

INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ASCÓRBICO E DOS ÍONS Ca^{+2} NA ECLOSÃO DE CISTOS DO ANOSTRACA BRANCONETA (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921).Daniel Campos PEREIRA^{1*} & Miguel Arcanjo dos SANTOS-NETO²¹Universidade Estadual da Bahia - UNEB, *Campus VIII*²Companhia Hidro Elétrica do São Francisco - CHESF

*e-mail: dancamper@hotmail.com

Enviado em 14 de novembro de 2010

Resumo - Alguns trabalhos têm buscado técnicas na eficiência de eclosão dos náuplios de Anostracas, utilizando diversos artifícios para este fim. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência do ácido ascórbico e dos íons Ca^{+2} na incubação dos cistos do Anostraca branconeta *Dendrocephalus brasiliensis*, para propor uma nova metodologia de eclosão de náuplios desta espécie. Foram realizados dois experimentos, no primeiro (E1) foi testada a influência da concentração de ácido ascórbico (AA) na eclosão dos náuplios, para uma concentração constante de hidróxido de cálcio (HC) e o segundo (E2), avaliou a influência da concentração dos íons Ca^{+2} , do HC, para uma mesma concentração de AA, obtida do melhor resultado de E1. Os experimentos foram compostos de 3 tratamentos (T1; T2 e T3) e um Controle (sem reagentes), com 3 repetições cada. O melhor resultado obtido na eficiência de eclosão do E1 foi T3, com 56.667 náuplios eclodidos por grama de cistos, com uma concentração de 1,00g de HC/L e 0,02g de AA/L. Esta concentração de AA foi repetida no E2, sendo T2, deste segundo experimento, o que apresentou os melhores resultados estatísticos, com média de eclosão de 116.333 náuplios por grama de cistos, com uma concentração de 0,10g de HC/L. Constatou-se haver uma forte influência do ácido ascórbico e dos íons de Ca^{+2} na aceleração do processo de eclosão dos cistos de branconeta.

Palavras-chave: aquicultura, alimento vivo, carnívoros.

INFLUENCE OF ASCORBIC ACID AND OF THE Ca^{+2} IONS IN THE OUTBREAK OF CYSTS OF ANOSTRACA BRANCONETA (*Dendrocephalus brasiliensis* PESTA, 1921).

Abstract - Some studies have been searching techniques which improve hatching efficiency of nauplii of Anostraca. Thus, the present study had the aim to analyze the influence of ascorbic acid and Ca^{+2} ions in the hatching cysts of Anostraca branconeta *Dendrocephalus brasiliensis*, in order to propose a new method of hatching nauplii of this species. Two experiments were conducted: the first one (E1) was tested the influence of ascorbic acid concentration in the hatching cysts, for a constant concentration of calcium hydroxide; the second one (E2), evaluated the influence of the concentration of Ca^{+2} ions of calcium hydroxide, for the same concentration of ascorbic acid (AA), that was obtained of the best result of E1. The experiments were composed 3 treatments (T1; T2 and T3) and a control (free f reagents) with 3 replicates each one. The best result in E1 was T3, with 56,667 nauplii hatched per gram of cysts, with a concentration 1.00g of HC/L and 0.02g of AA/L. This concentration of AA was repeated in E2. T2, in this second experiment, it was which showed the best statistical results, with mean hatching 116,333 nauplii per gram of cysts, with a concentration 0.10g of HC/L. Based on results found in these experiments, we can conclude that there is a strong influence of ascorbic acid and of the Ca^{+2} ions in the acceleration of the hatching cysts "branconeta".

Key-words: aquaculture, live food, carnivorous.

INTRODUÇÃO

O amplo uso de náuplios de *Artemia* sp. na larvicultura de peixes carnívoros se mostrou uma ótima opção para a alimentação de larvas de algumas espécies dulciaquícolas cultivadas inicialmente em laboratório, como o pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Lopes et al., 1996; Santos, 2007). Algumas espécies de anostráceos de água doce, como: *Thamnocephalus platyurus*, *Chirocephalus diaphanus* e *Streptocephalus proboscideus*, superam a quantidade de ácidos graxos presentes na maioria de cepas de *Artemia* sp. (Mura, 1995). Outro anostraca que apresenta um grande potencial na larvicultura dulciaquícola é o *Dendrocephalus brasiliensis*.

A grande vantagem da substituição da *Artemia* sp. por *D. brasiliensis* na larvicultura de espécies de água doce está no fato de que a presa continuará atrativa ao predador, pois não sucumbirá ao choque osmótico da variação brusca de salinidade do meio. Silva & Rodrigues (1997) relataram que o uso de náuplios de *Artemia* sp. como alimento vivo não tem sido inteiramente livre de transtornos. Por ser de origem marinha, sua sobrevivência é drasticamente reduzida com a diminuição da salinidade de cultivo (Stappen, 1996; Treece, 2000).

Pesquisas com *D. brasiliensis*, na sua grande maioria, limitam-se a aspectos relacionados à identificação da espécie, com poucos subsídios relacionados à dinâmica de reprodução e comportamento reprodutivo. Lopes (2002) afirma que resultados já obtidos com *D. brasiliensis* revestem-se da maior importância para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil e no mundo, sendo possível a produção de cistos, náuplios e biomassa desse crustáceo. Alguns trabalhos com a *D. brasiliensis* tem buscado aumentar a eficiência de eclosão dos náuplios, pois este é um dos obstáculos a sua utilização em substituição à artêmia (Silva, 2000; Yflaar et al., 2003; Lopes, 2007).

Para a artêmia, Lavens & Sorgeloos (1996) e Vinatea (1997) afirmam que a eclosão destes náuplios depende absolutamente dos fatores físico-químicos presentes durante o período de incubação, tais como temperatura (25-35°C), salinidade (15-35 ups), pH (ao redor de 8,0), oxigênio dissolvido na água próximo ao ponto de saturação.

Como resultado de sua pesquisa, Lopes (2007) sugeriu que fosse adotada uma metodologia, em que as condições ideais para produção de náuplios de *D. brasiliensis* são: cistos de boa procedência; pré-hidratação de 12 horas e novamente desidratação; incubação por 24 horas com temperatura da água controlada entre 26 a 30°C; salinidade 0 ups; pH ao redor de 8,0 e luminosidade de 1500 lux, indispensável para ativar o processo enzimático de eclosão.

Dumont et al. (1992) já haviam analisado os aspectos bioquímicos dos processos que envolvem a quebra do estado de dormência dos cistos, utilizando ácido retinóico (AR) e cálcio ionophore A23187 (CI) na aceleração da eclosão de cistos, pelo transporte/influência dos íons de Ca^{+2} liberados, dos anostracos de água doce *Tamnocephalus platyurus* e *Streptocephalus*

dichotomus. Nesta pesquisa, Dumont et al. (1992) analisaram o efeito do AR como agente morfogênico, onde estudou o desenvolvimento das formas e estruturas características das espécies a partir do embrião, e do CI na reativação dos cistos, devido ao processo de desfosforilação de enzimas latentes, através da via calmodulina (proteína capaz de ligação com íons de cálcio, extremamente conservada ao longo da escala zoológica e essencial para a atuação de diversos hormônios), em dois testes distintos para estes reagentes. As concentrações testadas do AR não foram estatisticamente significantes, mas produziram um aumento na eclosão inicial e a diminuição dos dias de incubação, quando comparadas ao controle. No experimento com concentrações de CI, os resultados mostraram-se estatisticamente significantes ($p < 0,02$), o aumento da concentração elevou o percentual de eclosão dos cistos.

Dumont et al. (1992) realizaram, então, um terceiro experimento para testar a influência individual, e conjunta, destes reagentes, a uma mesma concentração, $0,5 \times 10^{-7}$ M (Molar). O tratamento com os dois reagentes foi estatisticamente superior aos outros dois, servindo como referência para esta pesquisa.

A aquisição destes reagentes apresenta alguns empecilhos. A obtenção do ácido retinóico só mediante prescrição médica. A vitamina A, que é considerada quimicamente como um subgrupo dos retinóides (Frota, 2005), são produtos onerosos, ou de venda controlada, como também o cálcio ionophore A23187, que é de difícil aquisição no mercado.

Buscou-se uma alternativa a estes compostos, sabendo que vitamina A é um antioxidante lipossolúvel, optou-se em utilizar o ácido ascórbico (AA), antioxidante hidrossolúvel com um conjunto de moléculas de baixa massa molecular em relação à vitamina A (Frota, 2005), e por ser um produto de fácil aquisição e de custo acessível, como substituto do ácido retinóico. Em substituição ao CI, utilizou-se o hidróxido de cálcio (HC), para o fornecimento dos íons de Ca^{+2} , por também ser um produto acessível comercialmente, conhecido como cal hidratada.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência do ácido ascórbico e dos íons Ca^{+2} na eclosão de cistos da branconeta *D. brasiliensis*, para descrever uma metodologia de eclosão de náuplios dessa espécie, visando incrementar a produção de cistos deste microcrustáceo em larga escala e torna sua utilização aplicável como alimento vivo a organismos aquáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

DESCRIÇÃO DA ÁREA

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), no município de Paulo Afonso – BA, pertencente à Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF), em março de 2009 (coleta de cistos) e novembro de 2009 (experimentos).

MATERIAL BIOLÓGICO

As branconetas foram coletadas no mês de março de 2009, em um dos viveiros da EPPA, e distribuídas em incubadoras de fibra de vidro com capacidade de 200 litros de água, permanecendo por cerca de 24 horas. Decorrido este prazo, todas as fêmeas apresentaram os ovissacos vazios, confirmando o final da desova. Os cistos foram sifonados e colocados para secar ao abrigo do sol e, após desidratados, armazenados em potes de vidros e estocados até o início dos experimentos.

AQUISIÇÃO DOS REAGENTES

O ácido ascórbico - AA ($C_6H_8O_6$) foi adquirido em uma farmácia de manipulação e a fonte dos íons de Ca^{+2} foi o hidróxido de cálcio - HC ($Ca(OH)_2$), adquirido em loja de materiais de construção, em Paulo Afonso – BA.

Nos dois experimentos, a concentração destes reagentes foi baseada no trabalho de Dumont et al. (1992), que adotaram a concentração de $0,5 \times 10^{-7}$ mol para ambos os reagentes. Como a conversão para grama resultou em valores muito pequenos (ordem de grandeza 10^{-4}), adotou-se então, concentrações maiores com múltiplos de 10 (por exemplo, para o AA: 2,00; 0,20 e 0,02g; e para HC: 1,00; 0,10 e 0,01g).

MODELO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois experimentos: E1 e E2, com três tratamentos e um controle, com três repetições cada. A metodologia para a eficiência de eclosão da *Artemia* sp. foi segundo Sorgeloos & Kulakarapandian (1984), ajustado por Silva (2000) para a *D. brasiliensis*. No E1 foi testada a influência da concentração do AA na eclosão dos cistos de branconeta, para uma mesma concentração dos íons Ca^{+2} , presentes no HC (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de reagente em cada tratamento do experimento I.

REAGENTE	TRATAMENTO			
	T1	T2	T3	C
AA (g/L)	2,00	0,20	0,02	-
HC (g/L)	1,00	1,00	1,00	-

Legenda: AA= Ácido ascórbico; HC= Íons de Ca^{+2} ; T1= Tratamento 1; T2= Tratamento 2; T3= Tratamento 3; C= Controle (isento de reagentes).

No tratamento controle (C) não foi adicionado nenhum reagente, seguindo-se estritamente o método de Lopes (2007) para a eclosão de cistos de branconeta, que consiste em colocar os cistos secos na água para pré-hidratação (Figura 1) por 12 horas, com aeração forte e iluminação constante, seguida de nova secagem ao sol (desidratação) e posteriormente, colocá-los para eclodir por 24 horas.

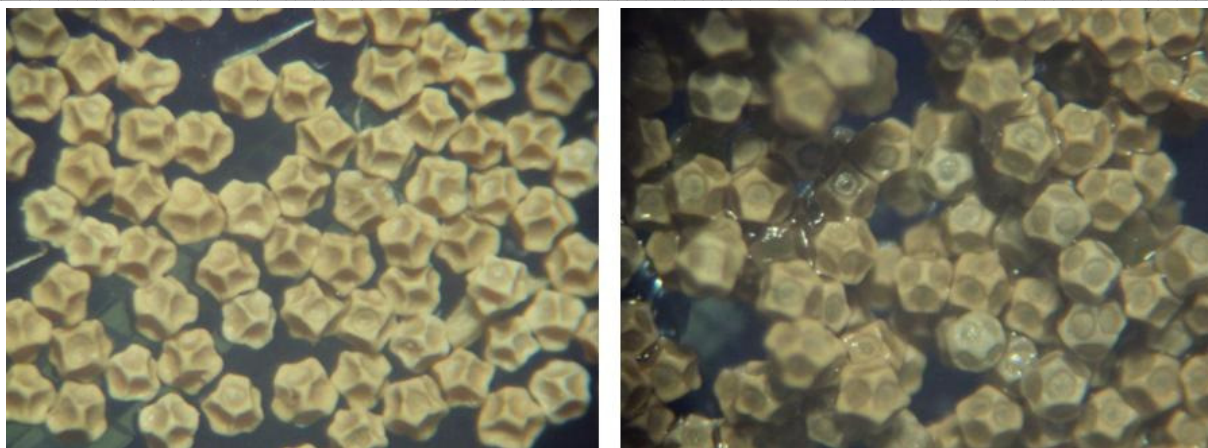


Figura 1. Cistos de branconeta secos (dormentes) e hidratados (da esquerda para direita).

Os compostos químicos foram diluídos, a exceção do tratamento controle (isento de reagentes), em 1,5 litros de água. Os parâmetros físico-químicos da água foram medidos no início e ao término do experimento, bem como antes da adição dos reagentes, que corresponde às condições iniciais do controle. Cada incubadora foi abastecida com 500 mL da solução respectiva, totalizando 3 tratamentos com reagentes e um controle, com 3 repetições cada.

Os cistos previamente hidratados e pesados, foram incubados na proporção de 1 g/L, em cada uma das 12 garrafas plásticas (PET) utilizadas como incubadoras, com capacidade de 2 litros, devidamente etiquetada e sendo acondicionadas em delineamento inteiramente casualizado em um aparelho chamado de ecloseria (Figura 2).



Figura 2. Incubadoras na Ecloseria.

As incubadoras foram dispostas de tal forma que a distância entre a superfície da água e a lâmpada foi de 28 cm, iluminação de 1500 lux. Cada incubadora recebeu aeração individual para manter os cistos em constante suspensão, para evitar perdas na incubação dos cistos.

Após 24 horas, para o cálculo da eficiência de eclosão (que se refere ao número de náuplios eclodidos/g de cistos) foram retiradas quatro amostras de 0,25 mL com uma pipeta de 1 mL para cada repetição e colocadas em placas de Petri para contagem. Em seguida, adicionou-se uma gota da solução de lugol para fixação das amostras. Procedeu-se a contagem dos náuplios, obtendo-se uma média por placa (N). Foram utilizados 0,50 g de cistos para 500 mL de água em cada incubadora. Para o cálculo da eficiência de eclosão dos náuplios, foi utilizada a seguinte fórmula (Sorgeloos et al., 1986):

$$HE = N \times 2 \times 500$$

Onde: HE = eficiência de eclosão; N = náuplios eclodidos (média por tratamento); 2 = ajuste para um grama e 500 = volume da garrafa PET utilizada.

No segundo experimento-E2, tomou-se o primeiro experimento (E1) como referência, mantendo-se a concentração de AA, que apresentou o melhor desempenho em E1, constante (0,02g/L), variando-se a concentração de HC em cada tratamento (Tabela 2), no intuito de obter a melhor concentração deste. Foram adotados os mesmos procedimentos do experimento I.

Tabela 2. Concentração de reagente em cada tratamento do experimento II.

REAGENTE	TRATAMENTO			
	T1	T2	T3	C
AA (g/L)	0,02	0,02	0,02	-
HC (g/L)	1,00	0,10	0,01	-

Legenda: AA= Ácido ascórbico; HC= Íons de Ca⁺²; T1= Tratamento 1; T2= Tratamento 2; T3= Tratamento 3; C= Controle (isento de reagentes).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao Programa Assistat, versão 7.5 Beta de 2008, onde foi aplicado o teste de Cochran, para confirmação da homogeneidade das variâncias (Mendes, 1999). Confirmada a homogeneidade, foi aplicada a ANOVA com um fator, a concentração do reagente. Em seguida foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias (Mendes, 1999).

RESULTADOS

CONDIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA

A tabela 3 mostra os valores destes parâmetros antes da adição e após a adição dos reagentes, onde os valores do controle (C) correspondem às condições iniciais da água utilizada, para o experimento E1.

Tabela 3. Parâmetro físico-químico da água usada no experimento I no mês de novembro de 2009.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	C	T1	T2	T3
Temperatura (°C)	30,65	29,04	28,67	28,15
Condutividade (µS/cm)	78	915	1903	2199
Totais de Sólidos Dissolvidos (g/L)	0,051	0,595	1,236	1,430
Salinidade (ups)	0,03	0,45	0,96	1,12
Saturação de Oxigênio (%)	34,50	30,20	3,70	43,30
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2,63	2,27	0,27	3,28
pH	7,43	9,24	9,93	9,95

A tabela 4 mostra os valores destes parâmetros antes da adição e após a adição dos reagentes, onde os valores do tratamento C correspondem às condições iniciais da água utilizada, para o experimento E2.

Tabela 4. Parâmetro físico-químico da água usada no experimento II no mês de novembro de 2009.

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	C	T1	T2	T3
Temperatura (°C)	28,45	27,61	27,59	27,70
Condutividade (µS/cm)	68	2262	190	76
Totais de Sólidos Dissolvidos (g/L)	0,044	1,470	0,124	0,049
Salinidade (ups)	0,03	1,15	0,09	0,03
Saturação de Oxigênio (%)	97,90	65,40	77,40	82,70
Oxigênio dissolvido (mg/L)	7,63	5,13	6,11	6,55
pH	7,66	9,66	8,78	7,76

EFICIÊNCIA DE ECLOSÃO

O T3 foi considerado o melhor resultado deste primeiro experimento, embora não apresente o maior valor absoluto de eclosão, já que não apresentou diferença significativa ao tratamento com maior taxa de eclosão (T1), porém com uma menor concentração de AA (0,02 g/L). Portanto, mais viável economicamente e apresentou o segundo melhor resultado na eficiência de eclosão dos náuplios de *D. brasiliensis* (Tabela 5). A concentração de AA do T3 passou a ser a referência ao próximo experimento E2.

Tabela 5. Média de náuplios eclodidos em 24 horas no experimento I.

TRATAMENTO	MÉDIA ^{1*} DE NÁUPLIOS ECLODIDOS EM 24 h	DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS
T1	105.666,66*	a ^{2*}
T3	56.666,67	ab
T2	46.666,66	ab
C	28.333,33	b

1* - Média obtida de 3 repetições.

2* - Letras diferentes, entre as médias, diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Diferença mínima significativa (DMS) = 66.065,74

Média geral (MG) = 59.333,33

Coefficiente de variação (CV%) = 42,57

No experimento E2, o tratamento T2 foi o que apresentou o melhor desempenho geral, sendo este o definido para compor o protocolo ora sugerido, por reunir as vantagens perseguidas: menor emprego de reagentes e maior eficiência de eclosão dos náuplios de *D. brasiliensis* (Tabela 6).

Tabela 6. Média de náuplios eclodidos em 24 horas no experimento II.

TRATAMENTO	MÉDIA ^{1*} DE NÁUPLIOS ECLODIDOS EM 24 h	DIFERENÇA ENTRE OS TRATAMENTOS
T1	129.666,66	a ^{2*}
T2	116.333,33	a
T3	48.333,33	a
C	29.333,33	a

1* - Média obtida de 3 repetições.

2* - Letras iguais, entre as médias, não diferenciam os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,01$)

Diferença mínima significativa (DMS) = 163.301,80

Média geral (MG) = 80.916,66; Coeficiente de variação (CV%) = 77,16

DISCUSSÃO

O ácido retinóico (AR) é um agente morfogênico, responsável pelo processo de diferenciação celular de células embrionárias dos seres vivos (Giguere et al., 1987; Balling, 1991), sendo a forma encistada um embrião cujo processo de desenvolvimento se encontra parado (Fautrez-Firlefyn, 1951; Benesch, 1969). Dumont et al. (1992) testou a influência do AR na eclosão destes cistos, conseguindo diminuir o tempo de eclosão dos náuplios e aumento da taxa de eclosão. Nesta pesquisa com a branconeta, substitui-se o AR pelo ácido ascórbico (AA), devido às questões já levantadas, percebendo-se haver influência deste composto na eclosão deste outro anostraca.

Quanto ao cálcio ionophore A23187 (CI), sua ação é no desencadeamento dos processos enzimáticos, pelo deslocamento dos íons de Ca^{+2} através da parede do cisto (córion) (Means & Dedman, 1980; Klee et al., 1980; Serlin & Roux, 1984), tendo sido substituído nesta pesquisa pelo hidróxido de cálcio (HC). Tanto na pesquisa de Dumont et al. (1992), como nesta, a presença destes íons influenciaram nos resultados positivamente. Serão discutidos, adiante, os resultados destes dois compostos na eclosão dos náuplios de branconeta, sugerindo suas inclusões nos novos protocolos para este fim.

Os três tratamentos (T1, T2 e T3) dos dois experimentos apresentaram eclosões superiores ao tratamento controle (sem adição dos reagentes). Neste tratamento foi adotado o protocolo sugerido por Lopes (2007). No entanto, as condições de incubação dos cistos destes dois trabalhos foram diferentes: no seu experimento, Lopes (2007) utilizou provetas de 100 mL de volume como incubadoras; neste trabalho, utilizou-se garrafas PET's com 500 mL de volume. Esta diferença de volume, mesmo mantida a mesma concentração de cistos, poderia causar a diferença entre as eclosões obtidas por Lopes (2007), aproximadamente 378.800 náuplios de *D. brasiliensis*/g de cistos, contra 28.333 náuplios/g de cistos, no primeiro experimento (E1), e 29.333 náuplios/g de cistos, no segundo (E2), além da data da coleta.

Lavens & Sorgeloos (1996) sugeriram muita cautela na seleção de lotes de cistos de anostracas, citando o exemplo da *Artemia* sp., recomendaram que se busque tanto uma boa sincronia na eclosão (um máximo de 7 horas entre o primeiro e o último náuplios eclodidos), como uma alta eficiência de eclosão (acima de 200.000 náuplios por grama de cistos), ainda mais que foi demonstrada variação considerável para cistos de várias origens, e até aqueles com a mesma origem.

Além da influência de compostos químicos na aceleração de eclosão de anostracas, outros fatores são levados em conta, afetando a taxa e a eficiência de eclosão. Lavens & Sorgeloos (1996 *op. cit.*) e Vinatea (1997), afirmam que a eclosão de náuplios de anostracas (exemplo, a *Artemia* sp.), depende absolutamente dos fatores físico-químicos presentes durante o período de incubação, tais como: temperatura (25-35°C), salinidade (15-35 ups), pH (ao redor de 8,0), oxigênio dissolvido na água próximo ao ponto de saturação; uma densidade de 2g de cistos/L de água e uma iluminação forte de 2000 lux.

Nos dois experimentos (E1 e E2) foi possível perceber um sincronismo na eclosão (que se refere quantidade de náuplios eclodidos em um curto período de incubação dos cistos, possuindo tamanhos homogêneos) dos náuplios de branconeta nos tratamentos com reagentes (T1, T2 e T3). Em menos de 12 horas de incubação deu início à eclosão dos náuplios. No tratamento Controle, observou-se este processo após 15 a 18 horas de incubação. A presença dos reagentes químicos (AA

e HC) agiu na aceleração e na eficiência de eclosão dos náuplios de branconeta, como observado por Dumont et al. (1992) em seu experimento, utilizando compostos químicos semelhantes a estes.

O experimento I (E1) serviu para que se avaliasse uma das duas variáveis testadas, ou seja, um dos reagentes, enquanto a outra foi mantida constante (neste caso, o HC). O tratamento controle serviu como comparação para os tratamentos, assim como referência entre os dois experimentos conduzidos, pois a similaridade entre suas médias validou a pesquisa (28.333 náuplios/g de cistos em E1 e 29.333 náuplios/g de cistos em E2). No E1, o tratamento definido como o melhor foi T3 (AA igual a 0,02g/L, HC igual a 1,00g/L e 56.667 náuplios eclodidos/g de cistos). Embora a média de eclosão de T3 tenha sido menor que T1 (105.667 náuplios/g de cistos), a concentração de AA é cem vezes menor e estatisticamente os resultados são iguais. Por isto T3 foi definido como o melhor tratamento de E1 (Tabela 5).

Definido a concentração de AA, o segundo experimento (E2) buscou encontrar a concentração do HC a ser adotado no novo protocolo para eclosão de náuplios de branconeta. Os três tratamentos não apresentaram diferença estatística (Tabela 6), definiu-se, então, o tratamento com a segunda melhor média e segunda maior concentração de HC como aquele a ser adotado no novo protocolo, T2. Os critérios que nortearam esta seleção foram: maior eclosão, associado ao emprego de menor quantidade de reagentes, visando à viabilidade econômica, e por que não dizer ambiental, do processo.

O tratamento T2 apresentou a média de eclosão de náuplios de 116.333 em 24 horas de incubação. A concentração de AA deste tratamento foi de 0,02g/L e a concentração de HC foi de 0,10g/L. Silva (2000) realizou uma série de testes, no laboratório para alimentos vivos (LAPAVI) do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), para alcançar uma eficiência de eclosão dos náuplios de *D. brasiliensis*, conseguindo resultados distintos, nos diversos meios de incubação empregados, por um período de 26 horas: 3.600 náuplios/g de cistos, utilizando água de torneira; 21.600 náuplios/g de cistos, com água destilada e uma prévia hidratação dos cistos, e 97.300 náuplios/g de cistos, utilizando água destilada com uma prévia hidratação dos cistos e limpeza por peneiração. Em seus experimentos, este mesmo autor não utilizou nenhum reagente químico para aceleração no processo de eclosão dos cistos de branconeta, realizando apenas a prévia hidratação com água destilada e um tempo maior de incubação dos mesmos.

Yflaar et al. (2003) também realizaram experimentos no LAPAVI da UFRPE, com cistos de branchoneta, onde em um dos seus experimentos, a água utilizada para incubação dos cistos possuía salinidade de 0,0 ups. Neste experimento foi alcançada uma média de 64.000 náuplios/g de cistos em 30 horas de incubação. Em outro experimento, realizado no laboratório do Instituto de Pesquisas Agropecuárias (IPA - PE), utilizando água de poço com salinidade de 5,0 ups, obtiveram uma

eficiência de eclosão de 75.000 náuplios/g de cistos em 52 horas. No método adotado por Yflaar et al. (2003), não houve adição de reagentes químicos para a aceleração da eclosão dos náuplios. Testaram duas concentrações diferentes de salinidade por um período maior de incubação a deste trabalho.

A adição de algum tipo de produto, ou processo químico para a melhoria da eclosão dos cistos de branconeta foi tentado por Lopes (2007), que consistia no desencapsulamento de cistos de *Dendrocephalus brasiliensis*, através do emprego de uma solução com água gelada ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), com hipoclorito de sódio (10% de cloro ativo) e com hidróxido de cálcio (40 g de cristais de NaOH em 100 mL de água destilada), obtendo uma média de eclosão de 5.600 náuplios/g de cistos. Este processo não se mostrou promissor a esta espécie dulciaquícola.

Esta diversidade de resultados sem uma regularidade é o que motiva a necessidade de mais pesquisas para a definição dos mecanismos de eclosão de anostracas. Prophet (1963), Bernice (1972) e Hildrew (1985), afirmaram que apenas parte de uma população de cistos é eclodida. Estes resultados podem variar, proporcionalmente, entre quase zero e perto de 100% (por exemplo, em *Artemia* sp.), onde ambos os valores extremos tendem a ser excepcionais (Austerberry & Bagshaw, 1979; Vanhaecke & Sorgeloos, 1982). Essa variação de eclosão também foi observada no T3 (0,02g AA/L e 1,00g de HC/L) de E1, onde a concentração de reagentes deste tratamento correspondeu à mesma do T1 de E2, apresentando neste E2 uma variação média de eclosão superior a 200% ao primeiro.

Apesar da diversidade dos resultados encontrados nesses experimentos, considerando-se que ainda se detém poucas informações sobre *D. brasiliensis*, abre-se um vasto campo de pesquisas a serem conduzidas, em busca de definir uma metodologia adequada à eclosão da branconeta, de modo que este procedimento seja claro e se torne de fácil aplicação aos produtores, como ocorre com as técnicas de eclosão de cistos de *Artemia* sp.

Ao buscar analisar a influência do ácido ascórbico e dos íons Ca^{+2} na eclosão dos náuplios da Anostraca branconeta *Dendrocephalus brasiliensis*, como substitutos do ácido retinóico e do cálcio ionophore A23187, para sugerir um novo protocolo de eclosão de náuplios deste microcrustáceo, o tratamento T2 do E2 (0,02g de AA/L; 0,1g de HC/L) foi o que apresentou o melhor desempenho geral, sendo este o definido para compor o protocolo ora sugerido, por reunir as vantagens perseguidas: menor emprego de reagentes químicos e apresentar maior eficiência de eclosão dos náuplios de *D. brasiliensis*.

CONCLUSÕES

Existe uma forte influência do ácido ascórbico e dos íons de Ca^{+2} na aceleração e na eficiência do processo de eclosão dos cistos do *Dendrocephalus brasiliensis*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Companhia Hidro Elétrica do São Francisco - CHESF, por dispor as suas instalações e o material biológico para esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Austerberry, C. F. & Bagshaw, J. C. (1979). *Biochemical analysis of developmental failure in Great Salt Lake embryos*. In: J. C. Bagshaw & A. H. Warner (Ed). *Biochemistry of Artemia development* (pp.240). Univ. Microfilms, Ann Arbor.

Balling, R. (1991). CRABP and the teratogenic effects of retinoids. *Trends Genet.*, 7: 35-36.

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

Bernice, R. (1972). Hatching and postembryonic development of *Streptocephalus dichotomus* Baird (Crustacea: Anostraca). *Hydrobiologia*, 40: 251-278.

Dumont, J. H.; Casier, P.; Munuswamy, N. & Walsche, C. (1992). Cyst hatching in Anostraca accelerated by retinoic acid, amplified by Calcium Ionophore A23187, and inhibited by Calcium-channel blockers. *Hidrobiologia*, 230: 1-7.

Fautrez-Firlefyn, N. (1951). Etude cytochimique des acides nucléiques au cours de la gametogenese et des premiers stades du developpement embryonnaire chez *Artemia salina*. *L. Arch. Biol.*, 62: 391-438.

Frota, M. L. C. JR. (2005). *Ação extra nuclear do ácido retinóico via espécies reativas do oxigênio em células de Sertoli* [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Giguere, V.; Ong, E. S.; Segui, P. & Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330: 624-629.

Hildrew, A. G. (1985). A quantitative study of the life history of a fairy shrimp (Branchiopoda: Anostraca) in relation to the temporary nature of its habitat, a Kenyan rainpool. *J. anim. Ecol.*, 54: 99-110.

Klee, C. B., Crouch, T. H. & Richman, P. G. (1980). Calmodulin. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 489-515.

Lavens, P. & Sorgeloos, P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture. In: *FAO Fisheries Technical Paper* (pp. 295). Rome: Anais da FAO, 361.

Lopes, R. N. M.; Freire, R. A. B. & Vicensotto, J. R. M. (1996). Alimentação de larvas de surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (AGASSIZ, 1829) em laboratório na primeira semana de vida. *Boletim Técnico do CEPTA*. 9: 11-29.

Lopes, J. P. (2002). Produção de cistos e biomassa de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta 1921, em viveiros de cultivo [Dissertação de Mestrado]. Recife (PE): Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Lopes, J. P. (2007). 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]. Rio Grande do Norte (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Means, A. R. & Dedman, J. R. (1980). Calmodulin, an intracellular calcium receptor. *Nature*, 285: 73-77.

Mendes, P. P. (1999). *Estatística aplicada à aquicultura: Bagaço*.

Mura, G. (1995). Biometrics and fatty acid composition of resting eggs of *Thamnocephalus platyurus* (Anostraca) in view of an eventual use as fish feed. *Crustaceana*, 68: 629–635.

Pesta, O. (1921). Kritische Revision der Branchipodidensammlung der Wiener Naturhistorischen. *Ann. Mus. Wien.*, 34: 80-98.

Prophet, C. (1963). Some factors influencing the hatching of Anostracan eggs. *Trans. Kansas Acad. Sci.*, 66: 150-159.

Santos, C. G. (2007). *Diferentes itens alimentares na alevinagem do surubim Pseudoplatystoma corruscans* (SPIX & AGASSIZ, 1829) [Dissertação de Mestrado]. Recife. (PE): Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Serlin, B. S. & Roux, S. J. (1984). Modulation of chloroplast movement in the green alga *Mougeotia* by the Ca^{+2} ionophore A23187 and by calmodulin antagonists. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 6368-6372.

Silva, F. M. & Rodrigues, J. B. R. (1997). Efeito da substituição de *Artemia sp.* pelo Nematóide *Panagrellus redivivus* sobre o crescimento e sobrevivência larval do camarão de água doce. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.24 (especial), p.35-48.

Silva, M. D. C. O. (2000). *Caracterização biológica e reprodutiva de Dendrocephalus brasiliensis (Pesta, 1921) (Crustacea, Branchyopoda)* [Trabalho de Conclusão de Curso]. Recife (PE): Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Sorgeloos, P. & Kulakarapandian, S. (1984). Culture of live feed organisms with special reference to *Artemia* culture. In: *Special Publication Cochin* (pp. 40). India: Anais do CMFRI, 15.

Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Léger, P. H.; Tackaert, W. & Versichele, D. (1986). Manual para el cultivo y uso de *Artemia* en acuicultura. In: *Programa Cooperativo Gubernamental* (pp. 350). Itália: Anais do GCP/RLA/075/ITA, 10.

Stappen, V. G. (1996). Use the cyst. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P. (Ed.). *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (pp. 79-123). Rome: FAO Fisheries Technical Paper.

Treese, G. D. (2000). *Artemia* Production for Marine Larval Fish Culture. In: *Southern Regional Aquaculture Center*. Anais do SRAC, 702.

Vanhaecke, P. & Sorgeloos, P. (1982). International Study on *Artemia*. XVIII. The hatching rates of *Artemia* cysts - a comparative study. *Aquacult. Eng.*, 1: 263-273.

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. In: *World Aquaculture in Salvador* (pp. 845). Brasil: Anais do World Aquaculture - WAS, 2.