20 consiste em N-acetil- β -D-hexosaminidase ou N-acetil- β -D-glucosaminidases de bactérias, fungos e seres humanos (HORSCH *et al.*, 1997; KITTL & WITHERS, 2010; SEIDL, 2008).

As quitinases podem ainda ser classificadas, quanto ao seu modo de ação sobre o substrato. Assim as enzimas se classificam em dois grupos: as endoquinases, que catalizam a hidrólise randômica de ligações β -1,4 de N-acetilglucosamina (GlcNAc) liberando produtos solúveis como quitotetraoses, quitotriose e diacetilquitobiose; e as N-acetilglucosaminidases, conhecidas como exoquinases, que clivam a quitina em monômeros N-acetilglucosamina. Ainda dependendo do seu padrão de clivagem, as quitinases podem ser divididas em: endoquitinases, exoquitinases e N-acetil- β -D-glucosaminidases. As endoquitinases clivam as ligações β -1,4 da quitina em qualquer ponto da cadeia polimérica liberando oligossacarídeos de vários tamanhos. Já as exoquitinases atuam na porção não-redutora da cadeia e seus produtos são geralmente dímeros de N-acetil- β -glucosamina (GlcNAc)₂ (SAHAI; MANOCHA, 1993; SEIDL, 2008). As N-acetil- β -D-glucosaminidases hidrolisam componentes O-glicosídico, removendo resíduos terminais não-redutores de N-acetil- β -D-glucosamina, sendo considerada uma enzima exoglicosidase (HORSCH *et al.*, 1997) (Figura 9).



Fonte: GODONE, 2011, modificado de SEIDL, 2008

Figura 9: Padrões de clivagem de quitinases. Em azul claro são representadas as subunidades da cadeia de quitina e o açúcar redutor em azul escuro. As ações enzimáticas são mostradas em tesoura.

Diversos estudos apontam o papel fisiológico das quitinases. Nos insetos as quitinases estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento, ou seja, na regulação da síntese e degradação da quitina, que é o principal componente do exoesqueleto. Em crustáceos, estas enzimas são associadas a degradação parcial do exoesqueleto durante o desenvolvimento do animal, por um mecanismo que está sobre controle hormonal. Além do papel no desenvolvimento, as quitinases também exercem o papel de defesa contra patógenos em outros invertebrados (GODONE, 2011; SPINDLER-BARTH, 1993). As quitinases ainda estão presentes em fungos e em alguns organismos que não apresentam quitina a sua constituição, como nematódeos, plantas e bactérias. Em fungos, estas enzimas parecem ser um fator primordial na colonização e predação para obtenção de alimentos (BISHOP *et. al.*, 2000). Já em nematódeos, as quitinases estão presentes na casca do ovo e contribuem na sua integridade.

Nas plantas, as enzimas estão associadas à defesa contra patógenos e fazem parte do grupo de proteínas denominadas PR (*Pathogenesis Related Proteins*), que são proteínas capazes de induzir a resistência local ou sistêmica ao ataque de fungos e outros fitopatógenos. Em bactéria com a do gênero *Streptomyces*, sua função está relacionada a nutrição. Dessa forma a hidrólise de uma variedade de quitinas encontradas na natureza permite o organismo utilizar esses polímeros como fonte de energia (COLLINGE *et. al.*, 1993; KUPIEC & CHET, 1998).

A quitinase isolada da bactéria *Streptomyces griseus* (E.C. 3.2.1.14) é um complexo de enzima extracelular com uma massa molecular de aproximadamente 30 kDa, que degrada quitina.

Foi detectado em muitos microrganismos e também no trato digestivo de muitos animais que se alimentam de organismos que contem quitina. A hidrólise enzimática da quitina a N-acetil D-glucosamina é realizada por duas reações enzimáticas consecutivas. O primeiro, chitodextrinase-quitinase é um poli (1,4-B- [2-acetamido-2-desoxi-D-glucosido]) - glicanohdrolase (CE. 3.2.1.14), que remove unidades de quitobiose da quitina. A segunda é a N-acetilglucosaminidase-chitobiase, que cliva os dissacarídeos a suas subunidades monoméricas, N-acetil D-glucosamina. A reação atua a uma temperatura ótima de 37 ° C (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA). Portanto, a quitinase comercial de *Streptomyces griseus* pode atuar na hidrólise da quitina presente nos cistos de microcrustáceos, modificando a estrutura do cisto, ou seja, levando a sua eclosão e consequentemente melhorando a eficiência de eclosão do naúplio, como também o uso de outros produtos químicos.

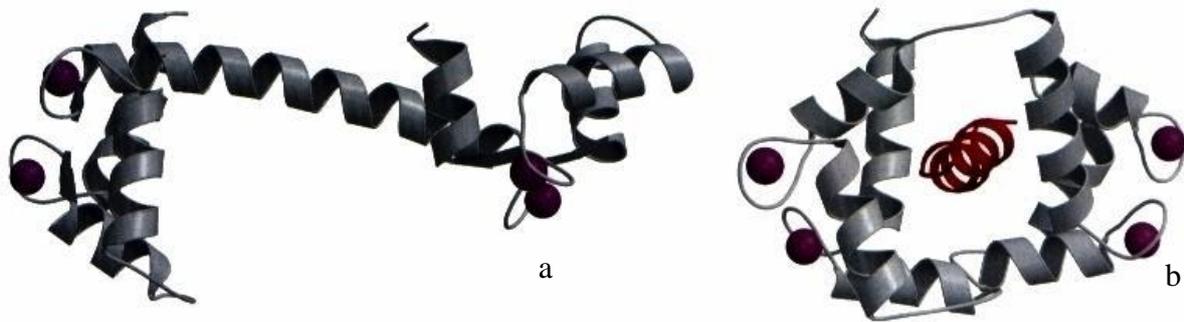
2.7.Hidróxido de Cálcio e Ácido Ascórbico

O Hidróxido de Cálcio (HC) conhecido também por Cal Hidratada é uma base forte, derivado do sal carbonato de cálcio encontrado na natureza, cuja a fórmula química é $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que libera íons de Ca^{+2} . As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação em íons cálcio (Ca^{++}) e hidroxila (OH^-). Portanto, o HC é um pó branco, que apresenta baixa solubilidade em água, elevado pH e é insolúvel em soluções como o álcool (FAVA; SAUNDERS, 1999; QUIDUTI, 2014).

Para a obtenção do hidróxido de cálcio, o carbonato de cálcio é aquecido a uma temperatura entre as faixas de 900 a 1200°C, por reação química. Este sal se dissocia em óxido de cálcio e gás carbônico ($\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$). A partir da hidratação do óxido de cálcio, obtém-se, então, o hidróxido de cálcio ($\text{CaO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{OH})_2$) (QUIDUTI, 2014)

Na eclosão, este produto químico funcionará na reativação dos cistos devido ao processo de desfosforilação de enzimas latentes, através da via calmodulina (proteína ácida capaz de ligação com íons de cálcio, extremamente conservada ao longo da escala zoológica e essencial para a atuação de diversos hormônios) (DUMONT *et al.*, 1992). A calmodulina apresenta quatro sítios ativos na qual se ligam os íons Ca^{+2} (Figura 10a). A ligação do cálcio à calmodulina, forma o complexo cálcio-calmodulina quinase II que permite que ela faça uma mudança conformacional, ativando-a e permitindo estimular uma variedade de enzimas (Figura 10b). Nos anostracas, a proteína calmodulina funciona como um ativador da maquinaria celular enzimática que está inativa durante o processo de dormência dos cistos (DUMONT *et al.*, 1992; LODISH *et al.*, 2014; NELSON E COX., 2014)

O ácido Ascórbico (vitamina C) é hidrossolúvel, essencial para a síntese de colágeno e reparação de tecidos (RUSSO; HOEFLER, 2013). Nos cistos, funciona como agente morfogênico, na diferenciação dos tecidos atuando no amadurecimento e desenvolvimento dos náuplios. Estes dois produtos são de fácil aquisição no mercado e de preço acessível e que apresentam influencia na aceleração e eficiência de eclosão do náuplio de microcrustáceos (DUMONT *et al.*, 1992; PEREIRA, D. C. & SANTOS-NETO, 2010).



Fonte: NELSON E COX., 2014

Figura 10: (a) Estrutura cristalina da proteína calmodulina e os quatro sítios de ligação de afinidade ocupados pelo cálcio (Púrpura). (b) Calmodulina associada com o domínio helicoidal (vermelho) da enzima quinase II dependente de calmodulina curvada sobre si mesma ao se ligar ao domínio helicoidal do substrato.

REFERÊNCIAS

3. REFERÊNCIAS

ANTONINO, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana. Dissertação de Mestrado para obtenção do título de mestre em Química. Universidade Federal da Paraíba. 89p. 2007.

AEHLE, W. Enzymes in Industry. Production and Applications. 515 p.

AVERY, J. L. Effect of drying on the viability of fairy shrimp eggs. Trans. Amer. Microsc. Soc. 58: 356. 1939.

AYRES, T. J. S. Produção de juvenis de *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) com dietas formuladas. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, Jaboticabal. 60p. 2006.

BAQAI, I. U. Studies on the postembryonic development of the fairy shrimp *Streptocephalus seali* RYDER. Tulane Stud. pool. 10 (2): 91-120p. 1963.

BARATTO, C. M. Caracterização de genes de Quitinases do Entomopatógeno e Acaricida *Metarhizium Anisopliae*. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 140p. 2005.

BELK, D. & BRTEK, J. Checklist of Anostraca. *Hidrobiologia*. 1995.

BERNICE, M. R. Hatching and Postembryonic Development of *Streptocephalus Dichotomus* Baird* (CRUSTACEA: ANOSTRACA). *Hydrobiologia*. v. 40-2. 251-278p. 1972.

BOND, R. M. Report on phyllopod crustacea, including a revision of the Anostraca of the Indian Empire. Mem. Conn. Acad. Arts and Sci. 10: 29-52. 1934.

BOWMAN, T. E; ABELE, L. G. Systematics, the fossil Record and Biogeography. Cap. I Editor Dorothy E. Bliss. 1982.

CAHÚ, T. B.; SUZAN, D. S.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTEC, S. F.; CARVALHO, L. B. JR.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry* 47: 570–577p.

- CÂMARA, M. R. Artemia no Brasil: do extrativismo ao cultivo. Revista Panorama da Aqüicultura, 10 (62): 15-19p. 2000.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. Química Nova. v. 30. n. 3. 644-650 p. 2007.
- CARNEIRO, M.D.O.S. Caracterização biológica e Reprodutiva de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) (Crustacea, Brachiopoda). Monografia de graduação do Curso de Engenharia de Pesca. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 39p. 2000.
- CARNEIRO, R. L.; SILVA, J. A. M.; ALBINATI, R. C. B.; SOCORRO, E. P.; NEVES, A. P. Uso de microcrustáceo (*Dendrocephalus brasiliensis*) na ração para Tucunaré. Rev. Bras. Saúde Prod. An. v. 5. n. 1. 18-24p. 2004.
- CAUCHIE, H. M.; MURUGAN, G.; THOMÉ, J. P.; DUMONT, H. J. Intra- and interspecific variation in the chitin content of some anostracans. Hydrobiologia 359: 223–228p. 1997.
- CASTLE, W. A. Hatching of the eggs of the fairy shrimp. Science, 87: 531. 1938.
- COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. Plant J. v. 3. 31-40p. 1993.
- COTTARELLI, V., Notizie suUa biologia di un Crostaceo Anostraco: *Chirocephalus stagnalis*. Archiv. Zool. It. 51: 1031-1052. 1966.
- CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. Quitosana: a fibra do futuro. Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC, Fortaleza, 1999.
- CUNHA-SANTINO, M. B. Atividade Enzimática, cinética e modelagem matemática da decomposição de *Utricularia breviscapa* da lagoa do óleo (Estação ecológica de Jataí, Luiz Antônio – SP). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. 2003.
- DANIELS, H. V.; HODSON, R. G. Weaning success of southern flounder juveniles: effect of changeover period and diet type on growth and survival. North American Journal of Aquaculture. v. 61, p. 47-50, 1999.

DEVAUX-BASSÉGUY, R.; GROS, P.; BARGEL. Journal Chem. Tech. Biotechnol. v. 68. 389-396 p. 1997.

DUMONT, H. J.; CASIER, P.; Manuswamy, N. & Walsche, C. De. Cyst hatching in Anostraca accelerated by retinoic acid, amplified by Calcium Ionophore A23187, and inhibited by Calcium-channel blockers. Hydrobiologia. 230: 1-7p. 1992.

DEXTER, R. W. Further studies on the life history and distribution of *Eubranchipus vernalis* (VERRILL) Ohio .7. Sci. 46: 31-44. 1946.

FAO. 2014. FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012. Disponível em:

<<ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>.> Acesso em: 26 ago 2015.

FAVA, L.R.G.; SAUNDERS, W.P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int. Dent. J., v. 32, n. 4, p. 257 – 282, Aug. 1999.

FUNKE, B. & K. D. SPINDLER. Developmental changes of the chitinolytic enzymes and ecdysteroid levels during the early development of the brine shrimp *Artemia*. In DECLEIR, W., L. MOENS, H. SLEGGERS, E. JASPERS & P. SORGELOOS (eds), *Artemia* Researchs and its Applications, Vol. 2, Physiology, Biochemistry, Molecular biology. Universa Press, Wetteren, Belgium: 67–78p. 1987.

FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M. Influência de plâncton, dieta artificial e sua combinação sobre o crescimento e sobrevivência de larvas de curimatá (*Prochilodus lineatus*). Acta Scientiarum v. 21(3). 699-703p. 1999.

GERKING, S. D. Larval feeding. In: Feeding of fish. San Diego: Academic Press. 336p. 1994.

GODONE, R. L. N. Isolamento de uma Quitinase extraída do cefalotórax do Camarão Marinho (BURKENROAD, 1936): Avaliação de suas atividades antimicrobiana e larvicida. Dissertação de mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). 2011.

HALL, R. E. Observations on the hatching of eggs of *Chirocephalus diaphanus* PREVOST. Proc. Zool. Soc. London 123: 95-10p. 1953.

HAMRE, K.; OPSTAD, I.; ESPE, M.; SOLBAKKEN, J.; HEMRE, G. I.; PITTMAN, K. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae fed natural zooplankton or *Artemia*. Aquaculture nutrition. v. 8. 139-148 p. 2002.

HAY, O. P. & HAY, W. P. A contribution to the knowledge of the genus *Branchipus*. Amer. Nat. 23: 91-95. 1889.

HAYASHI, C.; LIMA, A. F.; SOARES, C. M.; SEVERI, W.; TAKAHASHI, L. Estudo da alimentação natural das larvas de curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner (1882) (Prochilodontidae - Characiformes), em tanques de cultivo. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA. São Paulo. 97 p. 1993.

HENRISSAT, B. Sequence homology between a beta-galactosidase and some beta-glucosidases. *Protein Seq Data Anal.* v. 4. 61-62 p. 1991.

HORSCH, M.; MAYER, C.; SENNHAUSER, U.; RAST, D. M. B-N acetylhexosaminidase: A target for the Design of Antifungal Agents. *Pharmacol. Ther.* v. 76. 187-218. 1997.

HUNG, M. Ensayo de cultivo de una cepa de rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. *Revista Latinoamer. Aquicult.* v. 40. 83-112p. 1989.

JOMORI, R. K. Estudos sobre a alimentação de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), com náuplios de *Artemia* e a sua substituição por dieta artificial. (Monografia de graduação) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 1999.

JOMORI, R.K; CARNEIRO, D.J; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture*, 221. .277-287p. 2003.

JUNIOR, S. D. O. Produção de Enzimas de Fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 2014.

KITTL, R.; WITHERS, S. G. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research.* v. 345. 1272-1279p. 2010.

KOGA, C.; ADATI, N.; NAKATA, K., MIKOSHIBA, K.; FURUHATA, Y.; TEI, H.; SAKAKI, Y.; KUROKAWA, T.; SHIOKAWA, K.; YOKOYAMA, K.K. Characterization of a novel member of the family, XFGF-20, in *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res. Commun.* v. 261. 756-65p. 1999.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de peixes. Piracicaba: Ed. Franciscana, Brasil. 1997.

- KUPIEC, R. C.; CHET, L. The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol.* v. 9. 270-7. 1998.
- LAKE, P. S. The effect of temperature on growth longevity and egg production in *Chirocephalus diaphanus* PREVOST (Crustacea- Anostraca). *Hydrobiol.* 33: (3-4), 342-351p. 1969.
- LAVENS, P., SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Tech. Pap. 361, 295. 1996.
- LODISH, H., BERK, A., KAISER, C. A., KRIEGER, M., BRETSCHER, A., PLOEGGH, H., AMON, A. *Biologia Celular e Molecular*. Ed. Artmed. 7° ed. 1244p. 2014.
- LOPES, R.N.M. *et al.* Alimentação de larvas de surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (AGASSIZ, 1829) em laboratório na primeira semana de vida. *Boletim Técnico do CEPTA*. Pirassununga. v 9. 11-29 p. 1996.
- LOPES, J. P; SILVA, A. L. N; SANTOS, A. J. G; TENÓRIO, R. A. Branchoneta uma notável contribuição para larvicultura e alevinagem de peixes carnívoros de água doce. *Panorama da Aaquicultura*, v. 8 n. 50. 31-34p. 1998.
- LOPES, J.P. Produção de cistos e biomassa de Branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) em viveiros de cultivo. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 46p. 2002.
- LOPES, J. P. Dinâmica de reprodução e comportamento reprodutivo de Branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921 como incremento na produção de alimento vivo para peixes ornamentais. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia. 2007.
- LOPES J.P., GURGEL, H.C. B., GÁLVEZ A. O., PONTES, C. S. Produção de cistos de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). *Biotemas*, 20 (2): 33-39p. 2007.
- LOPES, J. P.; SILVA, T. A.; GOMES, D. S.; RANGEL, A. C. M. Utilização do anelídeo enquitréia *Enchytraeus albidus*, na alimentação do niquim *Lophiosilurus alexandri* durante a alevinagem inicial. *Rev. Brás. Eng^a. Pesca*, 2(1): 156-166p. 2007.

- LUBZENS, E.; ROTHBARD, S.; BLUMENTHAL, A.; KOLODNY, G.; PERRY, B.; OLUND, B.; WAX, Y. Farbstein, H. Possible use of *Brachionus plicatilis* (O. F. Muller) as food for freshwater cyprinid larvae. *Aquaculture*, v. 60. 143-155p. 1987.
- LUBZENS, E.; SAGIE, G.; MINKOFF, G.; MERAGELMAN, E. Schaneller, A. Rotifers (*Brachionus plicatilis*) improve growth rate of carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Bamidgeh*, v. 36(02). 41-46p. 1984.
- LUTZ, A. 1929. Dous phyllopodos, observados no Rio Grande do Norte. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 22. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761929000200001> Acesso em 21 nov 2015.
- MEDEIROS, J.E.S. Nutrição em larvicultura. Monografia de Especialização em Aquicultura. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 86p. 2003.
- MOORE, W. G. Studies on the laboratory culture of Anostraca. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 76: 159-173p. 1957
- MOORE, W. G. Factors affecting egg hatching in *Streptocephalus seali* (Branchiopoda: Anostraca) *Proc. Symp. on Crustacea, Part II*: 724-735p. 1967.
- MOURA, M. A. M.; KUBITZA, F.; CYRINO, J. E. P. Feed training of peacock bass (*Cichla ocellaris*). *Rev. Bras. Biol.* v.60. n.4. 645-654p. 2000.
- NASCIMENTO, V. M. C. Curvas de crescimento de *Moina micrura* Kurs, 1974 e *Ceriodaphnia silvestris* criadas em laboratório. *Bol. Téc. CEPTA*. v. 2(único). 53-59p. 1989.
- OLIVEIRA, A. G.; SILVA, M. D.C. O.; SANTOS, A.J. G. Reproductive potencial of *Dendrocephalus brasiliensis* and its use in *Litopenaeus vannamei* larval feeding. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 14p. 2000.
- OPUSZNSKI, K.; MYSZKOWSKI, L.; OKONIEWSKA, G.; OPUSZYNSKA, W.; SZLAMINSKA, M.; WOLNICKI, J.; WOZNIEWSKI, M. Rearing of common carp, grass carp, silver carp and bighead carp larvae using zooplankton and/or different dry feeds. *Polskie archiwum hydrobiologii*. v. 36. n. 2. 217-230p. 1989.
- PAGEL, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*. v. 401. 877-84p. 1999.

PAI, P. G. On the postembryonic stages of phyllopod crustaceans Triops (Apus) Streptocephalus and Estheria. Proc. Ind. Acad. Sci. 48: 229-250p. 1958.

PARISER, E. R. & D. P. LOMBARDI. 1989. Chitin sourcebook: a guide to the research literature: 1-688. (Wiley Publishing, Oxford).

PEÑA, M.R.; FERMIM, A.C.; LOJERA, D.P. Partial replacement of Artemia sp by the brackishwater cladoceran, *Diaphanosoma celebensis* (Stingelin) in the larval rearing of sea bass, Lates calcarifer (Bloch). Israel. J. Aquaculture. v. 50(1). 25-32p. 1998.

PEREIRA, G. Taxonomic importance of the frontal appendage in the genus Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae). J. Crust. Biol. v. 3. 293-305p. 1983.

PEREIRA, G. Two new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae). J. Crust. Biol. v. 4. 147-153p. 1984.

PEREIRA, G. & BELK, D. Three new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae) from central and South América. J. Crust. Biol. 7(3): 572-580. 1987.

PEREIRA, G; RUIZ, L. A new species of Dendrocephalus (Anostraca: Thamnocephalidae) from Argentina. Crustaceana. v. 68. 567-574p. 1995.

PEREIRA, D. C. & SANTOS-NETO, M. A. Influência do Ácido Ascórbico e dos Íons Ca^{+2} na eclosão de cistos do Anostraca Branconeta (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921). Rev. Bras. Eng. Pesca 5(3): 28-41, 2010.

PERRAKIS, A.; TEWS, L.; DAUTER, Z., OPPENHEIM, A. B.; CHET, L.; WILSON, K. S.; VORGIAS, C. E. Crystal-structure of a bacterial chitinase at 2.3 angstrom resolution. v. 2. 1169-80p. 1994.

Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 2015. Disponível em:

<[Http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Developmento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf)> Acesso em 21 nov 2015.

PORTELLA, M.C.; CESTAROLLI, M.A.; VERANI, J.R.; ROJAS, N.E.T. Produção de organismos planctônicos para alimentação inicial de larvas de peixes de água doce. Bol. Instit. Pesca. v. 24. 79-89p. 1997.

QUIDUTI, I. L.; Hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Monografia de Especialização em Endodontia da Escola de Aperfeiçoamento Profissional (EAP) da Sociedade dos Cirurgiões-Dentistas de Pernambuco (SCDP). Recife. 2014.

RABET, N.; THIERY, A. The neotropical genus *Dendrocephalus* (Anostraca: Thamnocephalidae) in Brasil (South America), with a description of two new species J. Nat. Hist. v. 30. p. 479-503. 1996.

REVISTA AQUAFEED. 2015. FAO Projeta aumento no crescimento da Aquicultura. Disponível em: <<https://editorastilo.com.br/revista-aqua-feed/item/3838-fao-projeta-aumento-no-crescimento-da-aquicultura>> Acesso em 01 de nov 2015.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. ScienceDirect. v. 31. 603-632p. 2006.

ROSA, C. G. Quitina e Quitosana: Aspectos gerais de obtenção e aplicações. Trabalho acadêmico como requisito parcial da Disciplina de Seminários. Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. 33p. 2008.

RUPPERT, E. E. Zoologia dos Invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva. Editora Roca. 7º Ed. 2005.

RUSSO, M. S. A; ANNA, M. S.; HOEFLER, T. P. Uso Racional da Vitamina C. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/cebrim/Cebrim%20Informa/Uso%20Racional%20da%20Vitamina%20C%2018-03-2013.pdf>> Acesso em 03 jan 2016.

SÁ, M. V. C. 2012. Limnocultura - Limnologia para Aquicultura. Ed UFC. Fortaleza. 218p.

SAHAI, A. S; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involment in morphogenesis and host-parasite interaction. Fems Microbiol. Rev. v. 11. 317-338. 1993.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biology Reviews. v. 22. 36-42p. 2008.

- SILVA, M.D.C.O. Caracterização biológica e reprodutiva de *Dendrocephalus brasiliensis*, (Pesta, 1921) (Crustacea, Branchyopoda). Monografia (Conclusão do Curso de Engenharia de Pesca) – UFRPE, Recife – PE, Brasil. 2000.
- SINNOTT, M. L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. Chem. Rev., v. 90. 1171-1202. 1990.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Limnologia aplicada à aquicultura. Jaboticabal: FUNEP. 1994.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Cultivo em massa de plâncton de água doce utilizado na alimentação de larvas de peixes: custo/benefício e dificuldades de manutenção. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE AQUICULTURA E BIOLOGIA AQUÁTICA 1.2004, Vitória. Anais. São Paulo: Tec Art Editora Ltda. 464 p. 2004.
- SPINDLER-BARTH, M. Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines. In Muzzarelli, R. A. A. (ed.): Chitin Enzimology. Ancona. 113-120p. 1993.
- SOARES, C.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; FURUYA, V.R.B.; MARANHÃO, T.C.F. Alimentação natural de larvas do cascudo preto *Rhinelepis aspera* Agassiz (1829) (Osteichtchyes - Loricariidae) em tanques de cultivo. Bol. Inst. Pesca. v. 24. 109-117p. 1997.
- SOARES, C. M.; HAYASHI, C.; GONÇALVES, G. S.; GALDIOLI, E. M.; BOSCOLO, W. R. Plâncton, *Artemia sp*, dieta artificial e suas combinações no desenvolvimento e sobrevivência do quinguio (*Carassius auratus*) durante a larvicultura. Acta Scientiarum. v. 22. 383-388p. 2000.
- STAPPEN, G. V. Artemia. In: LAVENS, P. E SORGELOOS, P. (eds). Manual on the production and use of live food for aquaculture - FAO Fisheries Technical Paper. No 36. Rome: FAO. 79-251p. 1996p.
- TAKATA, R. Produção de juvenis de *Artemia franciscana* e análise da utilização de dietas vivas e inertes na larvicultura intensiva do pintado *Pseudoplatystoma coruscans*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal). Pós-Graduação em Aquicultura. 77p. 2007.
- TESSER, M.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. Journal of Applied Aquaculture. v. 17. n. 2. 47-59 p. 2005.
- THARANATHAN, R. N. KITTUR, F. S. Chitin-The undisputed biomolecule of great potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v. 43. p. 61-87. 2003.

TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin or chitosan. *Polymer*. v. 41, p. 2463-2469. 2000.

ULHOA, C. J. & PEDEERBY, J. R. Regulation of Chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 37: 2163-2169p. 1991.

VALENTI, W. C. Aquicultura Sustentável. Aquicultura Sustentável. In: Congresso de Zootecnia, 12°. Vila Real, Portugal. 2002.

VIEIRA, H. S. F. Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha. Dissertação de Mestrado. Instituto superior de agronomia. Universidade de Lisboa. 54p. 2013.

YFLAAR, B. Z.; FILHO-MAIA, M. A. & OLIVEIRA, A. The use of “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) Nauplii in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) larval feeding. In: World Aquaculture in Salvador (845p). Brasil: Anais do World Aquaculture - WAS, 2. 2003.

YFLAAR, B. Z.; OLIVEIRA, A. Utilização de náuplios de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) na alimentação de larvas do “camarão cinza” *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. Maringá, v. 25. n. 2. 299-307p. 2003.

ZANANDREA, A. C. V. Eclosão de Branchonetas *Dendrocephalus brasiliensis* em condições de laboratório. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Aquicultura. 22p. 2010.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.3.Geral

Avaliar a ação enzimática da quitinase no processo de eclosão de náuplios de branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*).

4.4.Específicos

- Padronizar um protocolo para produção de cistos de *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta);
- Determinar a atividade da quitinase comercial sobre a quitina de camarão e nos cistos de *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta);
- Avaliar o efeito de concentrações de cálcio na atividade da quitinase;
- Avaliar a eficácia do método de eclosão de cistos de branchoneta com uso de quitinase, hidróxido de cálcio e ácido ascórbico.

ARTIGO CIENTÍFICO

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Ação da quitinase na eclosão de náuplios de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

Este artigo será submetido a Revista internacional “Aquaculture”



ISSN: 0044-8486

Fator de Impacto: 1.878
Qualis: A2

Ação da quitinase na eclosão de náuplios de branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921)

Leila Laise S. Santos^{1,3}, Thiago Barbosa Cahú¹, Fábio M. Higa², Darlio Inácio Teixeira³, Karina Ribeiro³, Fabiana R. A. Câmara^{3*}, Ranilson de Souza Bezerra¹

¹ Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil

²Engenheiro de Pesca, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

³Estação de Aquicultura, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias (EAJ), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN 160 - Km 03, Distrito de Jundiá, 59280-000, Macaíba, RN, Brasil

Resumo

Na aquicultura, o microcrustáceo de água doce conhecido como Branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*), tem sido alvo de estudos de comportamento, reprodução, produção de cistos e técnicas de eficiência de eclosão dos náuplios, sendo este último o grande entrave a sua utilização em substituição à artêmia. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação enzimática no processo fisiológico de amadurecimento e eclosão do náuplio de branchonetas. No ensaio experimental 1, foram testadas concentrações de 0,02mg/mL, 0,1mg/mL e 0,2mg/mL de quitinase comercial em 20 mg de cistos, resultando na concentração ideal de 0,2mg/mL para uma eficiência de eclosão de 88%. Esta concentração foi utilizada como base para o ensaio experimental 2 que consistiu de um controle e quatro tratamentos com quatro réplicas. Para o T1 o cisto foi submetido à quitinase, T2 a hidróxido de cálcio, T3 a ácido ascórbico, T4 hidróxido de cálcio e ácido ascórbico e em T5 com hidróxido de cálcio, ácido ascórbico e quitinase. As concentrações de Hidróxido de Cálcio (HC) e Ácido Ascórbico (AA) foram estabelecidas de acordo com os resultados de melhor taxa de eclosão relatados na literatura. O uso da quitinase possibilitou um aumento na taxa de eclosão de *Dendrocephalus brasiliensis*, e que com a adição de hidróxido de cálcio e ácido ascórbico promove uma maior eficiência de eclosão dos náuplios (96%).

Palavras chave: Aquicultura, Microcrustáceo, Hidrolise, Náuplio, Eclosão de cisto

Abstract

In aquaculture, the freshwater microcrustacean Branchoneta (*Dendrocephalus brasiliensis*) has been the subject to studies of behavior, reproduction, production of cysts, and techniques of nauplii hatching efficiency. Hatching is known to be the major obstacle for brabchoneta use as a substitute for artemia. Thus, the aim of this study was to evaluate the enzymatic action in the physiological process of maturation and hatching of the Branchoneta nauplii. In the first experimental trial, the concentrations tested were 0.02mg/ml, 0.1mg/ml, and 0.2mg/ml of commercial chitinase in 20mg of cysts, which resulted in the ideal concentration of 0.2 mg/ml for a hatching efficiency of 88%. This concentration was used as the basis for the experimental test 2, which consisted of a control treatment and five experimental treatments with three replicas per treatment. For T1, the cysts were subjected to chitinase; T2 to calcium hydroxide; T3 to ascorbic acid; T4 to calcium hydroxide and ascorbic acid; and T5 to calcium hydroxide, ascorbic acid, and chitinase. The concentrations of calcium hydroxide (HC) and ascorbic acid (AA) were established according to the results of the best hatching rate described in the literature. The use of chitinase demonstrated an increase in the hatching rate of the *Dendrocephalus brasiliensis*, and the addition

of calcium hydroxide and ascorbic acid further increased the hatching efficiency of the nauplii (96%).

Key words: Aquaculture, Microcrustacean, hydrolysis, Nauplii, cyst hatching

1. Introdução

A produção de pescado no Brasil vem crescendo em ritmo acelerado quando comparado a qualquer outro setor de produção de alimentos de origem animal (FAO, 2014). No entanto, alguns setores da aquicultura como, por exemplo, a larvicultura, ainda apresenta alguns entraves que limitam a produção de algumas espécies promissoras para o cultivo. Dentre os problemas a serem solucionados é possível citar a demanda de alimento vivo ou inerte (biomassa congelada) para aprimorar a produção durante a fase larval.

Atualmente, a *Artemia sp.* é o principal alimento vivo de sustentação de espécies aquáticas, devido ao domínio de técnicas que favorecem a elevada taxa de eclosão dos náuplios. Estes têm sido utilizados com êxito como alimento inicial na larvicultura de camarões e peixes (NAESS *et al.*, 1995; CÂMARA, 1996; DAY *et al.*, 1997; GALLOWAY *et al.*, 1999; BRITT, 2001; CIBELE & ANDREATTA, 2003). A artêmia é uma espécie de microcústáceo de água salgada, e portanto, não permanece atrativa por muito tempo quando utilizada como alimento para espécies de água doce. Sendo necessários estudos que viabilizam o cultivo de outros organismos que agregam valor ao avanço da larvicultura.

Dendrocephalus brasiliensis, conhecido popularmente como Branchoneta, é um microcústáceo de água doce, similar a artêmia de água salgada. Habita poças temporárias, pequenos açudes e riachos, formados durante a estação chuvosa em todo o Brasil. Constitui uma espécie que apresenta sexos separados e de fácil identificação, crescendo em torno de 1mm ao dia, atingindo a fase adulta em 6 dias; e podendo chegar ao comprimento em torno de 3,5cm. São essencialmente filtradores, alimentando-se de microalgas, protozoários, metazoários e matéria orgânica. Em ambiente natural o cisto depositado pela branchoneta adulta deve passar por uma secagem natural, que ocorre no período de estiagem, para que ocorra a eclosão do náuplio na próxima estação chuvosa (LOPES, 1998; LOPES, 2007; HIGA, 2015).

Pouco se sabe a respeito desta espécie, quando se fala de sua biologia e eficiência de eclosão. Portanto, este microcústáceo, na aquicultura, tem sido alvo de alguns estudos que objetivam conhecer o seu comportamento, reprodução, produção de cistos e utilização na dieta de peixes carnívoros, camarões e peixes ornamentais (CARNEIRO, 2000; LOPES, 2002). Outros

estudos têm buscado aumentar a eficiência de eclosão dos náuplios, um dos obstáculos a sua utilização em substituição à artêmia (SILVA, 2000; YFLAAR *et al.*, 2003; LOPES, 2007).

Buscando otimizar as taxas de eclosão dos náuplios foram observados por Dumont *et al.*, (1992) aspectos bioquímicos que envolvem a quebra do estado de dormência dos cistos na espécie de água doce, *Thamnocephalus platyurus*. Este autor utilizou a influência individual e conjunta do ácido retinóico como um agente morfogênico e o cálcio ionofórico na reativação do cisto. Para a espécie *Dendrocephalus brasiliensis*, Pereira & Santos-Neto (2010) verificaram a influência do ácido Ascórbico e íons de Cálcio na eclosão.

Os cistos dos anostracas são formados por um polissacarídeo denominado quitina, onde os níveis variam de 5.6 a 18.0 mg quitina/g. Para as espécies *Thamnocephalus platyurus* e *Artemia salina* o teor de quitina nos cistos é de 11.4 mg e 18.0 ± 1.5 respectivamente (CAUCHIE, *et al.*, 1997). A quitina é hidrolisada por um sistema hidrolítico classificado em: Endo-quitinases, Exo-quitinases e b-N-acetilglucosaminidase. Nos crustáceos, as quitinases estão diretamente relacionadas com a regulação da síntese e degradação da quitina podendo promover atividade biológica inativando o estado de latência de cistos e promovendo possivelmente uma melhor eclosão de náuplios (SPLINDER-BARTH, 1993).

Estudos de técnicas que viabilizam a ampliação da produção de cistos, náuplios e biomassa inerte de *D. brasiliensis*, com manutenção das características zootécnicas e nutricionais agregam valor e caracterizam um avanço considerável na larvicultura de peixes e camarões, podendo tornar-se um elo na carcinicultura e piscicultura com potencial de expansão inicialmente no semi-árido nordestino. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a ação da quitinase facilitando o processo fisiológico de amadurecimento e eclosão do náuplio de branchonetas.

2. Material e Métodos

2.1 Produção de branchonetas e cistos (*Dendrocephalus brasiliensis*)

A produção de Branchonetas e cistos foi realizada na Escola Agrícola de Jundiáí, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, localizada na cidade de Macaíba/RN.

Inicialmente 5g de cistos para eclosão foram mantidos na proporção de 1g/L de água em garrafas pet. Após 24h os náuplios eclodidos foram aclimatados para caixas de 1000L adaptadas para o cultivo da espécie. A alimentação das branchonetas consistiu em fitoplâncton com

dominância de clorofíceas unicelulares proveniente de tanques de produção de tilápia. Trocas de água e a limpeza das caixas foram realizadas a cada coleta de cistos.

Os cistos foram coletados por método de sifonagem, limpos a jatos d'água em uma sequência de malhas de 600, 300 e 75 μ m, ficando retidos nesta última. Os cistos foram submetidos à um processo de secagem em placa aquecedora a 45°C por 2 semanas e em seguida selecionados com uso de malha de 150 μ m para maximizar a retirada de impurezas e após o período de dormência (10 dias) submetidos à eclosão (Figura 1). Os cistos produzidos foram armazenados em frascos de vidro em dessecador até o início do experimento.

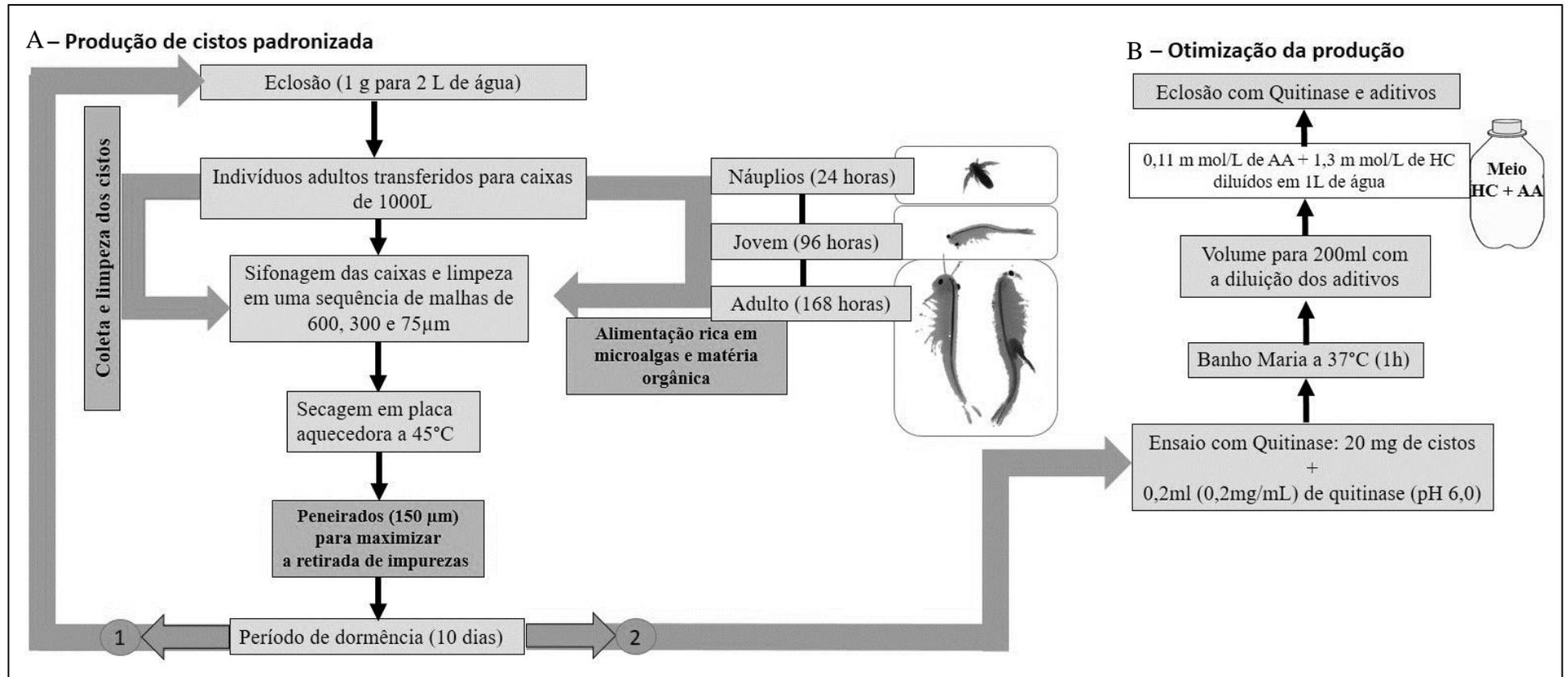


Figura 1: Fluxograma de produção e eclosão de cistos (A) e eclosão utilizando quitinase, ácido ascórbico e hidróxido de cálcio (B), correspondente ao tratamento com maior eficiência de eclosão para a espécie *D. brasiliensis*.

2.2 Determinação de Quitina nos Cistos de Branchonetas

2.2.1 Atividade de Quitinase

A quitinase comercial de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada para tratamento dos cistos e sua atividade determinada usando a quitina extraída da carapaça de camarão (cabeça e cefalotorax) de acordo com metodologia proposta por Cahú *et al.*, 2012. Foram utilizadas 125 µL de quitina hidratada, 125µL de tampão fosfato (0.02 M e pH 6.0) e 25 µL de quitinase 1 mg/mL. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria a 37°C, centrifugadas e retirado o sobrenadante para determinação de açúcares redutores pelo método do ácido dinitro salicílico (DNSA), aquecido a 100°C por 15 minutos e realizado leitura em espectrofotômetro a 670 nm. Os cistos foram utilizados como substrato para determinação da atividade enzimática da quitinase (U. mL⁻¹), na qual em 1 ml de amostra tem-se o valor em unidade (U) da proteína quitinase quantificada.

2.3 Delineamento experimental

2.3.1 Ensaio Experimental 1: Quitinase

Os cistos foram submetidos a três tratamentos e três réplicas com diferentes concentrações de quitinase. Inicialmente foi preparada uma solução matriz com concentração de 1mg/mL utilizando tampão fosfato (0,02 M a pH 6,0) e quitinase. A partir desta solução foram preparadas soluções intermediárias com concentrações diluídas de 0,1mg/mL, 0,5mg/mL e 1mg/mL, das quais foram retiradas 0,2mL inseridos em 0,8mL de tampão, correspondendo aos tratamentos finais, T1 com [0,02mg/mL], T2 [0,1mg/mL] e T3 [0,2mg/mL], onde os cistos foram submetidos. O tratamento controle (C) foi caracterizado pela ausência de quitinase conforme protocolo descrito por Sorgeloos & Kulakarapandian (1984), ajustado por Silva (2000) para *D. brasiliensis*.

Em cada tratamento foram utilizados 20 mg de cistos submetidos à incubação em banho maria a 37°C por 1 hora, possibilitando a ação enzimática. Após a atividade enzimática o volume foi completado para 200mL de água destilada e verificada a taxa de eclosão após 24hs. O cálculo para determinar a Eficiência de Eclosão foi realizado a partir da fórmula:

$$EE = \frac{NE}{NC} \times 100$$

Onde:

EE = Eficiência de Eclosão;

NE = Náuplios eclodidos na amostra;

NC = N° total de cistos na amostra.

2.3.2 Ensaio Experimental 2: Hidróxido de Cálcio, Ácido Ascórbico e Quitinase

O Ensaio experimental 2 iniciou-se a partir da determinação da melhor eficiência de eclosão observada no Ensaio 1. Desta maneira foi possível observar se a ação enzimática é catalisada pela adição de ácido ascórbico e hidróxido de cálcio para a eclosão de náuplios. O ensaio consistiu de um controle e quatro tratamentos com três réplicas, onde em T1 foram utilizados [0,2 mg/L] de quitinase, T2 [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio, T3 [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, T4 [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico e em [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico + [0,02 mg/L] quitinase. O tratamento controle foi caracterizado somente pela adição de água destilada. As concentrações de Hidróxido de Cálcio (HC) e Ácido Ascórbico (AA) foram estabelecidas de acordo com os resultados de melhor taxa de eclosão determinada por Dumont *et al.* (1992) modificado por Pereira & Santos-Neto (2010).

Os cistos do tratamento 1 foram previamente submetidos à ação da quitinase como descrito no ensaio experimental 1. Para os tratamentos 2 e 3 contendo os reagentes HC e AA, respectivamente, as concentrações foram diluídas para 1L de água e desta retirado 200ml para cada réplica. No tratamento 4 foram utilizadas as concentrações de HC e AA em conjunto diluídas em água destilada. Para tratamento 5, os cistos foram previamente submetidos à ação da quitinase em banho maria a 37°C por 1 hora. Em seguida o volume foi completado para 200mL de solução contendo os reagentes HC e AA (Figura 1). Foram usados 20 mg de cistos de Branchoneta para cada tratamento e eficiência de eclosão foi verificada de acordo com a mesma metodologia descrita no Ensaio experimental 1.

2.3.3 Parâmetros físicos e químicos da água

O oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) foi medido pelo oxímetro, modelo MO-900. Os valores de pH foram obtidos pelo medidor de pH, modelo mPA-210. A condutividade elétrica foi expressa em mS.com⁻¹ e mensurada pelo Condutivímetro CD-860. A determinação de alcalinidade da água foi realizada seguindo a metodologia de Washington, 1985.

2.3.4 Análise Morfológica

A análise morfológica seguiu a metodologia proposta por BERNICE, 1972 adaptada para a espécie *Dendrocephalus brasiliensis* utilizando o microscópio óptico do modelo Nikon Eclipse E200. Esta análise foi realizada para verificar alterações morfológicas para cada tratamento com o uso de produtos químicos que interferissem o desenvolvimento da espécie *D. brasiliensis*.

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através do programa SigmaStat versão 3.5. Foi aplicado o teste One Way ANOVA para verificar se houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos, confirmada a diferença, foi aplicado o teste de comparação múltipla de Student-Newman-Keuls (SNK), com significância $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

Aproximadamente quatro dias após a eclosão dos náuplios, os indivíduos já haviam atingido a forma juvenil com definição de estruturas reprodutivas. A fase adulta foi atingida com sete dias iniciando a produção e liberação de cistos de cor escura e forma oitavada. Foram produzidos 8g de cistos durante o período de dois meses de cultivo, contabilizando 91.650 cistos/g após o processo de limpeza e secagem. Estudos tem demonstrado que cada fêmea pode liberar de 100 a 230 cistos por desova (LOPES, 1998).

Diversos Anostracas apresentam quitina em sua composição, com variação inter e intraespecífica sendo encontrado conteúdo significativo em *Dendrocephalus brasiliensis* e cistos de *Artêmia salina* (CAUCHIE *et al.*, 1997). A quitinase exerce influência na quebra de cadeias de quitina e possivelmente sobre o estado de dormência do cisto de *D. brasiliensis*. Esta enzima apresenta atividade ótima a partir de 37°C e são importantes componentes do arsenal de proteínas de defesa das plantas, catalisam a hidrólise dos principais carboidratos da parede celular dos fungos e cistos de microcrustáceos (CHET, 1993; AGRIOS, 1997; GOMES *et al.*, 2010). Foi observado que a atividade da quitinase numa concentração de 1mg/mL obteve atividade média calculada em 153 mU.mL⁻¹ para a quitina de resíduos de camarão e 132 mU.mL⁻¹ para a quitina presente no cisto de *D. brasiliensis*, não apresentando diferença significativa de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls ($p > 0,05$).

Os náuplios de branchoneta eclodiram nas primeiras 48hs em concentração de quitinase de 0,2mg/ml, com média de eclosão de 1620,66 náuplios, enquanto que em 0,1mg/mL, houve eclosão parcelada em 72hs totalizando uma média 1312,33 náuplios para 20 mg de cistos. O tratamento com menor concentração de quitinase (0,02mg/ml) não apresentou diferença estatística com o controle, não sendo suficiente para melhorar a eficiência de eclosão do náuplio de *D. brasiliensis* (Figura 2A). Alguns fatores influenciam na atividade catalítica das enzimas, tais como, concentração enzimática, concentração do substrato, pH e temperatura, de modo que a relação enzima substrato exerce influência na velocidade da reação (BIASUTTI, 2006). Portanto, o método de eclosão com uso da quitinase demonstra que a ação enzimática em maior concentração promove a eclosão em

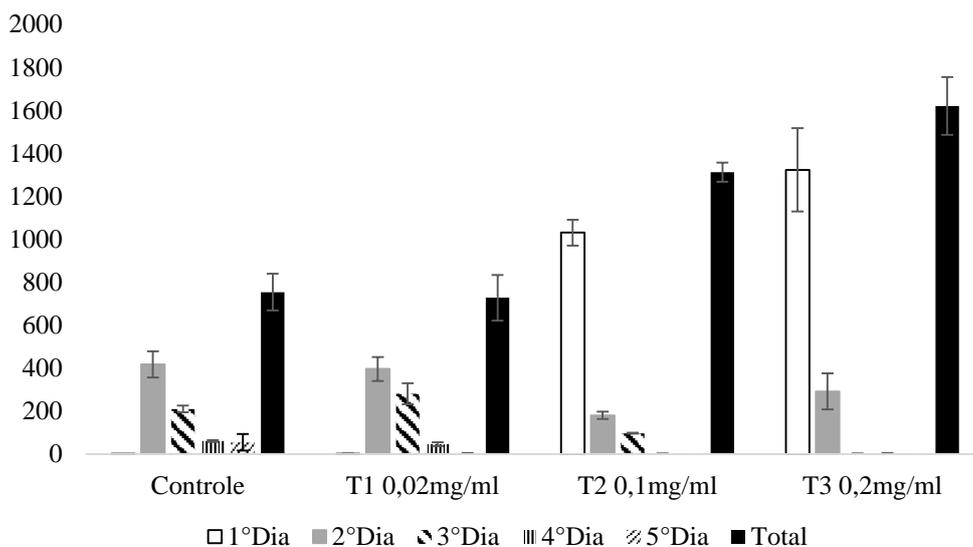
menor tempo. Além de otimizar o tempo de eclosão, concentrações 0,2mg/mL de quitinase proporciona uma taxa de eclosão de 88% em aproximadamente 1800 cistos de branchonetas. A partir destes resultados foi verificada a ação do ácido ascórbico e hidróxido de cálcio como agentes catalisadores da eclosão em concentração de 0,2 mg/mL de quitinase.

Nos microcrustáceos, os náuplios presentes nos cistos encontram-se na fase final de gástrula, caracterizada pela formação do corpo e diferenciação primária das estruturas, entretanto, o processo de desenvolvimento se encontra inativo (FAUTREZ-FIRLEFYN, 1951; BENESCH, 1969; DUMONT *et al.*, 2002). O ácido ascórbico tem a propriedade de ativar a diferenciação celular embrionária dos organismos vivos, atuando como agente morfogênico em substituição do ácido retinóico presente no interior do cisto (PEREIRA & SANTOS-NETO, 2010). Outros autores citam que o ácido retinóico, não funciona como agente morfogênico primário, mas atua na diferenciação de células específicas do tecido (WANEK *et al.*, 1991; NOJI *et al.*, 1991; DUMONT *et al.*, 2002).

O hidróxido de cálcio fornece íons de Ca^{+2} que facilita a quebra da camada mais externa do cisto, denominada córion reativando os cistos devido ao processo de desfosforilação de enzimas latentes, através da via calmodulina (DUMONT *et al.*, 1992). A calmodulina (proteína essencial para a atuação de diversos hormônios) apresenta quatro sítios ativos na qual se ligam os íons Ca^{+2} . A ligação do cálcio à calmodulina, forma o complexo cálcio-calmodulina quinase II que permite que ela faça uma mudança conformacional, ativando-a e permitindo estimular uma variedade de enzimas que irão atuar em diferentes processos desde a quebra do cisto até o amadurecimento do náuplio. Assim, a proteína calmodulina inicialmente funciona como um ativador da maquinaria celular enzimática que esta inativa durante o processo de dormência dos cistos de anostracas (Dumont *et al.*, 1992; LODISH *et al.*, 2014).

No presente estudo, a ação combinada de ácido ascórbico, hidróxido de cálcio e quitinase apresentaram resultados de maior eficiência de eclosão dos náuplios de branchonetas, com valor médio de 96,6%, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 2B).

A



B

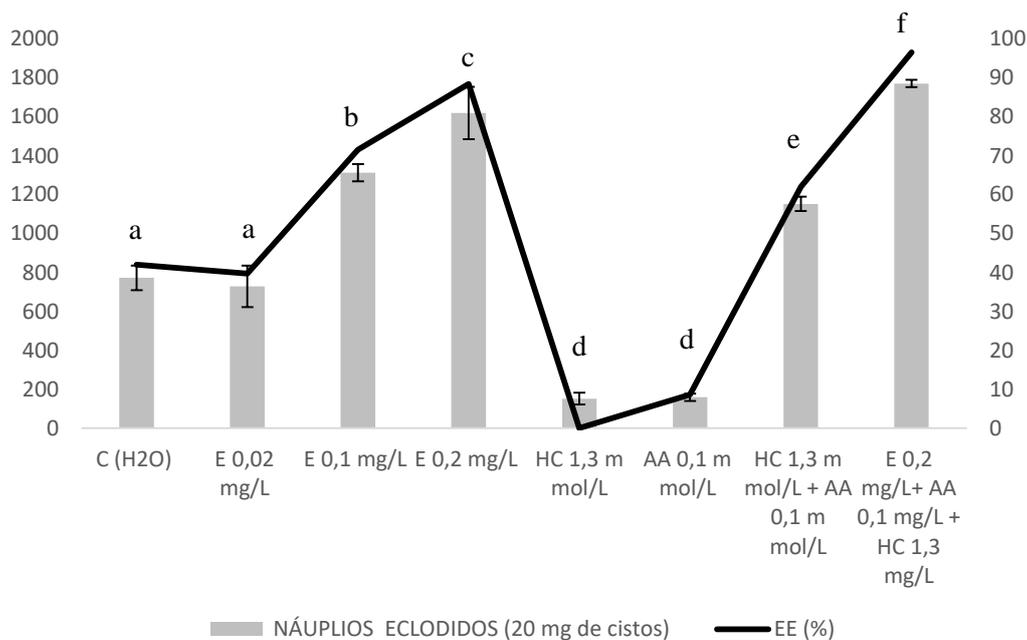
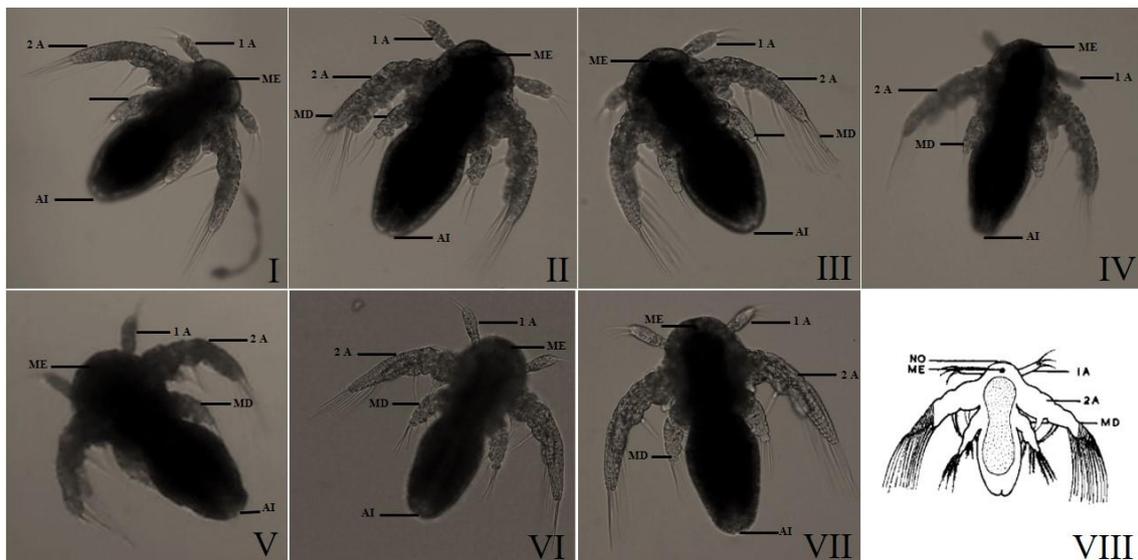


Figura 2: Número de náuplios eclodidos em 20 mg de cistos. (A) Em [0,02 mg/L], [0,1 mg/L], [0,2 mg/L] de quitinase, onde neste corresponde a 100% da eclosão com 1620 náuplios. (B) Em [0,2 mg/L] de quitinase, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio, [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico + [0,02 mg/L] quitinase, onde neste corresponde a 100% da eclosão com 1771 náuplios. *Letras iguais não diferenciam os tratamentos pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Modificações morfológicas no estágio larval 2 de *D. brasiliensis* foram observadas com o uso isolado de ácido ascórbico e hidróxido de cálcio. Nos demais tratamentos, o náuplio apresentou morfologia semelhante ao desenvolvimento do náuplio de outro anostraca da espécie *Streptocephalus dichotomus* (Figura 4 e 5). Para esta espécie, o estágio larval 2 apresenta cinco segmentos desenvolvidos na região posterior mandibular; sendo os dois primeiros, rudimentos que darão origem aos segmentos superiores e os outros três são rudimentos dos segmentos torácicos. Na parte antero-lateral da cabeça, rudimentos de olhos compostos são visualizados e a primeira e segunda antena se encontram alongadas. As espinhas caudais fazem sua aparição em ambos os lados do ânus (BERNICE, 1972). Assim, pode-se verificar que as características morfológicas da espécie em estudo estão dentro do padrão de desenvolvimento da ordem Anostraca, exceto para os tratamentos utilizando individualmente o hidróxido de cálcio e o ácido ascórbico.

A



B

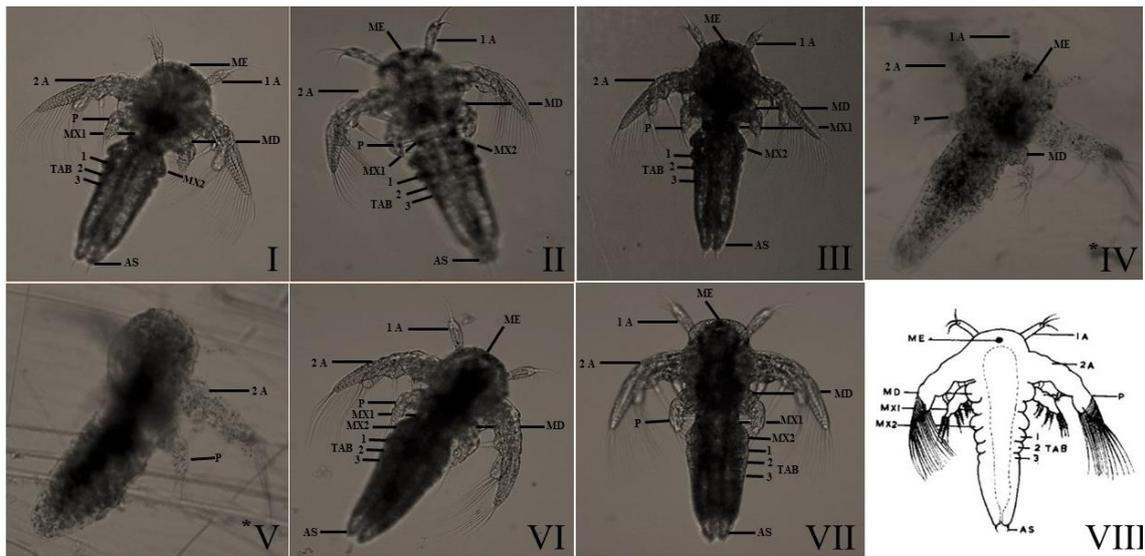


Figura 3: Ação da quitinase e aditivos na morfologia do estágio larval 1 (A) e estágio larval 2 (B) para a espécie *D. brasiliensis*. I. [0,02 mg/L], II. [0,1 mg/L], III. [0,2 mg/L] de quitinase, IV. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio, V. [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, VI. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico, VII. [1,3 m mol/L] hidróxido de cálcio + [0,1 m mol/L] ácido ascórbico + [0,02 mg/L] quitinase e VIII. Morfologia da espécie *Streptocephalus dichotomus* (BERNICE, 1972). Olho mediano (ME), Primeira antena (1A), Secunda antena (2A), Antena (P), Mandíbula (MD), Primeira maxila (MX1), Secunda maxila (MX2), Segmentos torácicos (TAB), Seta anal (AS), Ínicio da abertura anal (AI). * Indivíduos apresentaram deformações durante o estágio larval dois.

Alguns autores afirmam que a eclosão e sobrevivência de náuplios de anostracas depende dos fatores físicos e químicos da água (LAVENS & SORGELOOS, 1996; VINATEA, 1997; PEREIRA & SANTOS-NETO, 2010). Os valores ideais para o cultivo de branchonetas deve ser acima de 5mg/L de oxigênio dissolvido (LOPES, 2002). Durante todas as fases experimentais o oxigênio dissolvido variou de 5,6 a 8,1 mg/L, mantendo-se dentro dos limites estabelecidos para a espécie em estudo. Os valores de temperatura permaneceram estáveis e aceitáveis para organismos aquáticos variando de 25,9 a 28°C. Sipaúba-Tavares e Rocha (2001) e Lopes (2007) relataram que para a mesma espécie ocorreu um ótimo desenvolvimento com a temperatura entre 26°C e 28°C. A alcalinidade recomendada para água doce em aquicultura é de 20 a 150 mg/L CaCO₃. No presente estudo a alcalinidade variou entre 80 e 127 mg/L CaCO₃ durante a eclosão dos náuplios, permanecendo dentro dos valores ideais de desenvolvimento para crustáceos (Sá, 2012). As águas na maioria das vezes apresentam uma composição química constituída de sais de cálcio, magnésio,

sódio e potássio nas formas de cloretos, sulfato, carbonatos e bicarbonatos (ARRAES *et al.*, 2009). Após a adição do ácido ascórbico e hidróxido de cálcio houve elevação dos valores de condutividade elétrica, o que indica que o uso dos aditivos influencia na concentração de íons presente na água. No presente estudo, a condutividade elétrica variou de 100 a 310 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ após a adição dos produtos não se mostrando prejudicial a cultivos de organismos aquáticos. Análises dos parâmetros físicos e químicos são necessárias, pois além da influência da enzima e produtos químicos que melhorem a eficiência de eclosão de náuplios, a boa qualidade de água afeta positivamente a eclosão e a sobrevivência do náuplio após a eclosão. Portanto, os baixos (5,0) e altos valores (10,2) de pH nos tratamentos apenas com ácido ascórbico e hidróxido de cálcio, respectivamente, pode ter afetado o desenvolvimento do náuplio após a eclosão em decorrência da acidez e basicidade da água após o uso destes produtos. Para os demais tratamentos, os valores de pH variaram de 7,5 a 8,0. Sipaúba-Tavares e Rocha (2001) e Lopes (2007) relatam que para espécie em estudo ocorreu um ótimo desenvolvimento com pH em torno de 6,5 e 8,5.

4. Conclusão

A quitinase tem atividade enzimática sob o cisto de *D. Brasisliensis* e sua ação aumenta a taxa de eclosão de náuplios de branchonetas. Esta atividade é intensificada com a adição de hidróxido de cálcio (reativador enzimático) e ácido ascórbico (agente morfogênico), o que promove uma maior eficiência de eclosão dos náuplios.

Referências

AGRIOS, G.N. 1997. **Plant pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press. 635p.

Arraes, F. D. D.; Andrade, E. M.; Palácio, H. A. Q.; Junior, J. I. F.; Santos, J. C. 2009. **Identificação dos íons determinantes da condutividade elétrica nas águas superficiais da bacia do Curu, Ceará**. Rev. Ciênc. Agron. v. 40. n. 3. 346-355 p.

BENESCH, R. 1969. **Zur Ontogenie und Morphologie von Artemia salina Leach**. Zool. Jb. Anat. 86: 307-458p.

BIASUTTI, E. A. R. 2006. **Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de Oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da**

pancreatina. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos. UFMG. 129.

BRITT, L. L.; LOEW, E. R.; MACFARLAND, W. N. 2001. **Visual pigments in the early life stages of Pacific northwest marine fishes - Review**. The Journal of Experimental Biology. v.204. 2581-2587p,

CAHÚ, T. B.; SUZAN, D. S.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTEC, S. F.; CARVALHO, L. B. JR.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. 2012. **Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*) processing waste**. Process Biochemistry 47: 570–577p.

CÂMARA, M. R. 1996. **Artemia no Brasil: em busca de um modelo auto-sustentável de produção**. Revista Panorama da Aqüicultura, 6 (36): 16-19p.

CAUCHIE, H. M.; MURUGAN, G.; THOMÉ, J. P.; DUMONT, H. J. 1997. **Intra- and interspecific variation in the chitin content of some anostracans**. Hydrobiologia 359: 223–228p.

CARNEIRO, M.D.O.S. 2000. **Caracterização biológica e Reprodutiva de *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) (Crustacea, Brachiopoda)**. Monografia de graduação do Curso de Engenharia de Pesca. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 39p.

CHET, I. 1993. **Biotechnology in plant disease control**. New York: Wiley-Liss. 373p.

CIBELE, S. P.; ANDREATTA, E. R. 2003. **Efeito da oferta de náuplios de *Artemia franciscana* enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre o desenvolvimento de pós-larvas do camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis***. Revista Brasileira de Zootecnia. v. 32, n.6.

CRUZ, DA M. F. A.; RODRIGUES, F. Á.; POLANCO, L. R.; CURVELO, C. R. S.; NASCIMENTO, K. J.T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. 2013. **Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interaction**. Bragantia. v.72. n. 2. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052013005000025>> Acesso em: 16 mai 2016.

DAY, J. O.; HOWELL, B. R.; JONES, D. A. 1997. **The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and weaning.** *Aquaculture Research*, v. 28. 911-921 p.

DUMONT, H. J.; CASIER, P.; Manuswamy, N. & Walsche, C. De. 1992. **Cyst hatching in Anostraca accelerated by retinoic acid, amplified by Calcium Ionophore A23187, and inhibited by Calcium-channel blockers.** *Hydrobiologia*. 230: 1-7p.

FAO. 2014. FAO Global Aquaculture Production Volume and Value Statistics Database Updated to 2012. Disponível em:

<[ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf](http://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf).> Acesso em: 26 ago 2015.

FAUTREZ-FIRLEFYN, N. 1951. **Etude cytochimique des acides nucléiques au cours de la gametogenèse et des premiers stades du développement embryonnaire chez *Artemia salina* L.** *Arch. Biol. Paris* 62: 391-438p.

GALLOWAY, T. F.; KJORSVIK, E.; KRYVI, H. 1999. **Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.), related to different somatic growth rates.** *Journal of Experimental Biology*. v. 202. 2111-2120p.

GODONE, R. L. N. 2011. **Isolamento de uma Quitinase extraída do cefalotórax do Camarão Marinho (BURKENROAD, 1936): Avaliação de suas atividades antimicrobiana e larvicida.** Dissertação de mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

GOMES, L. P.; OLIVEIRA, C. I. R.; SILVA, M. C.; ANDRADE, C. T.; AGUILA, E. M. D.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. 2010. **Purification and characterization of grape (*Vitis vinífera* L. cv *Red Globe*) chitinases for production of chitosan from shrimp chitin.** *Quím. Nova*. v. 33. n. 9. São Paulo.

HENRISSAT, B. **Sequence homology between a beta-galactosidase and some beta-glucosidases.** *Protein Seq Data Anal*. v. 4. 61-62 p. 1991.

HUNG, T. H.; CHANG, Y. M.; SUNG, H. Y.; CHANG, C. T. 2002. **Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain.** *Journal Agric Food Chem*. v. 50. 4666-4673p.

- KANG, S. C.; PARK, S.; LEE, D. G. 1999. **Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. *Journal of Invertebrate Pathology*. v.73. 276-281 p.
- KOGA, C.; ADATI, N.; NAKATA, K., MIKOSHIBA, K.; FURUHATA, Y.; TEL, H.; SAKAKI, Y.; KUROKAWA, T.; SHIOKAWA, K.; YOKOYAMA, K.K. **Characterization of a novel member of the family, XFGF-20, in *Xenopus laevis***. *Biochem Biophys Res. Commun.* v. 261. 756-65p. 1999.
- LAVENS, P. & SORGELOOS, P. 1996. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper. Anais da FAO. n. 361. 295p.
- LOPES, J. P. 1998. **Considerações sobre a branconeta, *Dendrocephalus brasiliensis*, (Crustacea, Anostraca, Thamnocephalidae) como fonte alternativa na alimentação de alevinos de espécies carnívoras**. Monografia (Curso de Especialização em Aquicultura). Departamento de Educação, Campus VIII, Universidade do Estado da Bahia. Paulo Afonso. 31p.
- LOPES, J.P. 2002. **Produção de cistos e biomassa de Branchoneta *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) em viveiros de cultivo**. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 46p.
- LOPES, J. P.; SILVA, T. A.; GOMES, D. S.; RANGEL, A. C. M. 2007. **Utilização do anelídeo enquitréia *Enchytraeus albidus*, na alimentação do niquim *Lophiosilurus alexandri* durante a alevinagem inicial**. *Rev. Brás. Eng^a. Pesca*, 2(1): 156-166.
- Nadia, G. E. G.; Abd-El-Kareem, F.; Fotouh and Nehal, Y.O.; El-Mougy, S. 2007. **Induction of Systemic Resistance in Potato Plants Against Late and Early Blight Diseases Using Chemical Inducers under Greenhouse and Field Conditions**. *Res. J. Agric. & Biol.* v. 3. n. 2. 73-81p.
- NAESS, T.; GERMAIN-HENRY, M.; NAAS, K. E. 1995. **First feeding of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) using different combinations of *Artemia* and wild zooplankton**. *Aquaculture*, v. 130. n. 2. 235-250p
- NOJI, S.; NOHNO, T.; KOYAMA, E.; MUTO, K.; OHYAMA, K.; AOKI, Y.; TAMURA, K.; OHSUGI, K.; IDE, H.; TANIGUCHI, S. & SAITO, T. 1991. **Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud**. *Nature*. 350: 83-86p.

PEREIRA, D. C. & SANTOS-NETO, M. A. **Influência do Ácido Ascórbico e dos Íons Ca⁺² na eclosão de cistos do Anostraca Branconeta (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921).** Rev. Bras. Eng. Pesca 5(3): 28-41, 2010.

SÁ, M. V. C. 2012. **Limnocultura - Limnologia para Aquicultura.** Ed UFC. Fortaleza. 218p.

SEIDL, V. **Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions.** Fungal Biology Reviews. v. 22. 36-42p. 2008.

SILVA, M.D.C.O. 2000. **Caracterização biológica e reprodutiva de *Dendrocephalus brasiliensis*, (Pesta, 1921) (Crustacea, Branchyopoda).** Monografia para conclusão do Curso de Engenharia de Pesca da UFRPE. Recife - PE Brasil, 39p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. 2001. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Ed. RiMa, São Carlos, Brasil. 106p.

SPLINDER-BARTH, M. 1993. **Hormonal regulation of chitin metabolism in insect cell lines.** In: Chitin Enzymology. P. 75-82. R. A. A. Muzzarelli, ed. European Chitin Society, Italy.

STRESSMANN, M.; KITAO, S.; GRIFfITH, M.; MORESOLI, C.; BRAVO, L. A.; MARANGONI, A. G. 2004. **Calcium Interacts with Antifreeze Proteins and Chitinase from Cold-Acclimated Winter Rye1.** Plant Physiol. v. 135. 364-376p.

VINATEA, L. A. 1997. **Princípios químicos da qualidade de água em aquicultura.** Florianópolis. Editora da UFSC.

YFLAAR, B. Z.; FILHO-MAIA, M. A. & OLIVEIRA, A. 2003. **The use of “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta, 1921) Nauplii in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) larval feeding.** World Aquaculture in Salvador. Brasil: Anais do World Aquaculture (WAS, 2). 845p.

WANEK, N.; GARDINER, D. M.; MUNEOKA, K. & BRYANT, S. V. 1991. **Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud.** Nature. 350: 81-83p.

ZANANDREA, A. C. V. 2010. **Eclosão de Branchonetas *Dendrocephalus brasiliensis* em condições de laboratório.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Aquicultura. 22p.