

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA**

**DINÂMICA DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS  
EM MÚSCULO DE REPRODUTORES, OVÓCITOS E LARVAS DAS ESPÉCIES**

*Brycon orthotaenia* (GÜNTHER, 1864) E

*Prochilodus argenteus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

**EDENILCE DE FÁTIMA FERREIRA MARTINS**

**BELO HORIZONTE**

**2017**

**EDENILCE DE FÁTIMA FERREIRA MARTINS**

**DINÂMICA DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E COMPOSIÇÃO DE LIPÍDEOS  
EM MÚSCULO DE REPRODUTORES, OVÓCITOS E LARVAS DAS ESPÉCIES**

*Brycon orthotaenia* (GÜNTHER, 1864) E

*Prochilodus argenteus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais para a obtenção do título de Doutorado em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal/Aquicultura - Avaliação e/ou simulação de sistemas de produção e reprodução de animais de interesse zootécnico.

Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

**BELO HORIZONTE**

**ESCOLA DE VETERINÁRIA UFMG – 2017**

M386d Martins, Ednilce de Fátima Ferreira, 1987-  
Dinâmica do perfil de ácidos graxos e composição de lipídeos em musculo de reprodutores, ovócitos e larvas das espécies *Brycon Orthotaenia* (Günther, 1864) e *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829) / Ednilce de Fátima Ferreira Martins. – 2017.

84 p. : il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz


Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

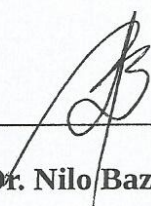
1. Peixe – Reprodução – Teses. 2. Oócitos – Teses. 3. Ácidos graxos – Teses. 4. Lipídeos – Teses. 5. Aquicultura – Teses. I. Luz, Ronald Kennedy. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.31


TESE defendida e aprovada em 22/02/2017 pela comissão organizadora composta pelos seguintes membros:



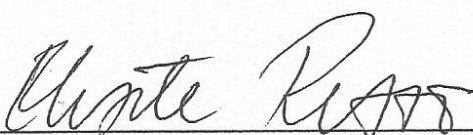
**Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz**



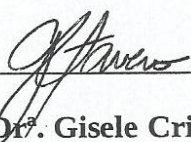
**Prof. Dr. Nilo Bazzoli**



**Dr<sup>a</sup>. Deliane Cristina Costa**



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizete Rizzo**



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele Cristina Favero**

Dedico

A Deus por seu infinito amor e cuidado e por permitir que eu consiga entender e aceitar os planos que Ele tem para minha vida.

Aos meus pais, Adilson Fonseca Martins e Eva de Fátima Ferreira pelo apoio e amor incondicional e por sempre acreditarem na minha vitória.

Ao orientador Dr. Ronald Kennedy Luz, por sua paciência, ensinamentos, confiança depositada e, principalmente, por acreditar que eu seria capaz. Obrigada pela sua orientação.

**“Toda vitória é alcançada com luta e sofrimento, porém a luta passa, o sofrimento é apenas temporário, mas a vitória que se consegue é para sempre”.**

**“Tenha coragem de seguir o que o seu coração e sua intuição dizem, eles já sabem o que você realmente deseja, todo o resto é secundário”.**

**Steve Jobs**

### *Tudo isso é... Saber Viver*

*Quando me amei de verdade, compreendi que em qualquer circunstância, eu estava no lugar certo, na hora certa, no momento exato. E então, pode relaxar.*

*Hoje sei que isso tem nome... Auto-estima.*

*Quando me amei de verdade, pude perceber que minha angústia, meu sofrimento emocional, não passa de um sinal de que estou indo contra minhas verdades.*

*Hoje sei que isso é... Autenticidade.*

*Quando me amei de verdade, parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.*

*Hoje chamo isso de... Amadurecimento.*

*Quando me amei de verdade, comecei a perceber como é ofensivo tentar forçar alguma situação ou alguém apenas para realizar aquilo que desejo, mesmo sabendo que não é o momento ou a pessoa não está preparada, inclusive eu mesmo.*

*Hoje sei que o nome disso é... Respeito.*

*Quando me amei de verdade comecei a me livrar de tudo que não fosse saudável.*

*Pessoas, tarefas, tudo e qualquer coisa que me pusesse para baixo.*

*De início minha razão chamou essa atitude de egoísmo.*

*Hoje sei que se chama... Amor-próprio.*

*Quando me amei de verdade, deixei de temer o meu tempo livre e desisti de fazer grandes planos, abandonei os projetos megalômanos de futuro. Hoje faço o que acho certo, o que gosto, quando quero e no meu próprio ritmo.*

*Hoje sei que isso é... Simplicidade.*

*Quando me amei de verdade, desisti de querer sempre ter razão e, com isso, errei menos vezes.*

*Hoje descobri a... Humildade.*

*Quando me amei de verdade, desisti de ficar revivendo o passado e de preocupar com o futuro.*

*Agora, me mantenho no presente, que é onde a vida acontece.*

*Hoje vivo um dia de cada vez. Isso é... Plenitude.*

*Quando me amei de verdade, percebi que minha mente pode me atormentar e me decepcionar. Mas*

*quando a coloco a serviço do coração,*

*ela se torna uma grande e valiosa aliada.*

*Tudo isso é... Saber Viver!*

*Charles Chaplin*

## **AGRADECIMENTOS**

Talvez a parte mais difícil seja agradecer a todos aqueles que tiveram papel decisivo para que este trabalho chegasse ao fim.

Ao Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz, exemplo de dedicação ao trabalho e conduta ética e moral. Foi um privilégio ter contado com sua orientação.

A co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cintia Nakayama, pela atenção dedicada durante período de doutorado.

Ao Professor Martin Bessonart, Juan Gadea e Larissa Magnone pela colaboração valiosa neste trabalho e nas análises de ácidos graxos.

A PUC e ao Prof. Dr. Nilo Bazzoli e ao técnico Rogério do laboratório de histologia, pela colaboração nas análises de histologia e histoquímica.

A CODEVASF-Três Marias e aos pesquisadores Yoshimi Sato e José Cláudio Epaminondas dos Santos, pelo material biológico e pela ajuda na reprodução dos peixes.

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À FAPEMIG e CNPQ pelos recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação Heloísa e Cibele pela amizade e disposição sempre auxiliando no que fosse preciso, Obrigada!

A toda equipe do laboratório de larvicultura pela paciência e bom trabalho realizado em equipe: Deliane, Cristiano, Angélica, Walisson, Isabela, Lucas, Luciano, Reinaldo, Ana Paula, Natália, Gustavo e Luis Gustavo.

A minhas queridas amigas Fabiana Ferreira e Ana Paula que sempre me apoiaram nas situações mais adversas. Muito obrigada pela amizade de vocês!

Aos amigos adquiridos ao longo do doutorado: Marina, Anne, Welliene, Carol, Cristiano, Deliane, Flávia, Marco, Lilian, Heloisa, Anelise e Ana Carolina, pela desinteressada amizade, constante apoio a todas as minhas iniciativas e pelos momentos de alegria e tristeza que passamos juntas durante esse tempo de convivência.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 <i>Brycon orthotaenia</i> GÜNTHER, 1864 .....	19
2.2 <i>Prochilodus argenteus</i> SPIX & AGASSIZ, 1829.....	20
2.3 LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS .....	21
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 OBJETIVO GERAL .....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
5. Artigo 1 - <b>Description of the composition of fatty acids and lipids in the breeders muscle, oocytes and in the embryonic development of <i>Brycon orthotaenia</i> (Günther, 1864)</b> .....	34
6. Artigo 2- <b>Descrição do perfil de ácidos graxos e composição de lipídeos no músculo de reprodutores, ovócitos e larvas de <i>Prochilodus argenteus</i> (Spix &amp; Agassiz, 1829)</b> .....	59
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	84

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO 1:** Description of the composition of fatty acids and lipids in the breeders muscle, oocytes and in the embryonic development of *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864):

**Table 1.** Total lipid content (% of wet weight) and percentage of neutral and polar lipids in the muscles of female broodstock, oocytes, hatched larvae and first feeding larvae of *Brycon orthotaenia* .....40

**Table 2.** Fatty acid composition of neutral lipids (% of total FA) in female broodstock muscle, oocytes, newly-hatched larvae and first feeding larvae .....42

**Table 3.** Fatty acid composition of polar lipids (% total FA) in in female broodstock muscles, oocytes, newly-hatched larvae and first feeding larvae .....43

**ARTIGO 2:** Descrição do perfil de ácidos graxos e composição de lipídeos no músculo de reprodutores, ovócitos e larvas de *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829):

**Tabela 1.** Composição bromatológica e de ácidos graxos da dieta comercial oferecida aos reprodutores de *Prochilodus argenteus* .....63

**Tabela 2.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do teor de lipídios totais (% de peso úmido) e porcentagem de lipídeos neutros e polares no músculo de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e larvas na primeira alimentação de *Prochilodus argenteus* .....66

**Tabela 3.** Composição de ácidos graxos de lipídeos neutros (% de AG total) em músculos de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e larvas na primeira alimentação .....67

**Tabela 4.** Composição de ácidos graxos de lipídeos polares (% de AG total) em músculos de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e larvas na primeira alimentação .....69

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Via de alongamento e dessaturação dos ácidos graxos linoléico (C18:2n 6) e linolênico (C18:3n 3).....23

**ARTIGO 1:** Description of the composition of fatty acids and lipids in the breeders muscle, oocytes and in the embryonic development of *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864):

**Figure 1.** Photomicrography of oocytes, newly hatched larvae (NHL) and 25h post-hatched larvae of *Brycon orthotaenia* .....45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Arachidonic – ácido araquidônico
<b>CPE</b>	Carp Pituitary Extract
<b>C.V</b>	Coeficiente de Variação
<b>DHA</b>	Docosaheptaenoic- Ácido Docosaheptanóico
<b>EN</b>	Encephalon
<b>EPA</b>	Eicosapentaenoic - Ácido Eicosapentanóico
<b>EY</b>	Eyes
<b>FA</b>	Fatty Acid
<b>FFL</b>	First Feeding Larvae
<b>GV</b>	Yolk Granules
<b>HUFA</b>	Highly Unsaturated Fatty Acids
<b>LN</b>	Neutral Lipids
<b>LP</b>	Polar Lipids
<b>LPA</b>	Larva Primeira Alimentação
<b>LRE</b>	Larva Recém-eclodida
<b>M</b>	Myomeres
<b>MUFA</b>	Monounsaturated Fatty Acids
<b>NHL</b>	Newly-hatched Larvae
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated Fatty Acids
<b>SB</b>	Sudan Black
<b>SFA</b>	Saturated Fatty Acids
<b>YS</b>	Yolk Sac
<b>YSL</b>	Yolk Syncytial Layer

## RESUMO

### **Dinâmica do perfil de Ácidos Graxos e composição de Lipídeos em Músculo de Reprodutores, Ovócitos e Larvas das espécies *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) e *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829)**

O objetivo deste trabalho foi determinar a dinâmica do perfil de ácidos graxos e a composição de lipídeos no músculo de fêmeas, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e larvas na primeira alimentação (LPA) de *Brycon orthotaenia* e *Prochilodus argenteus*. Em *B. orthotaenia*, o lipídeo total manteve-se constante em ovócitos e larvas em diferentes estágios de desenvolvimento. A concentração de lipídeo polar (LP) foi abundante em ovócitos e LRE, enquanto para lipídeo neutro (LN) foram maiores no músculo e menores em ovócitos e LRE. Em lipídeo neutro (LN) menores percentuais de C18:2n 6, maiores de C20:4n 6 (AA – ácido araquidônico) e C22:6n 3 (DHA – ácido docosaexaenóico) foram encontrados em LPA (P<0,05). O músculo das fêmeas apresentou a maior porcentagem de somatório de ácido graxo monoinsaturado ( $\sum$  MUFA). Nos estágios larvais a porcentagem de somatório de ácido graxo poliinsaturado ( $\sum$  PUFA) foi maior (P<0,05). Contudo em LP o C18:3n 3, DHA e AA foram maiores nos estágios larvais e EPA foi não significativo (P>0,05). O  $\sum$  SFA foi maior (P<0,05) nos ovócitos e menor em LPA. Em *P. argenteus*, maior percentual de lipídeo total foi encontrado em ovócitos e LRE. LN e LP mantiveram-se constantes em ovócitos e estágios larvais (P<0,05). LN teve maior porcentagem de C18:2n 6 no músculo (P<0,05) e de C18:3n 3 no músculo e em ovócitos. Maiores porcentagens de AA foram encontrados no músculo e em LPA (P<0,05). O DHA apresentou maiores valores em LRE e LPA. Em LN o  $\sum$  SFA foi maior em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário (P<0,05). Em  $\sum$  MUFA maiores percentuais foram encontrados no músculo, ovócitos e LRE. O  $\sum$  PUFA apresentou maiores percentuais no músculo e LPA (P<0,05). Contudo em LP o C18:2n 6 e AA apresentaram maiores porcentagens no músculo (P<0,05) e o EPA foi maior no músculo e ovócitos. Em LP o  $\sum$  SFA foi maior em LRE e inferior em LPA e no músculo. O  $\sum$  MUFA apresentou maiores porcentagens em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário (P<0,05). Nas duas espécies a evidência de que os ácidos graxos n-3 foram incorporados ao vitelo a partir de fonte dietética fornecida durante a vitelogênese ou de reservas corporais das matrizes que foram mobilizados para os ovócitos. O aumento de DHA reflete o potencial de bioconversão

de ácidos graxos obtendo n-3HUFA a partir de C18:3n 3, demonstrando a importância deste para ambas as espécies durante o desenvolvimento larval.

**Palavras-chave:** reprodução, ácido docosahexaenóico, ácido eicosapentaenoico, ácido araquidônico, desenvolvimento embrionário

## ABSTRACT

### **Dynamics of the profile of fatty acids and lipid composition in muscles of reproducers, oocytes and larvae of *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) and *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829)**

The aim of this work was to determine the dynamics of the fatty acid profile and the lipid composition in muscles of females, oocytes, newly-hatched larvae (NHL) and first-feeding larvae (FFL) of *Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*. In *B. orthotaenia*, the total lipid remained constant in oocytes and larvae at different stages of development. The polar lipid (PL) concentration was abundant in oocytes and NHL, whereas for neutral lipid (NL) were higher in muscle and smaller in oocytes and NHL. In neutral lipid (NL), lower percentages of C18:2n 6, higher of C20:4n 6 (AA – arachidonic acid) and C22:6n 3 (DHA – docosahexaenoic acid) were found in FFL ( $P < 0.05$ ). Female muscles had the highest percentage of monounsaturated fatty acid ( $\sum$  MUFA). In the larval stages the percentage of polyunsaturated fatty acid sum ( $\sum$  PUFA) was higher ( $P < 0.05$ ). However in PL, the C18:3n 3, DHA and AA were higher in the larval stages and EPA was non-significant ( $P > 0.05$ ). The  $\sum$  SFA was higher ( $P < 0.05$ ) in oocytes and lower in FFL. In *P. argenteus*, the highest percentage of total lipid was found in oocytes and NHL. NL and PL remained constant in oocytes and larval stages ( $P < 0.05$ ). NL had a higher percentage of C18:2n 6 in the muscle ( $P < 0.05$ ) and C18:3n 3 in the muscle and oocytes. Higher percentages of AA were found in muscle and in FFL ( $P < 0.05$ ). DHA presented higher values in NHL and FFL. In NL,  $\sum$  SFA was higher in oocytes and during embryonic development ( $P < 0.05$ ). In  $\sum$  MUFA, higher percentages were found in muscle, oocytes and NHL.  $\sum$  PUFA presented higher percentages in muscle and FFL ( $P < 0.05$ ). However in PL, C18:2n 6 and AA had higher percentages in muscle ( $P < 0.05$ ) and EPA was higher in muscle and oocytes. Considering PL,  $\sum$  SFA was higher in NHL and lower in FFL and in the muscle.  $\sum$  MUFA presented higher percentages in oocytes and during the embryonic development ( $P < 0.05$ ). In both species the evidence that n-3 fatty acids were incorporated into the yolk from dietary source provided during vitellogenesis or from body reserves of the reproducers that were prepared to the oocytes. The increase of DHA reflects the potential of bioconversion of fatty acids obtaining n-3HUFA

from C18:3n 3, demonstrating the importance of this for both species during larval development.

**Keywords:** reproduction, docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, arachidonic acid, embryonic development.



## 1. INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento embrionário e larval de peixes, a principal fonte de nutrição é o vitelo (Ronnestad et al., 2003; Finn e Fyhn, 2010; Tocher, 2010). Conhecer a composição do vitelo, em termos de lipídeos e proteínas, é importante, uma vez que esses nutrientes são utilizados como fontes de energia no metabolismo e para o desenvolvimento do embrião (Heming e Buddington, 1988). Além disso, todos os processos que ocorrem nessa etapa causam mudanças nos requisitos nutricionais, bem como na mobilização de fontes de energia (Mello et al., 2012).

Diversos fatores influenciam na composição do saco vitelínico como variações espécie-específicas, além da grande influência proveniente da nutrição fornecida à matriz, que interfere quantitativa e qualitativamente na composição do vitelo. A composição do saco vitelínico é determinante durante o período de alimentação endógena, pois será a única fonte de substrato energético e estrutural (Rainuzza, 1997).

Os lipídeos têm um papel central na taxa de crescimento e no desenvolvimento de larvas de peixes, sendo esta a principal fonte de energia metabólica ao longo dos estágios de desenvolvimentos (Rainuzza, 1997). Os lipídeos armazenados nos ovos fornecem uma grande quantidade de energia (ácidos graxos saturados e monoinsaturados) e ácidos graxos polinsaturados para a síntese de membranas (Alasalvar et al., 2002) e componentes estruturais durante o desenvolvimento das larvas, formando músculos, cérebro e tecidos da retina (Bell e Tocher, 1989; Navarro e Sargent, 1992; Sargent, 1995) e são precursores de moléculas fisiologicamente ativas como prostaglandinas e outros eicosanóides (Bell et al., 1992; Sargent, 1995) até que a alimentação exógena se estabeleça (Ozkizilcik et al., 1996).

Estudos têm demonstrado a importância dos ácidos graxos insaturados como nutrientes essenciais para o desenvolvimento embrionário e larval (Fraser et al., 1988; Watanabe, 1993; Peleteiro et al., 1995) e de ácidos graxos poliinsaturados como componentes estruturais durante a ontogenia e a atividade imunomoduladora (Vargas et al., 2008).

Portanto, conhecer a composição de lipídeos e a dinâmica do perfil dos ácidos graxos no músculo dos reprodutores, ovócitos e larvas é importante para estimar as necessidades nutricionais exógenas das pós-larvas, para que as reservas do saco vitelino possam ser utilizadas com maior eficiência, melhorando as taxas de sobrevivência e auxiliando em futuros estudos de nutrição de reprodutores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Brycon orthotaenia* GÜNTHER, 1864

A espécie *Brycon orthotaenia*, genericamente conhecida como matrinxã, é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco, pertencente à família *Characidae*, da subfamília *Bryconinae*, do gênero *Brycon* (Britski et al., 1988; Reis et al., 2003). Apresenta hábito alimentar onívoro, rápido crescimento e pode alcançar de 0,7 a 1 kg em um ano de cultivo e até 7 kg em vida livre (Godinho e Godinho, 2003).

Caracteriza-se por apresentar o corpo coberto de escamas, pigmentação mais escura no dorso, ligeiramente alaranjada, parte ventral esbranquiçada, flancos levemente prateados e nadadeira caudal e anal de coloração avermelhada com uma mancha negra que se inicia ao nível da nadadeira anal e segue ao final da nadadeira (Sato et al., 2003a). É uma espécie reofílica, caracterizada por um período reprodutivo curto, desova total, não apresenta cuidado parental, sendo que a maturação sexual ocorre aproximadamente aos três anos de idade (Sato et al., 2003b). Os ovócitos apresentam coloração esverdeada, desenvolvimento embrionário rápido, responde positivamente a protocolo de indução, porém é uma espécie muito susceptível a estresse (Sato et al., 2003b).

A matrinxã apresenta fácil adaptação ao cativeiro, sendo uma espécie com potencial para criação em tanques-rede com crescimento homogêneo dos animais (Pedreira et al., 2010). Além disso, podem ser alimentados com dieta desde seus primeiros dias de vida (Pedreira e Sipaúba-Tavares, 2002). No entanto apresenta acentuado canibalismo, nas primeiras horas de vida, prolongando-se por alguns dias e ocasionando drástica redução na sobrevivência (Pedreira et al., 2008).

Também é uma espécie muito apreciada na pesca esportiva, devido a seu comportamento agressivo, apresenta boa qualidade da carne, sabor agradável, ótima aceitabilidade pelo mercado consumidor e uma produção considerável em cativeiro e importante na pesca regional (Sato et al., 2003a).

Contudo, ainda não há dados na literatura sobre a composição de ácidos graxos em ovos e larvas desta espécie.

## 2.2 *Prochilodus argenteus* SPIX & AGASSIZ, 1829

Entre os peixes Characiformes, os representantes da família *Prochilodontidae* se distinguem pela sua abundância nos ambientes em que ocorrem devido à ampla distribuição na América do Sul e pela capacidade migratória (Castro, 1990; Sivasundar et al., 2001; Turner et al., 2004).

No Brasil os *Prochilodontidae* são considerados peixes de importância na pesca artesanal, sendo o Curimatã/Curimatá-pacu/curimba (*Prochilodus argenteus* Spix & Agassiz, 1829) o principal representante do gênero *Prochilodus*. Este peixe é endêmico da bacia do rio São Francisco (Proença e Bittencourt, 1994; Castro e Vari, 2003) e, possivelmente, a maior espécie da família *Prochilodontidae*, podendo atingir mais de 15 kg (Sato e Godinho, 2003; Sato et al., 2003a).

Essa família chegou a representar 20% de todo o pescado capturado nas águas interiores do Brasil, na década de 1980 (Britski et al., 1984). O *P. argenteus* caracteriza-se por apresentar o corpo revestido de escamas, pré-maxilar fixo ao crânio, nadadeira pélvica em posição abdominal e uma nadadeira sem raios localizada entre a dorsal e a caudal (nadadeira adiposa), lábios espessos e protáteis onde se localizam vários denticulos dispostos em duas fileiras na frente das maxilas e numa fileira lateralmente (Britski et al., 1984). Podem ser identificados por possuírem 10 ou 11 fileiras horizontais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral (Britski et al., 1988; Castro e Vari, 2003).

É uma espécie iliófaga detritívora que apresenta dieta constituída basicamente por detrito, com presença de pequenas quantidades de algas filamentosas (Godinho e Godinho, 2003) e fauna bentônica (Castagnolli, 1992). Sua habilidade de explorar esta fonte alimentar confere importância a este grupo devido à sua atuação na ciclagem dos nutrientes oriundos de materiais em decomposição (Flecker, 1996; Baldisserotto e Gomes, 2005).

Na natureza, é uma espécie reofílica, possui desova total, desenvolvimento embrionário rápido e não possui comportamento de cuidado parental (Sato et al., 2003b). As fêmeas crescem mais que os machos, sendo que o período reprodutivo ocorre no período de chuvas mais intensas, entre dezembro a março em condições normais, podendo ocorrer variações de acordo com as condições climáticas (Sato e Godinho, 2003).

Nesse período, formam grandes cardumes e os machos, quando preparados, emitem “roncos”. As fêmeas desovam uma vez por ano, podendo produzir de 200 mil a 2 milhões de ovócitos (Sato, 1999).

Os ovócitos são de coloração cinza, com diâmetro médio de 1,6 mm (Sato, 1999). A primeira maturação sexual pode ocorrer a partir de 200 g de peso corpóreo (Sato, 1999). Não ocorrem desovas em ambientes lênticos (Arantes et al., 2011) e responde positivamente a protocolo de indução hormonal (Sato et al., 1996).

Devido a características zootécnicas de interesse tais como, alta fecundidade, resposta satisfatória à indução a desova, desenvolvimento larval rápido, facilidade no manejo de larvicultura e alta demanda do mercado, a espécie *Prochilodus argenteus* tem potencial para a aquicultura (Sato et al., 2005).

Porém, assim como para o matrinxã, ainda não há dados na literatura sobre a composição de ácidos graxos em ovos e larvas desta espécie.

### **2.3 LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS**

Os lipídeos podem ser definidos como um grupo de compostos quimicamente diferentes entre si que são insolúveis em água e apresentam solubilidade em solventes apolares (Nelson e Cox, 2014). Neste grupo são encontrados triglicerídeos, fosfolipídeos, ceras, ácidos graxos, esteróis, alcoóis graxos, hidrocarbonetos e carotenoides (Regitano-D’Arce, 2006; Nelson e Cox, 2014).

Os lipídeos totais podem ser fracionados em lipídeos neutros (LN) e lipídeos polares (LP). Os lipídeos neutros correspondem entre 50 a 90% dos lipídeos totais, enquanto os triglicerídeos representam de 96 a 98% dos lipídeos neutros (Contreras-Guzmán, 2002). Estes são catabolizados para prover energia metabólica para o desenvolvimento larval (Lovell, 1998) além de fornecer ácidos graxos essenciais, atuam na síntese de membranas como também são importantes moduladores do metabolismo e sinalizadores químicos (Gurr e Harwood, 1991).

Os lipídeos polares tem relação inversa com os lipídeos neutros, correspondendo assim de 5 a 50% dos lipídeos totais. Dentro desta classe estão os fosfolipídeos que representam a maior quantidade e são os principais componentes das membranas biológicas (Contreras-Guzmán, 2002), sendo indispensáveis para inúmeras funções, como crescimento, resistência ao estresse (Nelson e Cox, 2005) e aumento de sobrevivência durante os períodos larvais e de

juvenis (Azarm et al., 2013). Estes são precursores de uma variedade de mediadores biologicamente ativos do metabolismo, como, diacilgliceróis, fosfato de inositol e fatores ativadores de plaquetas (Tocher et al., 2008).

Nas classes de lipídeos temos os ácidos graxos, que são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarboneto variando de 4 a 36 átomos de carbono (Nelson e Cox, 2014). Os ácidos graxos são classificados de acordo com o comprimento da cadeia carbônica, grau de insaturação, presença de metilas ramificadas na cadeia normal, posição da dupla ligação em relação ao grupo metila final e isomeria cis-trans (Nelson e Cox, 2014).

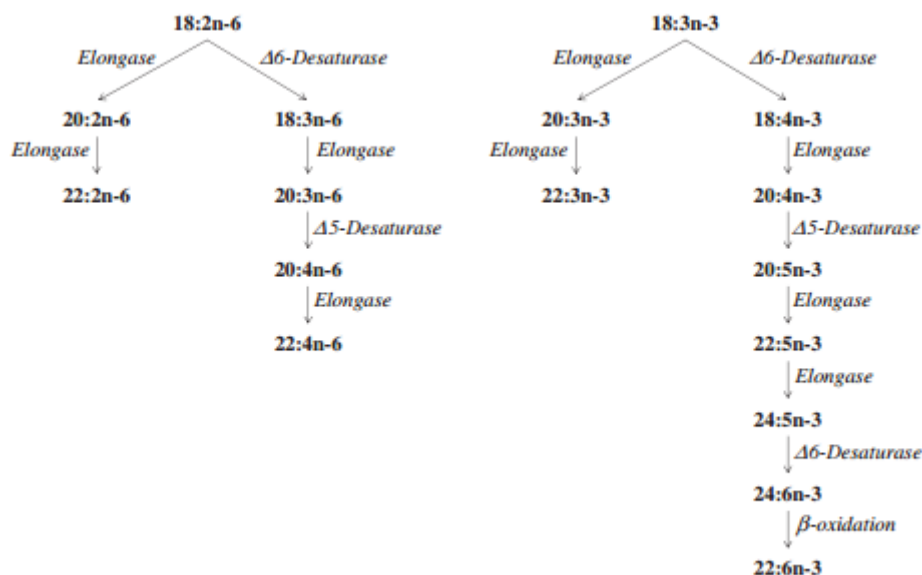
Os ácidos graxos podem ser saturados quando apresentam os carbonos da cadeia conectados com uma ligação simples ou insaturados, quando um ou mais pares de carbonos na cadeia estão ligados por duplas ligações são denominados ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs). Os ácidos graxos que possuem duas ou mais duplas ligações na cadeia carbônica são classificados como ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) e aqueles que possuem cadeia com no mínimo 20 carbonos e quatro duplas ligações são chamados de ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs) (Li et al., 2004).

Entre os ácidos graxos HUFAs, há o ácido docosahexanóico (DHA - C22:6n 3), ácido eicosapentanóico (EPA - C20:5n 3) e ácido araquidônico (AA - C20:4n 6) que constituem importantes componentes estruturais durante o desenvolvimento embrionário e larval, sendo abundantes nas membranas das células, principalmente células cerebrais e retina, além de serem precursores de atividades de moléculas como os eicosanoides (Abi-Ayad et al., 2004).

Os peixes não conseguem realizar a síntese dos PUFAs, como os ácidos graxos C18:2n 6 ou C18:3n 3, pois devem ser fornecidos na dieta para evitar deficiência nutricional (Sargent et al., 2002). Todas as espécies de peixes de água doce possuem a habilidade para converter o ácido linoléico (C18:2n 6) a ácido araquidônico (C20:4n 6) e o linolênico (C18:3n 3) para EPA (20:5n 3) e para DHA (C22:6n 3), através de um caminho que envolve uma série de enzimas dessaturases e elongasses (Sargent et al., 2002; Turchini, 2006), como observado na Figura 1.

Neste sentido, larvas de peixes marinhos necessitam de suplementação de PUFAs como DHA, EPA e AA via dieta dos reprodutores ou diretamente na alimentação das larvas, pois são essenciais para o crescimento durante as fases iniciais de desenvolvimento (Brandsen et al., 2005; Jaya-Ram et al., 2008). Este fato é devido a ausência ou baixa atividade das enzimas  $\Delta$ -6,  $\Delta$ -5 e  $\Delta$ -4 dessaturases e elongasses, que fazem com que espécies marinhas

apresentem baixa ou nenhuma capacidade em alongar e dessaturar os ácidos graxos C18:2n 6 e C18:3n 3 em ácidos graxos de cadeias maiores (Izquierdo, 1996; Tocher, 2010).



**Figura 1.** Via de alongamento e dessaturação dos ácidos graxos linoléico (C18:2n 6) e linolênico (C18:3n 3) (Fonte: Sargent et al., 2002; Nakamura e Nara, 2004; Turchini et al., 2006).

Desde o momento da fecundação até a abertura da boca das larvas, a principal fonte alimentar é o vitelo, que é formado durante a vitelogênese, apresentando na vitelogenina em torno de 19 a 22% de lipídeos e o restante de proteínas (Wiegand, 1996). Neste período as larvas adquirirem características fenotípicas de peixes adultos, acompanhado pelo desenvolvimento de tecidos e órgãos, além da maturação de alguns dos principais sistemas fisiológicos (Mazurais et al., 2011), utilizando os ácidos graxos durante o desenvolvimento, como principal fonte de energia metabólica (Rainuzzo et al., 1997) até que a alimentação exógena esteja estabelecida (Ozkizilcik et al., 1996).

Desta forma, a condição fisiológica das larvas tem uma relação direta com o tamanho do saco vitelínico e sua composição em relação ao tamanho do corpo da larva, densidade e condição nutricional (Balon, 1999). Todos esses aspectos são determinados durante o processo de vitelogênese que pode variar entre as espécies, com a idade, hábito alimentar e qualidade nutricional dos reprodutores durante a formação das gônadas e maturação dos ovários (Balon, 1999).

No processo de gametogênese, os tecidos adiposo e muscular são os de maior importância para que aminoácidos e ácidos graxos sejam transformados pelo fígado em lipídeos e proteínas para os ovócitos (Wiegand, 1996). Este processo implica em intensa proliferação e expansão do retículo endoplasmático no hepatócito, onde ocorre a biossíntese da vitelogenina o que requer grande quantidade de energia metabólica (Sargent, 1995).

Durante a vitelogênese a vitelogenina (fosfoglicolipoproteína) é produzida no fígado e transportada via corrente sanguínea e incorporadas nos ovócitos (Sargent, 1995; Bromage e Roberts, 1995; Mylonas e Zohar, 2001). Dessa forma ocorre à transferência de nutrientes dos reprodutores para os gametas (Sargent, 1995; Bromage e Roberts, 1995).

Os ácidos graxos influenciam na endocrinologia reprodutiva dos peixes. O AA (ácido araquidônico) é precursor de hormônios como os eicosanóides envolvidos em diversas funções bioquímicas e fisiológicas, processos inflamatórios, resposta ao estresse e precursor metabólico de diversas formas de prostaglandinas (Sargent, 1995; Nelson e Cox, 2002; Nelson e Cox, 2014), que estão envolvidas no processo de ruptura folicular e estimulam o comportamento de desova em fêmeas (Baldisseroto, 2002).

Entre os ácidos graxos PUFAs da série n-3, o EPA tem importante função fisiológica na modulação da produção de eicosanóides a partir do AA (Bell et al., 1997). Esta modulação se deve porque o EPA compete negativamente com o sistema de enzimas responsáveis por reações envolvidas na produção das prostaglandinas da série 2 (Sargent, 1995). Estas prostaglandinas, provavelmente, estão envolvidas nos processos de embriogênese, eclosão dos ovos e desenvolvimento larval (Bell et al., 1997).

Mudanças na dinâmica do perfil de ácidos graxos durante o desenvolvimento embrionário e larval podem ser utilizadas como ferramentas para investigar o metabolismo lipídico, no músculo de reprodutores, ovócitos e larvas. Conhecer as alterações metabólicas dos ácidos graxos durante as fases iniciais (ovos e larvas) podem indicar as necessidades nutricionais destas durante o seu desenvolvimento até o início da alimentação exógena (Hemming e Buddington, 1988; Chu e Ozkizilcik, 1995). Assim, a escassez de informação sobre alterações na composição destes constituintes em espécies neotropicais de água doce indicam a necessidade de mais estudos em diferentes espécies.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a composição de lipídeos e a dinâmica do perfil de ácidos graxos no músculo de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e no início da primeira alimentação exógena das espécies *Brycon orthotaenia* e *Prochilodus argenteus*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar lipídeos totais, lipídeos neutros e lipídeos polares no músculo de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e larvas no início da primeira alimentação exógena das espécies *Brycon orthotaenia* e *Prochilodus argenteus*.
  
- Determinar a dinâmica do perfil de ácidos graxos da fração lipídeos neutros e lipídeos polares, no músculo de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas e larvas no início da primeira alimentação exógena das espécies *Brycon orthotaenia* e *Prochilodus argenteus*.



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Ayad, S.M.E.A., Boutiba, Z., Mélard, C., Kestemont, P., 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **30**, 129-136.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* **79**, 145-150.
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N. 2011., Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* **2**, 84-853.
- Azarm, H.M., Kenari, A.A., Hedayati, M., 2013. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquacult. Res.* **44**, 634-644.
- Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2005. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. p. 470. Santa Maria Editora UFSM.
- Baldisserotto, B., 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. p. 211. Santa Maria: Editora UFSM.
- Balon, E., 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). *Environ. Biol. Fish.* **56**, 17-38.
- Bell, J.G., Farndale, B.M., Bruce, M.P., Navas, J.M., Carillo, M., 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid composition of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture.* **149**, 107-119.

- Bell, J.G., Sargent, J.R., Raynard, R.S., 1992. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic (*Salmo salar*). Prostag. Leukotr. Ess. **4**, 197-206.
- Bell, M.V., Tocher, D.R., 1989. Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Biochem. Tokyo. **264**, 909-915.
- Brandsen, M.P., Battaglene, S.C., Morehead, D.T., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., 2005. Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched Artemia. Aquaculture. **243**, 331-344.
- Britski, H.A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Maria: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. p. 1153. (Eds.), Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca.
- Britski, H. A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1984. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para peixes da Bacia do São Francisco, p. 143. (Eds.), Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca.
- Bromage, N.R., Roberts, R.J., 1995. Broodstock management and egg and larval quality. pp. 1-25. Univ.Press. Cambridge.
- Castagnolli, N., 1992. Piscicultura de água doce. p. 189. Jaboticabal: Funep.
- Castro, R.M.C., Vari, R.P., 2003. Family *Prochilodontidae*. In: Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Reis, R. E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. (Eds). Porto Alegre, pp. 65-70. EDIPUCRS.

- Castro, R.M.C., 1990. Revisão taxonômica da família *Prochilodontidae* (Ostariophisy, Characiformes). p. 293. São Paulo, PhD thesis. IB-USP.
- Chu, F.L.E., Ozkizilcik, S., 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comp. Biochem. Phys.* **11**, 665-674.
- Contreras-Guzmán, E.S., 2002. Bioquímica de pescados e invertebrados. p. 308. Santiago (Chile): CECTA-USACH.
- Flecker, A.S., 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, **77**, 1845-1854.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquacult. Res.* **4**, 684-716.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C., Sargent, J.R., 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* **99**, 307-313.
- Godinho, A.L., Godinho, H.P., 2003. Breve visão do São Francisco. In: Godinho, H.P., Godinho, A.L. (Eds.), *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. pp. 15-24. Belo Horizonte: PUC Minas.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., 1991. *Lipid Biochemistry, an Introduction*. 4a edition Chapman e Hall. Fourth Edition.
- Heming, T.A., Buddington, R.K., 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: *Fish Physiology*, ed. Hoar, W.S., Randall, D.J. pp. 407-446. New York: Academic Press.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.* **2**, 183-191.

- Jaya-Ram, A., Kuah, M-K., Lim, P-S., Kolkovski , S., Shu-Chien, A.C., 2008. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*. **277**, 275-281.
- Li, M.H., Robinson, E.H., Manning, B.B., 2004. Nutrition. In: Tucker, C.S., Hargreaves, J.A. *Biology and culture of channel catfish*. *Dev. Aquacult. Fish.Sci.* **34**, 279-323.
- Lovell, T., 1998. *Nutrition and feeding of fish*. p. 267. London: Kluwer Academic Publishers.
- Mazurais, D., Darias, M., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development. *Can. J. Zool.* **89**, 599-611.
- Mello, P.H., Araújo, B.C., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., 2012. Fatty acids as a tool to compare cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Siluriformes: Pimelodidae) and hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) larvae during early development. *Aquacult. Int.* **20**, 1139-1160.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **10**, 463-491.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta-6, delta-5, and delta-9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 345-376.
- Navarro, J.C., Sargent, J.R., 1992. Behavioural differences in starving herring *Clupea harengus* L. larvae correlate with body levels of essential fatty acids. *J. Fish Biol.* **4**, 509-513.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Lehninger: Princípios de bioquímica*. 6a ed. p. 1298. Porto Alegre:Artemed.

- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Lehninger: Principles of biochemistry. p. 1119. Freeman, New York, EUA.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2002. Lehninger: Princípios de bioquímica. 3a ed. p. 687. São Paulo: Sarvier.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.L.E., Place, A.R., 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.* **113**, 631-637.
- Pedreira, M.M., Sampaio, E.V., Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2010. Cultivo de matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) em tanques-rede, em diferentes densidades de estocagem. *Acta Sci. Biol. Sci.* **32**, 17-22.
- Pedreira, M.M., Luz, R.K., Santos, J.C.E., Mattioli, C.C., Silva, C.L., 2008. Larvicultura de matrinxã em tanques de diferentes cores. *Pesq. Agropec. Bras.* **43**, 1365-1369.
- Pedreira, M. M., Sipaúba-Tavares, L. H., 2002. Effect of prey selection and ration addition on the rearing of piracanjuba larvae, *Brycon orbignyanus*. *B. Labor. Hidrob.* **14**, 99-109.
- Peleteiro, J.B., Lavens, P., Rodríguez-Ojea, G., Inglesias, J., 1995. Relationship between egg quality and fatty acid content of various turbot broodstocks (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES Mar. Sci.* **201**, 51-56.
- Proença, C.E.M., Bittencourt, P.R.L., 1994. Seleção de áreas para implantação de projetos de piscicultura. In: Rodrigues, V.A.B. (Ed.). *Manual de Piscicultura Tropical*. pp.71-76. Brasília: IBAMA.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture.* **155**, 103-115.
- Regitano-D'Arce, M.Q.B., 2006. Química básica de lipídeos. In: Oetterer, M. *Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos*. p. 612. Barueri: Manole.

- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., 2003. Check list of the freshwater fishes of outh and Central America. p. 742. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Rønnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. *Aquaculture*. **227**, 147-164.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 2002. The Lipids. In: Halver, J., Hardy, E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier, pp. 181-257. San Diego, California.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Ed.) *Broodstock management and egg and larval quality*. pp. 353-372. London: Blackwell Science.
- Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., Boschi, M.B., Miranda, M.O.T., 2005. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias, southeastern Brazil. *River Res. Appl.* **21**, 939-950.
- Sato, Y., Godinho, H.P., 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. In: *Migratory fishes of South America*. J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross and A. Baer (Eds). pp. 195-232. World Fisheries Trust, vic, Canada.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Nuner, A.P.O., Godinho, H.P., Verani, J.R., 2003a. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: *Águas, peixe e pesca no São Francisco das Minas Gerais*. Godinho, H.P., Godinho, A.L (Eds). pp. 229-374. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Godinho, H. P., 2003b. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, In: Godinho, H. P., Godinho, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e*

pecadores do São Francisco das Minas Gerais, pp. 275-290. Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas.

Sato, Y., Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões. 1999. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal São Carlos, São Carlos.

Sato, Y., Cardoso, E.L., Godinho, A.L., Godinho, H.P., 1996. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. Rev. Brasil. Biol. **56**, 59-64.

Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*, Characiformes) in major South American rivers. Mol. Ecol. **10**, 407-417.

Tocher, D.R. 2010., Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. Aquacult. Res. **41**, 717-732.

Tocher, D.R., Bendiksen, E.A., Campbell, P.J., Bell, J.G., 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture. **280**, 21-34.

Turchini, G.M., Francis, D.S., De Silva, S.S., 2006. Fatty acid metabolism in the freshwater fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) deduced by the whole-body fatty acid balanced method. Comp. Biochem. Phys. **144**, 110-118.

Turner, T.F., McPhee, M.V., Campbell, P., Winemiller, K.O., 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. J. Fish Biol. **6**, 186-201.

Vargas, R.J., Souza, S.M.G., Kessler, A.M., 2008. Replacement of fish oil with oils in diets for jundiá (*Rhamdia quelen*, Gaimard, 1824): effects on performance and whole body fatty acid composition. Aquacult. Res. **39**, 657-665.

Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World. A. S.* **24**, 152-161.

Wiegand, M.D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **6**, 259-286.



## **5. ARTIGO 1**

**Description of the composition of fatty acids and lipids in the breeders muscle, oocytes  
and in the embryonic development of *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864)**

**Description of the composition of fatty acids and lipids in the breeders muscle, oocytes and in the embryonic development of *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864)**

Edenilce de Fatima Ferreira Martins<sup>a</sup>, Larisa Magnone<sup>b</sup>, Martin Bessonart<sup>bc</sup>, Deliane Cristina Costa<sup>a</sup>, José Cláudio Epaminondas dos Santos<sup>d</sup>, Nilo Bazzoli<sup>e</sup>, Cintia Labussièrè Nakayama<sup>a</sup>,  
Ronald Kennedy Luz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup>Laboratorio de Recursos Naturales, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>Estación Experimental de Cultivos Marinos y Acuicultura, Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), Parque Nacional Cabo Polonio s/n, Uruguay

<sup>d</sup> Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Três Marias – CODEVASF, Caixa Postal 11, Três Marias, MG, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Zoologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC Minas, Av. Dom José Gaspar, 500, Coração Eucarístico, Prédio 41., Belo Horizonte, MG, Brazil

\* Corresponding author: Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte-MG, Brasil, CEP. 31270-901. 22

E-mail: luzrk@yahoo.com

**Abstract** - The objective of this work was to evaluate the fatty acid and lipid composition of oocytes, newly hatched larvae (NHL), first feeding larvae (FFL) and muscle tissue of female *Brycon orthotaenia* broodstock. Total and polar lipid was significantly ( $P < 0.05$ ) abundant in oocytes and larvae in different stages of development. The lowest content ( $P < 0.05$ ) of total lipids was found in the muscles, whereas total lipid content of oocytes, NHL and FFL did not show any significant difference. Polar lipid content was different ( $P < 0.05$ ) between NHL and FFL. For the neutral the lowest values of C18:2n 6 occurred during the initial feeding period, whilst C20:4n 6 (AA) exhibited the highest percentage in FFL ( $P < 0.05$ ). C22:6n 3 (DHA) was highest ( $P < 0.05$ ) in FFL. The neutral lipid n-9 and n-6 was highest in muscle of females. The n-3HUFA was highest in NHL and in FFL, n-6HUFA was highest in FFL ( $P < 0.05$ ). The ratios of DHA/EPA were higher ( $P < 0.05$ ) in oocytes and FFL. In fatty acids of polar lipids, C20:5n 3 (EPA) did not show differences ( $P > 0.05$ ) between stages. C18:3n 3 was highest ( $P < 0.05$ ) in NHL and FFL. C20:4n 6 (AA) and C22:6n 3 (DHA) showed the highest percentages during the larval stages. The fatty acids n-3 series was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in FFL. The n-6HUFA was highest during development larval ( $P < 0.05$ ). The increases DHA reflects the ability of the species to elongate and desaturate to obtain n-3HUFA from 18:3n 3, shows the importance of this fatty acid during early development.

**Keywords:** lipid acid content, fatty acid content, yolks, reproduction

## **Introduction**

During embryonic and larval development of fish, the main source of nutrition is the yolk (Ronnestad et al., 2003; Finn and Fyhn, 2010; Tocher, 2010). Knowing the yolk composition, in terms of lipids and proteins, is important since these nutrients are used as energy sources in the metabolism and for the development of the embryo (Heming and Buddington, 1988). In addition, all processes occurring at this stage cause changes to the nutritional requirements, as well as the mobilization of energy sources (Mello et al., 2012).

Lipids play a central role in the growth rate and development of fish larvae, which is a important source of metabolic energy throughout the stages of development (Rainuzzo, 1997). Neutral lipids are stored in the eggs and provide a large amount of energy (saturated and monounsaturated fatty acids) and polyunsaturated fatty acids for the membranes synthesis

(Alasalvar et al., 2002) while polar lipids are structural components during the larval development, forming muscles, brain and tissues of the retina (Bell e Tocher 1989; Navarro e Sargent, 1992; Sargent, 1995) and precursors of physiologically active molecules such as prostaglandins and other eicosanoids (Bell et al., 1992; Sargent, 1995) until initial exogenous feed (Ozkizilcik et al., 1996).

Studies have demonstrated the importance of unsaturated fatty acids as essential nutrients for embryonic and larval development (Fraser et al., 1988; Watanabe, 1993; Peleteiro et al., 1995) and of polyunsaturated fatty acids as structural components during ontogeny and immunomodulatory activity (Vargas et al., 2008).

Freshwater fish, in general, have a number of enzymes that are able to modify the fatty acid profile. This means that many species of fish can transform a certain fatty acid into its long chain correspondent in a process called bioconversion (Henderson, 1996). Therefore, knowing the profile of fatty acids in the muscle of breeders, oocytes and larvae is important in order to estimate the exogenous nutritional needs of larvae, so that the yolk sac reserves may be better used, improving the survival rates and quality of the juveniles.

The "Matrinxã" *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) is an endemic species of the São Francisco River basin, belonging to the *Characidae* family, the *Bryconinae* subfamily and the *Brycon* genus (Britski et al., 1988; Reis et al., 2003). This species is omnivorous and can reach 7 kg of body weight. It is a rheophilic species, characterized by a short reproductive period, total spawning, no parental care and sexual maturity at approximately three years of age (Sato et al., 2003). It adapts easily to captivity, grows rapidly and has potential for cultivation in net cage (Pedreira et al., 2010). However, *B. orthotaenia* exhibits cannibalism from the first hours of life, which may extend for a few days, causing drastic reduction in the survival of larvae (Pedreira et al., 2008).

The objective of this work was to evaluate the fatty acid composition in the muscles of female breeders, oocytes, newly hatched larvae and larvae in the initial feeding period of *Brycon orthotaenia*.

## **Materials and methods**

All experimental procedure were evaluated and approved by the Ethics Commission on Animal Use from the Federal University of Minas Gerais and were in accordance with Protocol number 240/2015/(CEUA/UFMG).

*Brycon orthotaenia* breeders were captured from the São Francisco River and were kept in captivity for one year in a pond (dimension 200 m<sup>2</sup>) at the “Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF)”, Três Marias, Brazil. Fish were fed *ad libitum* once a day with a commercial extruded diet (pellet diameter - 6 mm, 32 % crude protein, 50 g/kg ether extract, 120 g/kg moisture, 70 g/kg fiber matter, 20-30 g/kg calcium and 15 g/kg phosphorus).

### **Spawning and sampling procedure**

To obtain the eggs and larvae for the analyses, 4 males (average weight  $2.8 \pm 0.5$  kg) and 2 females (average weight  $2.2 \pm 0.3$  kg) were subjected to artificial reproduction. The selected females for this presented a swollen abdomen and red genital papilla. Males were selected by semen release. The females received two hormone doses of crude carp pituitary extract (CPE): 0.5 and 5 mg/kg, with twelve hours between doses. The males received a single dose (2.5 mg CPE/kg) at the same time the second one was applied to the females (Ihering, 1935; Zaniboni-Filho and Weingartner, 2007). The 184 degree-hour (average water temperature 26 °C) after last application, gametes were obtained by dry extrusion of the two females, separately. A 7 g sample of oocytes or 17.500 oocytes ( $0.91 \pm 0.04$  mm,  $0.4 \pm 0.01$  mg) from each female was frozen at - 80 °C for future analyses. Each spawning was artificially fertilized by semen obtained from two males. After 10 minutes, eggs were transferred to a conic fiberglass incubator (250 L), with constant water renewal and a flow rate of 50 L/min at  $26.0 \pm 1.0$  °C.

At 20 hr. post-fertilization, 4 g or 6.667 newly-hatched larvae (NHL) ( $3.52 \pm 0.04$  mm,  $0.6 \pm 0.01$  mg) from each spawning were collected and then at 45 hr post-fertilization, 4 g or 4.000 larvae in the initial feeding period (FFL) ( $5.49 \pm 0.31$  mm,  $1.0 \pm 0.01$  mg) were also sampled. The eggs and larvae were directly frozen at - 80 °C until analysis.

The females were euthanized by eugenol anesthetic at a concentration of 285 mg/L, according to CETEA 396/2012 protocol and then samples were collected. Dorsal muscle (10g) from each female was obtained and frozen at - 80 °C until analysis.

## **Lipids and FA analysis**

Lipid and fatty acid analyses were performed at the Natural Resources Laboratory - Institute of Ecology and Environmental Sciences – Montevideo – Uruguay.

Moisture content all samples were lyophilized prior to lipid extraction, in duplicate. Samples were analyzed for total, polar and neutral lipid contents. The fatty acid profiles of the total and polar lipids were determined. Moisture content was determined by drying samples in an oven at 110 °C to constant weight. Extraction of total lipid content was performed using chloroform:methanol (2:1) following the method described by Folch et al. (1957) and quantified gravimetrically. Polar and neutral lipids were separated by adsorption chromatography using silica cartridges (Sep-Pack, Waters S.A., Milford, MA, USA - Sample extraction products). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained using transesterification with methanol in sulphuric acid and then separated and quantified using gas chromatography (Hewlett Packard 5890) (Christie, 1982). Nonadecanoic acid (19:0) was used as internal standard. During lipid and fatty acid analyses, samples were protected from oxidation by maintaining them under a nitrogen atmosphere and using butylated hydroxyl toluene (100 mg/L of solvent). Fatty acid methyl esters were analyzed using a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890; Hewlett-Packard Company, Wilmington, DE, USA) equipped with a flame ionization detector and Supelcowax fused silica capillary column (30 m 9 0.32 mm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA) using nitrogen as a carrier. Samples were injected in split mode at 250 °C. Column temperature was maintained at 180 °C for 12 min, increasing afterwards to 212 °C at a rate of 2 °C/min and maintained at 212 °C for 13 min. Fatty acids were identified by comparing the retention times of methyl esters standards (Supelco) and by reference to a well characterized fish oil.

## **Light microscopy**

Samples of the oocytes, NHL and larvae at initial exogenous feeding were fixed in Bouin's fluid for 24 h at room temperature. Then the tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Transverse histological sections of 5 µm thickness were mounted on glass slides and stained with Sudan black (SB).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System version 8.0 (SAS) statistical package. Data were submitted to a Cramér-von Mises normality test and Levene homoscedasticity test. Logarithmic transformation (natural logarithm) was used for the data that was not normal. Data were tested by one-way ANOVA and compared using Tukey's test at 5% probability.

## Results

The total lipid content and the percentage of neutral and polar lipids in female muscles, oocytes, NHL and FFL are presented in Table 1. The lowest content ( $P<0.05$ ) of total lipids was found in the muscles, whereas total lipid content of oocytes, NHL and FFL did not show any significant difference. The muscle of the females exhibited the highest levels ( $P<0.05$ ) of neutral lipids. Polar lipid content was different ( $P<0.05$ ) between NHL and FFL.

**Table 1.** Total lipid content (% of wet weight) and percentage of neutral and polar lipids in the muscles of female broodstock, oocytes, hatched larvae (NHL) and first feeding larvae (FFL) of *Brycon orthotaenia*

	Muscle	Oocyte	NHL	FFL	C.V (%)
Total lipid	11.72 ± 0.27 <sup>b</sup>	21.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	25.89 ± 0.84 <sup>a</sup>	23.81 ± 0.90 <sup>a</sup>	4.31
Neutral lipid	84.77 ± 1.38 <sup>a</sup>	43.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	47.76 ± 0.26 <sup>c</sup>	56.33 ± 1.30 <sup>b</sup>	2.35
Polar lipid	15.22 ± 1.37 <sup>c</sup>	56.76 ± 0.02 <sup>a</sup>	52.23 ± 0.26 <sup>a</sup>	43.67 ± 1.33 <sup>b</sup>	3.25

Different letters on the same line represent significant differences using Tukey's test ( $P<0.05$ ). Means ( $\pm$  standard deviation)

The fatty acids of the neutral lipids (NL) are presented in Table 2. The C16:0 fatty acid was highest ( $P<0.05$ ) in oocytes and NHL, intermediate in FFL and lowest in the muscle of females. C18:0 was highest ( $P<0.05$ ) in the muscle of females and FFL, intermediate in NHL and lowest in oocytes.

In neutral lipids, among the monounsaturated fatty acid (MUFA), C16:1n 7 was highest in oocytes ( $P < 0.05$ ). The higher contents of C16:1n 9 were found NHL and FFL ( $P < 0.05$ ), whilst the muscle of females and oocytes showed lower and similar values. The fatty acid C18:1n 9 was highest in muscle of females and lower during larval and embryonic development. C18:1n 7 was highest in NHL and FFL, intermediate in oocytes and lowest in muscle of females ( $P < 0.05$ ).

The amount of C18:3n 3, C20:5n 3 (EPA – acid eicosapentaenic) and C22:5n 3 did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) in muscle, oocytes, NHL and FFL. C18:2n 6 had the highest values in muscle of females ( $P < 0.05$ ). C20:4n 6 (AA – acid arachidonic) exhibited higher percentages in FFL ( $P < 0.05$ ), was intermediate in oocytes and NHL and lowest in the muscle of females. The highest percentages of C22:5n 6 was observed in FFL ( $P < 0.05$ ). The fatty acid C22:6n 3 (DHA - acid docosahexaenoic) was highest ( $P < 0.05$ ) in FFL and had lower values in the muscle of females, oocytes and in NHL.

The n-3, n-3/n-6 and EPA/AA series were similar ( $P > 0.05$ ) in muscle, oocytes and both larval stages (Table 2). The fatty acid n-9 was highest ( $P < 0.05$ ) in muscle of females and exhibited lower levels during larval and embryonic development. The n-6 series was highest in muscle and in FFL ( $P < 0.05$ ) and lower in oocytes and NHL. The n-3HUFA was highest ( $P < 0.05$ ) in NHL and FFL. The n-6HUFA was higher in FFL ( $P < 0.05$ ), intermediate in oocytes and NHL and lowest in muscle. The ratio of DHA/EPA was highest ( $P < 0.05$ ) in oocytes and FFL.

The  $\sum$ SFA was similar ( $P > 0.05$ ) in muscle, oocytes and both larval stages. Muscle of females presented the highest percentage of  $\sum$ MUFA, while the lowest percentages of it were exhibited during larval development. In the larval stages, the percentage of  $\sum$ PUFA was higher ( $P < 0.05$ ) compared to the muscle and oocytes.

Fatty acids of polar lipids (PL) are presented in Table 3. During larval development C16:0 was highest ( $P < 0.05$ ) in muscle and oocytes and lowest in NHL and FFL. C18:0 was highest ( $P < 0.05$ ) in oocytes and NHL and showed lower values in muscles and FFL.

In the MUFA fraction of the polar lipids, C16:1n 7 and C18:1n 7 were similar ( $P > 0.05$ ) in the muscles, oocytes and both larval stages (Table 3). C16:1n 9 was highest in muscle and presented lower values in oocytes and during larval development ( $P < 0.05$ ). The amount of the fatty acid C18:1n 9 was highest in oocytes and NHL, intermediate in FFL and lowest in muscle of the females.



**Table 2.** Fatty acid composition of neutral lipids (% of total FA) in female broodstock muscle, oocytes, newly-hatched larvae (NHL) and first feeding larvae (FFL)

	Muscle	Oocytes	NHL	FFL
Fatty acids				
C16:0	27.70 ± 0.83 <sup>b</sup>	43.93 ± 0.97 <sup>a</sup>	40.90 ± 6.76 <sup>a</sup>	37.74 ± 0.71 <sup>ab</sup>
C18:0	9.90 ± 0.27 <sup>a</sup>	4.50 ± 0.26 <sup>c</sup>	7.49 ± 0.72 <sup>b</sup>	11.42 ± 0.63 <sup>a</sup>
∑ SFA	39.90 ± 0.52	51.67 ± 0.65	50.51 ± 7.65	51.28 ± 0.73
C16:1n 7	3.50 ± 0.37 <sup>b</sup>	6.21 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.91 ± 1.00 <sup>b</sup>	3.82 ± 0.19 <sup>b</sup>
C16:1n 9	0.29 ± 0.38 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.11 <sup>a</sup>
C18:1n 9	41.17 ± 0.34 <sup>a</sup>	28.77 ± 1.19 <sup>b</sup>	21.255 ± 0.65 <sup>c</sup>	21.02 ± 0.35 <sup>c</sup>
C18:1n 7	1.48 ± 0.14 <sup>c</sup>	2.14 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.74 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.11 <sup>ab</sup>
∑ MUFA	48.19 ± 0.29 <sup>a</sup>	38.65 ± 1.27 <sup>b</sup>	32.10 ± 1.17 <sup>c</sup>	31.07 ± 0.21 <sup>c</sup>
C18:2n 6	7.54 ± 0.27 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.47 <sup>b</sup>	2.07 ± 0.05 <sup>c</sup>
C18:3n 3	0.43 ± 0.02	1.51 ± 0.18	6.37 ± 5.71	3.05 ± 0.62
C20:4n 6 (AA)	0.47 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.02 ± 0.21 <sup>bc</sup>	1.64 ± 0.47 <sup>b</sup>	3.18 ± 0.14 <sup>a</sup>
C20:5n 3 (EPA)	0.07 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.39 ± 0.31	0.19 ± 0.07
C22:5n 3	0.16 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.30 ± 0.21	0.36 ± 0.01
C22:5n 6	0.21 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.68 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.19 <sup>a</sup>
C22:6n 3 (DHA)	0.44 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.001 <sup>b</sup>	2.51 ± 1.15 <sup>b</sup>	4.16 ± 0.35 <sup>a</sup>
∑ PUFA	11.73 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.92 ± 0.36 <sup>b</sup>	17.15 ± 8.86 <sup>a</sup>	17.54 ± 0.40 <sup>a</sup>
n-9	42.76 ± 0.17 <sup>a</sup>	29.00 ± 1.21 <sup>b</sup>	23.87 ± 0.51 <sup>c</sup>	24.07 ± 0.57 <sup>c</sup>
n-6	9.30 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.25 ± 0.40 <sup>b</sup>	6.50 ± 1.48 <sup>ab</sup>	8.60 ± 0.41 <sup>a</sup>
n-3	1.35 ± 0.003	2.90 ± 0.01	9.76 ± 7.53	7.95 ± 0.49
n-3HUFA	0.83 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.13 <sup>b</sup>	3.39 ± 1.82 <sup>a</sup>	4.88 ± 0.15 <sup>a</sup>
n-6HUFA	1.34 ± 0.03 <sup>c</sup>	2.37 ± 0.20 <sup>bc</sup>	3.82 ± 0.84 <sup>b</sup>	5.99 ± 0.43 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0.14 ± 0.00	0.55 ± 0.03	1.40 ± 0.83	0.92 ± 0.10
DHA/EPA	7.73 ± 3.57 <sup>b</sup>	26.39 ± 3.69 <sup>a</sup>	7.73 ± 3.26 <sup>b</sup>	23.00 ± 9.52 <sup>a</sup>
EPA/AA	0.13 ± 0.07	0.01 ± 0.001	0.21 ± 0.12	0.06 ± 0.02

Values followed by different letters on the same line were significantly different (P<0.05) by Tukey's test. Means (± standard deviation)

Palmitic (C16:0), stearic (C18:0), palmitolic (C16:1n 7), cis-7 hexadecenoic (C16:1n 9), oleic (C18:1n 9), vaccenic (C18:1n 7), linoleic (C18:2n 6), linolenic (C18:3n 3), arachidonic (C20:4n 6) (AA), eicosapentaenoic (C20:5n 3) (EPA), docosapentaenoic (C22:5n 3), docosapentaenoic (22:5n 6),

docosahexaenoic (C22:6n 3) (DHA), saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA), highly unsaturated fatty acid (HUFA)

**Table 3.** Fatty acid composition of polar lipids (% total FA) in in female broodstock muscles, oocytes, newly-hatched larvae (NHL) and first feeding larvae (FFL)

	Muscle	Oocytes	NHL	FFL
Fatty acids				
C16:0	18.66 ± 2.98 <sup>a</sup>	21.04 ± 2.51 <sup>a</sup>	17.23 ± 0.26 <sup>b</sup>	15.65 ± 0.87 <sup>b</sup>
C18:0	8.94 ± 1.32 <sup>b</sup>	16.52 ± 0.27 <sup>a</sup>	13.26 ± 0.95 <sup>a</sup>	9.95 ± 0.65 <sup>b</sup>
∑ SFA	33.36 ± 3.07 <sup>ab</sup>	39.19 ± 2.12 <sup>a</sup>	33.50 ± 1.09 <sup>ab</sup>	29.86 ± 1.93 <sup>b</sup>
C16:1n 7	nd.	0.32 ± 0.45	0.58 ± 0.05	0.84 ± 0.10
C16:1n 9	1.83 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>b</sup>
C18:1n 9	12.74 ± 0.36 <sup>c</sup>	18.86 ± 0.10 <sup>a</sup>	17.81 ± 0.72 <sup>a</sup>	15.06 ± 0.35 <sup>b</sup>
C18:1n 7	nd.	1.20 ± 1.70	1.46 ± 0.04	1.70 ± 0.08
∑ MUFA	24.36 ± 2.83	22.03 ± 1.38	21.52 ± 0.40	20.15 ± 0.42
C18:2n 6	3.40 ± 2.92	2.30 ± 0.20	2.10 ± 0.25	1.90 ± 0.42
C18:3n 3	1.11 ± 0.65 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.64 <sup>b</sup>	8.82 ± 2.87 <sup>a</sup>	10.63 ± 0.62 <sup>a</sup>
C20:4n 6 (AA)	5.54 ± 0.25 <sup>b</sup>	12.36 ± 0.23 <sup>a</sup>	11.87 ± 0.87 <sup>a</sup>	12.99 ± 0.48 <sup>a</sup>
C20:5n 3 (EPA)	0.22 ± 0.21	0.42 ± 0.05	0.40 ± 0.15	0.39 ± 0.11
C22:5n 3	1.03 ± 0.03	0.28 ± 0.35	0.63 ± 0.09	0.67 ± 0.10
C22:5n 6	4.33 ± 0.11	4.81 ± 0.35	4.50 ± 0.55	4.88 ± 0.00
C22:6n 3 (DHA)	7.23 ± 0.24 <sup>b</sup>	13.64 ± 1.32 <sup>a</sup>	12.03 ± 0.18 <sup>a</sup>	13.41 ± 1.97 <sup>a</sup>
∑ PUFA	34.90 ± 7.18	38.714 ± 0.71	44.94 ± 1.47	49.94 ± 2.37
n-9	15.56 ± 2.08 <sup>ab</sup>	19.84 ± 0.02 <sup>a</sup>	18.82 ± 0.57 <sup>ab</sup>	16.32 ± 0.34 <sup>b</sup>
n-6	17.73 ± 2.98	22.86 ± 1.68	22.36 ± 1.66	23.88 ± 0.88
n-3	12.80 ± 1.39 <sup>c</sup>	15.26 ± 0.72 <sup>bc</sup>	21.98 ± 3.31 <sup>ab</sup>	25.27 ± 1.72 <sup>a</sup>
n-3HUFA	10.09 ± 0.16	14.63 ± 1.09	13.15 ± 0.45	14.65 ± 2.33
n-6HUFA	13.52 ± 0.21 <sup>b</sup>	19.75 ± 1.41 <sup>a</sup>	19.36 ± 1.50 <sup>a</sup>	21.12 ± 0.78 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0.72 ± 0.04	0.67 ± 0.08	0.99 ± 0.22	1.05 ± 0.03
DHA/EPA	70.15 ± 31.20	32.33 ± 0.37	32.22 ± 11.76	34.88 ± 4.59
EPA/AA	0.04 ± 0.62	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00

Values followed by different letters on the same line were significantly different ( $P < .05$ ) by Tukey's test. Means (± standard deviation).

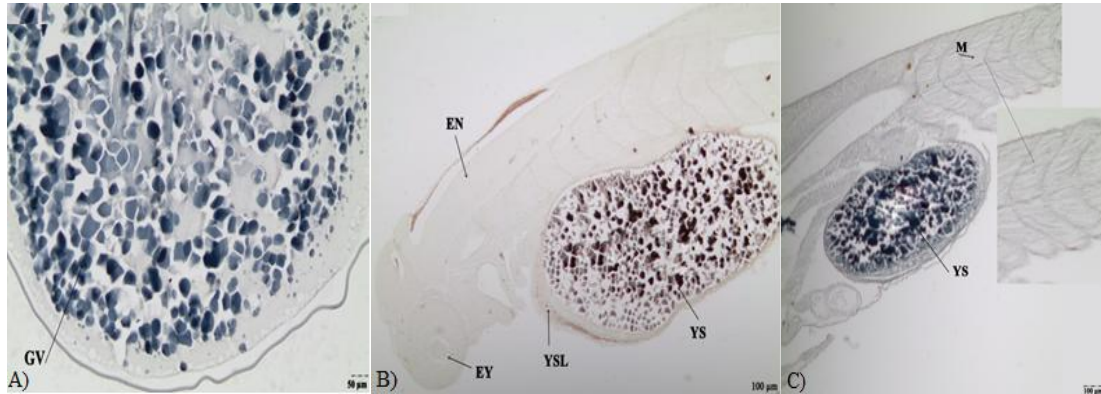
Palmitic (C16:0), stearic (C18:0), palmitoleic (C16:1n 7), cis-7 hexadecenoic (C16:1n 9), oleic (C18:1n 9), vaccenic (C18:1n 7), linoleic (C18:2n 6), linolenic (C18:3n 3), arachidonic (C20:4n 6) (AA), eicosapentaenoic (C20:5n 3) (EPA), docosapentaenoic (C22:5n 3), docosapentaenoic (C22:5n 6), docosahexaenoic (C22:6n 3) (DHA), saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA), highly unsaturated fatty acid (HUFA).

Among the PUFAs, C18:2n 6, C20:5n 3 (EPA), C22:5n 3 and C22:5n 6 were similar ( $P>0.05$ ) in muscle, oocytes, NHL and FFL (Table 3). C18:3n 3 was highest ( $P<0.05$ ) in NHL and FFL and lowest in muscle and oocytes. C20:4n 6 (AA) and C22:6n 3 (DHA) exhibited higher percentages in oocytes and during larval development ( $P<0.05$ ).

The fatty acids n-6, n-3HUFA, n-3/n-6, EPA/AA and DHA/EPA series did not show differences ( $P>0.05$ ) in muscle, oocytes and both larval stages (Table 3). The n-9 was significantly higher ( $P<0.05$ ) in oocytes, intermediate in muscle and NHL and lower in FFL. The n-3 was significantly higher ( $P<0.05$ ) in FFL and lowest in muscle of females. N-6HUFA was higher ( $P<0.05$ ) in oocytes and during larval development ( $P<0.05$ ).

The  $\Sigma$ SFA (Saturated Fatty Acid) was highest ( $P<0.05$ ) in oocytes, intermediate in muscle and NHL and lowest in FFL (Table 3). The  $\Sigma$ MUFA (Monounsaturated Fatty Acid) and  $\Sigma$ PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) showed no statistically significant difference ( $P>0.05$ ) in muscle of females and during larval development.

Using the Sudan black B technique, immunohistochemistry identified lipids in the yolk globules (Figure 1A). In NHL, the early formation of eyes, brain, yolk syncytial layer and the yolk sac with lipids was observed and can be seen in (Figure 1B). Larvae at first feeding (25 h after hatching) showed a prominent yolk sac with a large amount of lipids and myomeres in muscle tissue (Figure 1C).



**Figure 1.** Photomicrography of oocytes, newly hatched larvae (NHL) and 25h post-hatched larvae of *Brycon orthotaenia*. A - vitellogenic oocytes showing the presence of lipid in yolk granules (GV), stained with Sudan black; B – NHL with eyes (EY), encephalon (EN), yolk sac (YS) and yolk syncytial layer (YSL), Sudan black. C - 25 hours post hatched larvae with yolk sac (YS) and myomeres (M), Sudan black.

## Discussion

During the first feeding period, larvae with great amounts of lipids at yolk were found. The presence of yolk approximately 50 hours after fertilization (Nakauth et al., 2016) was also recorded in other species of the same genus *B. amazonicus*. This seems to be a characteristic of the genus *Brycon* which still needs energy reserves at the start of feeding. This energy during the first feeding is important for auxiliary vertical swimming of *B. orbignyanus* larvae (Maciel et al., 2010).

During the early developmental stages, total lipid concentrations in *B. orthotaenia* remained constant. A similar trend was recorded in eggs and larvae of *Pseudoplatystoma reticulatum* and its hybrid *Pseudoplatystoma corruscans x Pseudoplatystoma reticulatum*, carnivorous freshwater species (Mello et al., 2012) and during embryonic development of *Maccullochella macquariensis* and *M. peelii peelii*, freshwater species (Gunasekera et al., 1999).

Neutral lipids were found in smaller quantities in oocytes and newly hatched larvae of *B. orthotaenia*, indicating they are used as the main metabolic fuel for larvae hatching, as observed in *Sparus aurata* (Ronnestad et al., 1994). During the initial feeding period of *B.*

*orthotaenia* larvae, the quantity of neutral lipids was higher when compared to the early stages, while the quantity of polar lipids was lower. However, polar lipids were found in greater quantities in oocytes and newly hatched larvae. In the early stages of life, a greater amount of structural lipids (polar) is needed for organ and tissue formation (Sargent et al., 2002; Tocher, 2010). This may signal the possible role of polar lipids as the substrate used in catabolism and as the main source of energy (Wiegand, 1996). This strategy has the advantage of providing metabolites for neurotransmitter synthesis (Tocher et al., 1985).

The relative increment of PUFA fraction during development of *B. orthotaenia* in the neutral lipids associated with a decrease in MUFA content is evidencing the use of the later for energy production, preserving PUFA for structural functions.

Among the SFAs of the neutral lipid fraction, C16:0 presented higher percentages throughout *B. orthotaenia* embryonic and larval development. The fatty acids are important catabolized substrates in fish embryos (Henderson and Tocher, 1987), which can be used differently during the catabolism of the yolk energy reserves (Wiegand, 1996). The high percentages of C16:0 in the oocytes and NHL also suggest that metabolic energy storage happens in these stages for use in later stages of larval development. Similar results were found during the early development of *P. reticulatum* and its hybrid *P. corruscans* x *P. reticulatum* (Mello et al., 2012) as well as *Diplodus sargus* (Cejas et al., 2004).

The C18:0 fatty acid of the neutral lipid fraction showed higher percentages in the muscle of *B. orthotaenia* breeders as well as at the start of exogenous feeding. In *Perca fluviatilis* (Abi-Ayad et al., 2000), C18:0 was also high in larvae at the start of exogenous feeding. According to Henderson and Sargent (1985), these results may indicate the possible use of C18:0 for Acetyl-CoA synthesis by bioconversion.

The sum of SFA in the polar lipid fraction was highest in *B. orthotaenia* oocytes. C16:0 was the most abundant fatty acid in the muscle of females and oocytes. Other studies have also reported that C16:0 was most abundant in muscles of *Oncorhynchus mykiss* (Kiessling et al., 2001), *Salmo trutta labrax* (Aras et al., 2003a) and *Salmo trutta macrostigma* (Akpınar et al., 2009), a fact that indicates the transfer of nutrients from the female to the oocytes. Studies with *Oreochromis niloticus* (Santiago and Reyes, 1993; Gunasekara et al., 1996) and *Salmo trutta lacustris* (Lahnsteiner et al., 1999) showed that the incorporation of essential nutrients for oocyte development depends on availability in females and that feeding prior to the breeding season influences oocyte quality. Larval development,

C16:0 decreases, indicating its use as the main source of metabolic energy in the early stages of development (Tocher and Sargent, 1984) and as source energy for corium rupture (Wiegand, 1996), as seen in *Salminus hilarii* (Araújo et al., 2012).

In the polar lipid fractions, values of C18:0 fatty acid were highest in oocytes and NHL. The increase or maintenance of this nutrient is associated to its role as membranes component (Fu Lin and Ozkizilcik, 1995; Wiegand, 1996; Gunasekera et al., 1999; Mello et al., 2012). However, the reduction of this fatty acid at the start of exogenous feeding suggests it is used to supply the high energy demand in the free-swimming stage after hatching (Cejas et al., 2004; Giménez et al., 2008) or in membrane formation (Dantagnan et al., 2007).

MUFAs may also be required as an energy source throughout embryonic and larval development (Abi-Ayad et al., 2004; Dantagnan et al., 2007) and they are involved in brain development, as described for *Scophthalmus maximus* (Mourente et al., 1991). The sum of MUFAs of the neutral lipids fraction was highest in *B. orthotaenia* female muscle and decreased during embryonic and larval development, showing either the catabolism of fatty acids of the neutral fraction as a source of energy or its mobilization to form polyunsaturated fatty acids. It is known that in the early feeding period, larvae require energy for swimming and feeding, as seen in *O. mykiss* and *Cyprinus carpio* (Csengeri and Dey, 1995), *Carassius auratus* (Wiegand, 1996), *S. maximus* (Silversand et al., 1996) and *S. hilarii* (Araújo et al., 2012).

The percentage of C16:1n 7 MUFA from the neutral fraction was highest in oocytes and decreased during embryonic development of *B. orthotaenia*, showing that this fatty acid is also being used as an energy source. The MUFAs C16:1n 9 and C18:1n 7 increased in NHL and during the early feeding period, indicating that they are being stored for later use in a period of food restriction and may act as an energy reserve in post yolk absorption larvae (Wiegand, 1996).

In the neutral fraction, C18:1n 9 was most abundant in the muscle and decreased throughout initial development. There is evidence that C18:1n 9 may be involved in regulating gene transcription, reesterification of triglycerides and in inhibiting the consumption of fatty acids (Duplus et al., 2000).

The decrease of SFAs and MUFAs and the increase of PUFAs in PL of developing larvae allow for temporary storage of essential fatty acids which may be employed for structural function. Besides there was a decrease of MUFA 16:1n 9 in the polar fraction

during *B. orthotaenia* embryonic development and C18:1n 9, showed the highest percentage in oocytes and NHL and decreased at the start of exogenous feeding. This may be due to the importance of these fatty acids of the polar fraction in membrane fluidity (Wiegand, 1996) and the formation of most organs and digestive tract (Mello et al., 2012).

The sum of PUFAs of the neutral lipid fraction was highest in larvae. This fact can be explained by the selective oxidation of C16:0 and C18:1n 9 which are used as an energy substrate in the form of mitochondrial ATP through  $\beta$ -oxidation in fish (Henderson et al., 1984a; Henderson et al., 1984b). Studies with *Hippoglossus hippoglossus* (Falk-Petersen et al., 1989), *Sarda sarda* (Ortega and Mourente, 2010) and *S. hilarii* (Araújo et al., 2012) also found higher percentages of PUFA fatty acids in larval stages and this may be related to brain development and cell division (Ansell, 1973).

Among the PUFA fatty acids, C20:5n 3 (EPA) and C22:6n 3 (DHA) deserve special attention. In this study, the highest concentrations of DHA and C22:5n 6 were found in *B. orthotaenia* larvae at the start of exogenous feeding. There was an increase of 20:4n 6 (AA) in larvae at the start of the feeding period and decrease in its precursor, PUFA C18:2n 6, indicating that this species has potential for bioconversion of fatty acids, as also observed in *S. hilarii* (Araújo et al., 2012), *P. reticulatum* and the hybrid *P. corruscans* x *P. reticulatum* (Mello et al., 2012).

In the neutral and polar lipid fractions, the AA fatty acid presented the lowest values in muscle of *B. orthotaenia* females. Its importance is related to the growth, survival and resistance to stress by means of eicosanoid production (Bessonart et al., 1999; Bell and Sargent, 2003; Tocher, 2010). In reproduction, the AA fatty acid is mobilized, metabolized and used as a messenger by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (Van Der Kraak, 1997).

Among the PUFAs of the polar lipid fraction, both DHA and AA remained constant throughout embryonic development. These remain constants due to their main structural function during embryonic development (Mello et al., 2012). In the formation of neural tissues and retina, these being the most abundant fatty acids in eggs and fish larvae (Sargent et al., 2002). Thus, the results of the present study indicate that is no need at this stage for *B. orthotaenia* larvae to use this fatty acid.

The lowest values of C18:3n 3 were found in muscle and oocytes. Fatty acids are mobilized from fat reserves during gametogenesis, they are transferred to the gamete

development in the ovaries and are incorporated as a nutrition source in oocytes, thus serving as a major endogenous food source in embryonic and larval development (Adams, 1999).

During larval development, the fatty acid C18:3n 3 presented its highest percentages and remained constant. These results suggest that n-3 is essential to *B. orthotaenia* larvae, since it acts as a precursor of eicosanoids and is part of the structural phospholipids of cell membranes (Masuda et al., 1999; Sargent et al., 1999a; Tocher, 2010).

The reduction of n-9 in the polar and neutral fractions of *B. orthotaenia* during larval development may indicate the consumption of this class of MUFA for some metabolic demand of this life stage, sparing n-3 and n-6. On the other hand, n-3HUFA and n-6HUFA in the n-6 neutral fraction and n-6HUFA in the n-3 polar fraction increased during larval development, suggesting they are essential for larvae after depletion of their endogenous reserves, similar to *C. auratus* (Wiegand, 1996) and *M. macquariensis* (Gunasekera et al., 1999). This is because these fatty acids form neural tissue, particularly the brain act as structural phospholipids of cell membranes, membranes (such as the myelin sheath), retinas and neuromuscular junctions (Sargent et al., 2002; Tocher, 2010). Besides, some authors found evidence that n-3 HUFA and DHA may be more important and probably essential in larvae of some species of freshwater fish compared with juveniles or adults (Webster and Lovell, 1990; Wirth et al., 1997). These fatty acids could be essential in larvae for having structural functions in cell membranes, particularly in neural tissue (Sargent, 1999a).

In the neutral fraction, the DHA/EPA ratio was highest in *B. orthotaenia* oocytes and larvae at the start of the feeding period. To a marine species, *Acanthopagrus latus*, the DHA/EPA ratio was positively related to hatching and larval survival (Zakeri et al., 2011). Based on the above, this higher ratio in *B. orthotaenia* oocytes and in embryonic and larval development may be important for success during initial development of larvae of freshwater species.

In freshwater species, supplementation of EPA, DHA and AA is not a common practice since it is possible to obtain these HUFAs from the smaller chain fatty acids, such as C18:2n 6 and C18:3n 3 (Tocher, 2010), as this study also suggests for *B. orthotaenia* larvae. The data exhibited in this work report strong evidence of an n-3 requirement during development for the larval nutrition of the species. In this sense, the percentage of C18:3n 3 remained constant throughout *B. orthotaenia* embryonic and larval development, showing the importance of this fatty acid for this species.



The fact that DHA increases its relative levels during development is probably due not only to selective retention but this reflects the ability of the species to elongate and desaturate to obtain n-3HUFA from 18:3n 3.

### **Acknowledgements**

We thanks CAPES-Brazil, CNPq-Brazil and FAPEMIG-Brazil for financial support. R.K. Luz is research fellows of CNPq (Process - 305048/2015-5).

### **References**

- Abi-Ayad, S.M.E.A., Kestemont, P., M elard, C., 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish. Physiol. Biochem.* **23**, 233-243.
- Abi-Ayad, S.M.E.A., Boutiba, Z., M elard, C., Kestemont, P., 2004. Dynamics of total body fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **30**, 129-136.
- Adams, S.M., 1999. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: *Lipids in Freshwater Ecosystems*, (Arts, M.T. and Wainman, B.C., Ed.), pp. 142-145, New York: Springer.
- Akpinar, M.A., G org un, S., Akpinar, A.E., 2009. A comparative analysis of the fatty acid profiles in the liver and muscles of male and female *Salmo trutta macrostigma*. *Food Chem.* **112**, 6-8.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M., 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.* **79**, 145-150.

- Ansell, G.B., 1973. Phospholipids in the Nervous System. In: Form and Function of Phospholipids (Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. and Dawson, R.M.C., Ed.), pp. 377-422, London: Elsevier.
- Aras, N.M., Haliloglu, H.I., Ayık, O., Yetim, H., 2003a. Comparison of fatty acid profiles of different tissues of mature trout (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811) caught from Kazandere Creek in Coruh region, Erzurum, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci. **27**, 311-316.
- Araújo, B.C., Honji, R.M., Mello, P.H., Moreira, R.G., 2012. The influence of captive breeding on the fatty acid profiles of *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) eggs and larvae. Aquacult. Int. **20**, 1161-1181.
- Bell, M.V., Tocher, D.R., 1989. Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Biochem. Tokyo. **264**, 909-915.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., Raynard, R.S., 1992. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic (*Salmo salar*). Prostag. Leukotr. Ess. **4**, 197-206.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture. **218**, 491-499.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M., Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. Aquaculture. **179**, 265-275.
- Britski, A., Sato, Y., Rosa, A.B.S., 1988. Manual de identificação de peixes da região de Três Maria: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. (3. Ed.), pp. 115, Brasília:CODEVASF.

- Cejas, J.R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Felipe, B., Lorenzo, A., 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comp. Biochem. Phys.* **139**, 209-216.
- Christie, W.W., 1982. Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipid. (Eds.), pp. 207, Oxford:Pergamon Press.
- Csengeri, I., Dey, I., 1995. Fatty acid metabolism in carp during early ontogeny. In: Fish and Shellfish Larviculture Symposium (Larvi'95), (Jasper, E. and Roelants, I., Ed.), pp. 161, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication.
- Dantagnan, H., Bórquez, A.S., Valdebenito, I.N., Salgado, I.A., Serrano, E.A., Izquierdo, M.S., 2007. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye Galaxias *maculatus* Jenyns, 1842, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations. *J. Fish Biol.* **70**, 770-781.
- Duplus, E., Glorian, M., Forest, C., 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 30749-30752.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T., Kjørsvik, E., 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.* **101**, 553-556.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquacult. Res.* **4**, 684-716.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Fraser, A.J., Gamble, J.C., Sargent, J.R., 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* **99**, 307-313.

- Fu-Lin, E.C., Ozkizilcik, S., 1995. Lipid and fatty acid composition of striped bass (*Morone saxatilis*) larvae during development. *Comp. Biochem. Phys.* **111**, 665-674.
- Giménez, G., Estévez, A., Henderson, R.J., Bell, J.G., 2008. Changes in lipid content, fatty acid composition and lipid class composition of eggs and developing larvae (0-40 days old) of cultured common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus 1758). *Aquacult. Nutr.* **14**, 300-308.
- Gunasekera, R.M., Shim, K.F., Lam, T.J., 1996. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture.* **146**, 245-259.
- Gunasekera, R.M., De Silva, S.S., Ingram, B.A., 1999. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *M. peelii peelii*. *Aquat. Living Resour.* **12**, 219-227.
- Heming, T.A., Buddington, R.K., 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: *Fish physiology* (Hoar, W.S. and Randall, D.J., Ed.), p. 407-446, New York:Academic Press.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R., Hopkins, C.C.E., 1984a. Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin, *Mallottus villosus*, during sexual maturation and spawning. *Mar. Biol.* **78**, 255-263.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R., Pirie, B.J.S., 1984b. Fatty acid catabolism in the capelin *Mallottus villosus* (Muller) during sexual maturation. *Mar. Biol.* **5**, 115-126.
- Henderson, R. J., Sargent, J. R., 1985. Fatty acid metabolism in fish. In: Cowey, C. B., A. M. Mackie and J. G. Bell., *Nutrition and Feeding in Fish.* (Eds.) pp. 349-364. London, Academic Press.

- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* **26**, 281-347.
- Henderson, R.J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nut.* **49**, 5-22.
- Ihering, R.V., 1935. Die wirkung von Hypophyseinjektion auf den Laichakt von Fischen. *Zoo. Anz.* **111**, 273-279.
- Kiessling, A., Pickova, J., Johansson, L., Åsgård, T., Storebakken, T., Kiessling, K-H., 2001. Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. *Food Chem.* **73**, 271- 284.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiol. Biochem.* **20**, 375-388.
- Maciel, C.M.R.R., Lanna, E.A.T., Maciel junior, A., Donzele, J.L., Neves, C.A., Menin, E., 2010. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae. *Rev. Bras. Zootecn.* **39**, 961-970.
- Masuda, R., Takeuchi, T., Tsukamoto, K., Sato, H., Shimizu, K., Imaizumi, K., 1999. Incorporation of dietary docosahexaenoic acid into the central nervous system of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Brain Behav. Evolut.* **53**, 173-179.
- Mello, P.H., Araújo, B.C., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., 2012. Fatty acids as a tool to compare cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Siluriformes: Pimelodidae) and hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) larvae during early development. *Aquacult. Int.* **20**, 1139-1160.

- Mourente, G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Lipids*. **26**, 871-877.
- Nakauth, A.C.S.S., Villacorta-Correa, M.A., Figueiredo, M.R., Bernardino, G., França, J.M., 2016. Embryonic and larval development of *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829). *Braz. J. Biol.* **76**, 109-116.
- Navarro, J.C., Sargent, J.R., 1992. Behavioural differences in starving herring *Clupea harengus* L. larvae correlate with body levels of essential fatty acids. *J. Fish Biol.* **4**, 509-513.
- Ortega, A., Mourente, G., 2010. Comparison of the lipid profiles from wild caught eggs and unfed larvae of two scombroid fish: northern Bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) and Atlantic bonito (*Sarda sarda* Bloch, 1793). *Fish Physiol. Biochem.* **36**, 461-471.
- Ozkizilcik, S., Chu, F.L.E., Place, A.R., 1996. Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in Striped Bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.* **113**, 631-637.
- Pedreira, M.M., Luz, R.K., Santos, J.C.E., Mattioli, C.C., Silva, C.L., 2008. Larvicultura de matrinxã em tanques de diferentes cores. *Pesq. Agropec. Bras.* **43**, 1365-1369.
- Pedreira, M.M., Sampaio, E.V., Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2010. Cultivo de matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) em tanques-rede, em diferentes densidades de estocagem. *Acta Sci. Biol. Sci.* **32**, 17-22.
- Peleteiro, J.B., Lavens, P., Rodríguez-Ojea, G., Inglesias, J., 1995. Relationship between egg quality and fatty acid content of various turbot broodstocks (*Scophthalmus maximus* L.). *ICES Mar. Sci.* **201**, 51-56.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*. **155**, 103-115.

- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., 2003. Check list of the freshwater fishes of outh and Central America. (PUCRS., Ed.), pp. 742, Porto Alegre:PUCRS.
- Ronnestad, I., Koven, W.M., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Mar. Biol. **120**, 187–196.
- Ronnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-García, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceição, L.E.C., 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent findings. Aquaculture. **227**, 147-164.
- Santiago, C.B., Reyes, O.S., 1993. Effects of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. J. Appl. Ichthyol. **9**, 33-40.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: *Broodstock management and egg and larval quality*, (Bromage, N.R. and Roberts, R.J., Ed.), p. 353-372, Oxford :Blackwell Sciences.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999a. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture. **179**, 217-229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: *Fish nutrition*, (Halver, J.E. and Hardy, R.W., Ed.), pp.181-257, San Diego:Academic Press.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Godinho, H. P., 2003. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, (Godinho, H.P. and Godinho, A.L., Ed.), pp 468, Belo Horizonte:Editora PUC Minas.

- Silversand, C., Norberg, B., Haux, C., 1996. Fatty-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Mar. Biol.* **125**, 269-278.
- Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1984. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids.* **19**, 69-74.
- Tocher, D., Fraser, A., Sargent, J., Gamble, J., 1985. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus L.*). *Lipids.* **20**, 69-74.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquacult. Res.* **41**, 717-732.
- Van Der Kraak, G., 1997. Reproduction. In: *The physiology of fishes*, (Evans, D.H., Ed.), pp. 465-490, London: RC Press.
- Vargas, R.J., Souza, S.M.G., Kessler, A.M., 2008. Replacement of fish oil with oils in diets for jundiá (*Rhamdia quela* Gaimard, 1824): effects on performance and whole body fatty acid composition. *Aquacult. Res.* **39**, 657-665.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World. A. S.* **24**, 152-161.
- Webster, C.D., Lovell, R.T., 1990. Response of striped bass larvae fed brine shrimp from different sources containing different fatty acid compositions. *Aquaculture.* **90**, 49-61.
- Wiegand, M.D., 1996. Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 21-27.
- Wirth, M., Steffens, W., Meinelt, T., Steinberg, C., 1997. Significance of docosa-hexaenoic acid for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Fett-Lipid.* **99**, 251-253.



Zakeri, M., Kochanian, P., Marammazi, J.G., Yavari, V., Savari, A., Haghi, M., 2011. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture*. **310**, 388-394.

Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* **31**, 367-373.

## **6. ARTIGO 2**

**Descrição do perfil de ácidos graxos e composição de lipídeos no músculo de reprodutores, ovócitos e larvas de *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829)**

**Descrição do perfil de ácidos graxos e composição de lipídeos no músculo de reprodutores, ovócitos e larvas de *Prochilodus argenteus* (Spix & Agassiz, 1829)**

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi determinar a dinâmica do perfil de ácidos graxos e a composição de lipídeos no músculo de fêmeas, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e larvas na primeira alimentação (LPA) de *Prochilodus argenteus*. Maiores percentuais de lipídeos totais foram encontrados em ovócitos e LRE. LN e LP mantiveram-se constantes em ovócitos e estágios larvais ( $P < 0,05$ ). LN tiveram maiores porcentagens de C18:2n 6 no músculo ( $P < 0,05$ ) e de C18:3n 3 no músculo e em ovócitos. Maiores porcentagens de AA foram encontrados no músculo e em LPA ( $P < 0,05$ ). O DHA apresentou maiores valores em LRE e LPA. A série n-9 e n-6 apresentaram maiores porcentagens no músculo. E n-3HUFA maiores valores nos estágios larvais e n-6HUFA maior valores no músculo e LPA ( $P < 0,05$ ). Em LN o  $\Sigma$ SFA foi maior em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ) e em  $\Sigma$ MUFA maiores percentuais foram encontrados no músculo, ovócitos e LRE. E  $\Sigma$ PUFA maiores percentuais no músculo e LPA ( $P < 0,05$ ). Contudo em LP o C18:2n 6 e AA apresentou maiores porcentagens no músculo ( $P < 0,05$ ) e o EPA foi maior no músculo e ovócitos. Em LP o  $\Sigma$ SFA foi maior em LRE e inferior em LPA e no músculo. O  $\Sigma$ MUFA apresentou maiores porcentagens em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). Série n-9 apresentou maiores valores em ovócitos e LPA ( $P < 0,05$ ). A série n-6 apresentou maiores porcentagens no músculo e ovócitos ( $P < 0,05$ ). O n-6HUFA apresentaram menores percentuais em LRE. Os ácidos graxos n-3 foram incorporados ao vitelo a partir de fonte dietética fornecida durante a vitelogênese ou de reservas corporais que ficam estocadas antes da vitelogênese que foram mobilizados para os ovócitos. O aumento de DHA reflete a capacidade da espécie para alongar e desaturar obtendo n-3HUFA a partir de C18:3n 3 mostrando a importância deste ácido graxo durante o desenvolvimento precoce.

**Palavras chave:** reprodução, ácido docosaheptaenóico, ácido eicosapentaenoico, ácido araquidônico

## Introdução

Os lipídeos são fundamentais para o desenvolvimento embrionário e larval de peixes (Adams, 1998). Suas principais funções são de armazenamento (energia), estruturais, hormonais, precursores de eicosanoides e bioquímica de membrana (Haliloglu et al., 2004). Para o desenvolvimento embrionário é necessário a transferência de nutrientes dos reprodutores para os gametas, sendo que os ácidos graxos são mobilizados a partir das reservas lipídicas neutras do tecido adiposo da fêmea e são transferidos através da vitelogenia para os ovócitos (Kjorsvik et al., 1990; Sargent, 1995; Bromage e Roberts, 1995).

A quantidade de ácidos graxos presentes em ovócitos e larvas de peixes sofrem variações nas suas concentrações no decorrer do desenvolvimento inicial (Cruzado et al., 2013; Yeganeh et al., 2014) já que os mesmos participam do anabolismo, catabolismo e formação de estruturas e órgãos desses animais (Wiegand, 1996; Sargent et al., 1999b; Finn e Flyhn, 2010).

Entre os ácidos graxos, os poliinsaturados de cadeia longa (PUFA), como o ácido docosahexaenóico (DHA - 22:6n 3), ácido eicosapentaenóico (EPA - 20:5n 3) e ácido araquidônico (AA - 20:4n 6) atuam, principalmente, para manter a integridade estrutural e funcional das membranas celulares, tais como as membranas das junções sinápticas (Sargent et al., 1999a), células do cérebro e da retina (Sargent et al., 2002) e funções fisiológicas na modulação da ação de eicosanoides, permitindo o crescimento e desenvolvimento normal dos peixes e atuando na reprodução (Sargent et al., 1999a).

Contudo, pouco se sabe sobre a dinâmica dos ácidos graxos durante o desenvolvimento inicial de espécies neotropicais, fato que pode contribuir para estudos de nutrição de reprodutores e para a fase de alimentação inicial das larvas.

A espécie *Prochilodus argenteus* é conhecida popularmente como curimatã-pacu. É endêmico do Rio São Francisco podendo atingir até 15 kg de peso corporal (Sato et al., 1996a; Reis et al., 2003; Sato e Godinho, 2003). Esta espécie apresenta hábito alimentar iliófago, alimenta-se de lodo com finos materiais particulados depositados no fundo do rio ou viveiros, tendo sua importância no ambiente natural para a ciclagem de nutrientes (Flecker, 1996; Godinho e Godinho, 2003). É uma espécie reofílica que possui desova total, desenvolvimento embrionário rápido e não possui comportamento de cuidado parental (Sato et al., 2003b). O período reprodutivo estende-se de dezembro a março na estação chuvosa,

coincidindo com a época de cheias, altas temperaturas e longos fotoperíodos (Sato et al., 1996a), responde positivamente a protocolo de indução hormonal (Sato et al., 1996a; Arantes et al., 2011). Além disso, apresenta boa qualidade da carne, sabor agradável e aceitabilidade pelo consumidor.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi conhecer a dinâmica do perfil de ácidos graxos e a composição de lipídeos no músculo das fêmeas, ovócitos e larvas de *P. argenteus*.

## **Material e Métodos**

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética de uso Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, de acordo com o Protocolo nº 240/2015 (CEUA/UFGM).

Os reprodutores selvagens de *Prochilodus argenteus* foram mantidos em cativeiro por um ano em tanques escavados (dimensão 200 m<sup>2</sup>) nas dependências da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco do Parnaíba (CODEVASF) no Município de Três Marias, Brasil. Os peixes foram alimentados *ad libitum* uma vez por dia com uma dieta comercial extrusada - Acqua Pesca Matsuda Minas, com diâmetro de pellet - 6 mm (Tabela 1). A análise bromatológica foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais de acordo com os métodos descritos em The Official Methods of Analysis of AOAC (2016). A análise de ácidos graxos será apresentada adiante.

**Tabela 1.** Composição bromatológica e de ácidos graxos da dieta comercial oferecida aos reprodutores de *Prochilodus argenteus*

<b>Composição analisada</b>	<b>Dieta comercial</b>
Proteína (%)	32,8
Matéria Seca (%)	92,36
Matéria Mineral (%)	10,55
Lipídeos (%PH)	7,17
Lipídeos (%PS)	7,77
Umidade (%)	7,69
Ácidos Graxos	(%) AG em lipídeos total
C16:0	21,96
C18:0	14,00
$\Sigma$ SFA	40,99
C16:1n 7	2,68
C16:1n 9	0,02
C18:1n 9	29,81
C18:1n 7	1,53
$\Sigma$ MUFA	35,33
C18:2n 6	20,39
C18:3n 3	1,31
C20:4n 6 (AA)	0,24
C20:5n 3(EPA)	0,05
C22:5n 3	0,00
C22:5n 6	0,02
C22:6n 3(DHA)	0,17
$\Sigma$ PUFA	23,67
n-9	30,30
n-6	21,03
n-3	2,02
n-3HUFA	0,65
n-6HUFA	0,52
n-3/n-6	0,10
DHA/EPA	3,15
EPA/AA	0,23
DHA/AA	0,71

Palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoléico (C16:1n 7), ácido cis-7 hexadecenóico (C16:1n 9), oleico (C18:1n 9), vacénico (C18:1n 7), linoleico C18:2 n 6), linolênico (C18:3n 3), araquidônico (C20:4n 6) (AA), eicosapentaenóico (C20: 5n 3) (EPA), docosapentaenóico (C22:5n 3), docosapentaenóico (22:5n 6), docosa-hexaenóico (C22:6n 3) (DHA), ácido graxos saturados (SFA), ácido graxo monoinsaturado (MUFA) e ácido graxo poli-insaturado ( PUFA), ácido graxo altamente insaturado ( HUFA). Baseado na matéria seca.

## **Procedimentos de desova e amostragem**

Para a obtenção dos ovócitos e larvas foram utilizados seis machos (peso médio  $2,6 \pm 0,3$  kg) e três fêmeas (peso médio  $1,760 \pm 0,28$  kg), submetidos à reprodução artificial. As fêmeas foram selecionadas segundo características fenotípicas, tais como, abdome inchado e papila genital vermelha. Os machos foram selecionados ocorrendo à liberação de sêmen. As fêmeas receberam duas doses hormonais de extrato hipofisário de carpa (EPC): 0,5 e 5 mg/kg, com intervalo de doze horas entre as doses. Os machos receberam uma dose única (2,5 mg EPC/kg) junto com a segunda aplicação nas fêmeas (Ihering, 1935; Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Após 234 horas-grau, com temperatura média da água de  $26 \text{ }^\circ\text{C}$ , os gametas foram obtidos por extrusão a seco das três fêmeas, separadamente. Uma amostra de 7 g de ovócitos ( $0,91 \pm 0,04$  mm,  $0,4 \pm 0,01$  mg) de cada fêmea foi congelada a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para futuras análises. Cada desova foi artificialmente fertilizada pelo sêmen obtido de dois machos. Após 10 minutos, os ovos foram transferidos para incubadoras cônica de fibra de vidro (250 L), com renovação de água constante de 50 L/min a  $26,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Após 20 h de fertilização, foram coletadas 4 g de larvas recém-eclodidas ( $3,52 \pm 0,04$  mm,  $0,6 \pm 0,01$  mg) de cada desova. O mesmo procedimento foi realizado 45 horas após fertilização larvas no período de alimentação inicial ( $5,49 \pm 0,31$  mm,  $1,0 \pm 0,01$  mg). Todas as amostras foram congeladas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior análise.

As fêmeas foram eutanasiadas utilizando anestésico de eugenol a uma concentração de 285 mg/L e foram coletadas amostras de músculo dorsal (10 g) de cada fêmea e congelado a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  para análise.

## **Análises de lipídeos e ácidos graxos**

As análises de lipídios e ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Recursos Naturais - Instituto de Ecologia e Ciências Ambientais - Montevideu - Uruguai. Todas as amostras foram liofilizadas antes da extração de lipídeos, em duplicata. As amostras foram analisadas quanto ao teor de lipídeo total, polar e neutro. Determinaram-se os perfis de ácidos graxos dos lipídeos neutros e polares. O teor de umidade foi determinado por secagem de amostras em estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  até peso constante. A extração do teor de lipídeo total foi realizada utilizando clorofórmio:metanol (2:1) seguindo o método descrito por Folch et al. (1957) e quantificados gravimetricamente. Os lipídeos polares e neutros foram separados por

cromatografia de adsorção utilizando cartuchos de sílica (Sep-Pack, Waters S.A., Milford, MA, USA). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram obtidos utilizando transesterificação com metanol em ácido sulfúrico e depois foram separados e quantificados por cromatografia gasosa (Hewlett Packard 5890) (Christie, 1982). Utilizou-se o ácido nonadecanóico (19:0) como padrão interno. Durante as análises de lipídeos e ácidos graxos, as amostras foram protegidas da oxidação mantendo-as sob uma atmosfera de azoto (nitrogênio) e utilizando hidroxitolueno butilado (BHT) (100 mg/L de solvente). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados utilizando um cromatógrafo de gás (Hewlett Packard 5890; Hewlett-Packard Company, Wilmington, DE, USA) equipado com um detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica Supelcowax (30 m 9 0.32 mm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA) utilizando nitrogênio como transportador. As amostras foram injetadas a 250 °C. A temperatura da coluna foi mantida a 180 °C durante 12 min, aumentando depois para 212 °C a uma taxa de 2 °C/min e mantida a 212 °C durante 13 min. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos (Supelco) e como referência um óleo de peixe bem caracterizado.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico Statistical Analysis System versão 8.0 (SAS). Os dados foram submetidos a um teste de normalidade de Cramér-von Mises e teste de homocedasticidade de Levene. A transformação logarítmica (logaritmo natural) foi utilizada para os dados que não eram normais. Os dados foram testados por ANOVA e comparados utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Resultados**

Na tabela 2. são apresentadas as porcentagens de lipídeos totais, neutros e polares no músculo, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e no início da alimentação exógena (LPA) de *P. argenteus*. Ovócitos e LRE apresentaram os maiores percentuais de lipídeos totais e o músculo de reprodutores a menor porcentagem ( $P < 0,05$ ). Para lipídeos neutros, maiores percentuais foram verificados no músculo ( $P < 0,05$ ). Em ovócitos e ao longo do desenvolvimento embrionário estes foram menores ( $P < 0,05$ ), porém, semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ). Ao contrário, os lipídeos polares apresentaram menores percentuais no músculo



( $P > 0,05$ ) enquanto em ovócitos, LRE e LPA estes foram maiores ( $P < 0,05$ ) e semelhantes entre si.

**Tabela 2.** Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) do teor de lipídios totais (% de peso úmido) e porcentagem de lipídeos neutros e polares no músculo de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e larvas na primeira alimentação (LPA) de *Prochilodus argenteus*

	Músculo	Ovócitos	LRE	LPA	C.V (%)
Lipídeo Total	10,80 $\pm$ 1,79 <sup>c</sup>	25,61 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	26,61 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	19,90 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>	8,65
Lipídeo Neutro	82,36 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	55,22 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	50,50 $\pm$ 1,26 <sup>b</sup>	62,22 $\pm$ 1,39 <sup>b</sup>	9,81
Lipídeo Polar	17,64 $\pm$ 1,46 <sup>b</sup>	44,78 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup>	49,50 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	37,78 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>	9,62

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A composição dos ácidos graxos de lipídeos neutros (LN) é apresentada na tabela 3. Entre os ácidos graxos saturados (SFA), o C16:0 apresentou maior porcentagem em ovócitos e no desenvolvimento embrionário e valores inferiores no músculo de reprodutores ( $P < 0,05$ ). Já o C18:0 apresentou porcentagens mais elevadas no músculo e LPA ( $P < 0,05$ ).

Para ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) na fração lipídeos neutros, as maiores porcentagens de C16:1n 7 foram encontradas em ovócitos, intermediário em LRE e inferiores em LPA e músculo ( $P < 0,05$ ). Em C18:1n 9 valores mais elevados foram encontrados no músculo e ovócitos e em C18:1n 7 maiores porcentagem foram encontradas em ovócitos e no desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). O C16:1n 9 não foi detectado em LRE e LPA.

Entre os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) da fração lipídeos neutro as maiores porcentagens foram verificados de C18:2n 6 no músculo de reprodutores e inferiores em ovócitos e no desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). O C18:3n 3 apresentou maiores valores no músculo e em ovócitos e valores inferiores em LRE e LPA. Maiores porcentagens de C20:4n 6 (AA) foram encontrados no músculo e em LPA, intermediário em LRE e valores inferiores em ovócitos ( $P < 0,05$ ). O C22:5n 3 apresentou maior porcentagem no músculo, enquanto o C22:6n 3 (DHA) apresentou maiores valores em LRE e LPA ( $P < 0,05$ ). O C20:5n 3 (EPA) e C22:5n 6 não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

No  $\sum$ SFA foram observados maiores porcentagens em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). Em  $\sum$ MUFA maiores porcentagens foram

encontrados no músculo, ovócitos e LRE (P<0,05), em  $\Sigma$ PUFA maiores valores no músculo e em LPA, intermediário em LRE e valores inferiores em ovócitos (P<0,05).

**Tabela 3.** Composição de ácidos graxos de lipídeos neutros (% de AG total) em músculos de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e larvas na primeira alimentação (LPA)

	Músculo	Ovócitos	LRE	LPA
<b>Ácidos Graxos</b>				
C16:0	26,29 ± 1,10 <sup>b</sup>	36,36 ± 3,45 <sup>a</sup>	37,48 ± 1,91 <sup>a</sup>	36,70 ± 1,26 <sup>a</sup>
C18:0	8,63 ± 0,46 <sup>a</sup>	4,42 ± 0,42 <sup>b</sup>	5,76 ± 0,27 <sup>b</sup>	9,71 ± 0,70 <sup>a</sup>
$\Sigma$ SFA	30,19 ± 1,32 <sup>b</sup>	41,21 ± 2,95 <sup>a</sup>	44,06 ± 2,12 <sup>a</sup>	44,46 ± 1,54 <sup>a</sup>
C16:1n 7	7,63 ± 0,35 <sup>b</sup>	11,76 ± 1,96 <sup>a</sup>	10,36 ± 1,63 <sup>ab</sup>	6,53 ± 0,87 <sup>b</sup>
C16:1n 9	0,10 ± 0,06	0,07 ± 0,005	-	-
C18:1n 9	20,19 ± 1,22 <sup>a</sup>	18,10 ± 3,75 <sup>a</sup>	15,06 ± 3,14 <sup>b</sup>	12,49 ± 1,14 <sup>b</sup>
C18:1n 7	4,22 ± 0,06 <sup>b</sup>	6,35 ± 0,17 <sup>a</sup>	6,94 ± 0,36 <sup>a</sup>	5,70 ± 0,81 <sup>a</sup>
$\Sigma$ MUFA	38,08 ± 1,00 <sup>a</sup>	40,99 ± 2,84 <sup>a</sup>	36,93 ± 3,33 <sup>a</sup>	29,13 ± 2,18 <sup>b</sup>
C18:2n 6	10,09 ± 0,80 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,49 <sup>b</sup>	3,71 ± 0,29 <sup>b</sup>	2,89 ± 0,17 <sup>b</sup>
C18:3n 3	1,64 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,54 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,07 <sup>b</sup>
C20:4n 6 (AA)	1,21 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,11 ± 0,16 <sup>a</sup>
C20:5n 3 (EPA)	0,17 ± 0,01	0,05 ± 0,005	0,61 ± 0,21	0,55 ± 0,42
C22:5n 3	0,88 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,13 <sup>b</sup>
C22:5n 6	0,50 ± 0,06	0,16 ± 0,10	0,28 ± 0,007	0,15 ± 0,22
C22:6n 3 (DHA)	1,38 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,08 ± 0,89 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,92 <sup>a</sup>
$\Sigma$ PUFA	22,69 ± 0,96 <sup>a</sup>	12,78 ± 0,48 <sup>c</sup>	13,35 ± 1,54 <sup>bc</sup>	18,34 ± 3,64 <sup>a</sup>
n-9	23,37 ± 1,45 <sup>a</sup>	18,51 ± 3,78 <sup>b</sup>	15,30 ± 3,23 <sup>b</sup>	12,79 ± 1,04 <sup>b</sup>
n-6	14,33 ± 0,88 <sup>a</sup>	6,14 ± 0,77 <sup>b</sup>	6,72 ± 0,13 <sup>b</sup>	6,82 ± 0,49 <sup>b</sup>
n-3	5,55 ± 0,20	2,97 ± 0,25	4,23 ± 1,51	5,11 ± 1,62
n-3HUFA	3,31 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,66 ± 1,45 <sup>a</sup>	4,70 ± 1,63 <sup>a</sup>
n-6HUFA	2,95 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,20 <sup>c</sup>	2,08 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,80 ± 0,45 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0,39 ± 0,02	0,49 ± 0,10	0,63 ± 0,24	0,74 ± 0,21
DHA/EPA	8,11 ± 1,16	10,12 ± 3,75	3,42 ± 0,03	5,67 ± 4,77
EPA/AA	0,14 ± 0,005	0,20 ± 0,01	0,94 ± 0,36	0,47 ± 0,33
DHA/AA	1,15 ± 0,20 <sup>b</sup>	2,05 ± 0,76 <sup>b</sup>	3,25 ± 1,21 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,54 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Média ( $\pm$  desvio padrão). Palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoléico (C16:1n 7), ácido cis-7 hexadecenoico (C16:1n 9), oleico (C18:1n 9), vacénico (C18:1n 7), linoleico (C18:2 n 6), linolênico (C18:3n 3), araquidônico (C20:4n 6) (AA), eicosapentaenóico (C20:5n 3) (EPA), docosapentaenóico (C22:5n 3), docosapentaenóico (22:5n 6), docosa-hexaenóico (C22:6n 3) (DHA), ácido graxos saturados (SFA), ácido graxo monoinsaturado (MUFA) e ácido graxo poli-insaturado (PUFA), ácido graxo altamente insaturado (HUFA).

Os ácidos graxos da série n-3 e as relações n-3/n-6, DHA/EPA, EPA/AA não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). A série n-9 e n-6 apresentaram maiores valores no músculo dos reprodutores ( $P < 0,05$ ), o n-3HUFA apresentou maiores valores em LRE e LPA. O n-6HUFA apresentam maiores porcentagens no músculo e em LPA, intermediários em LRE e inferiores em ovócitos ( $P < 0,05$ ). Os maiores valores da relação DHA/AA foram encontrados em LRE e LPA ( $P < 0,05$ ).

Os ácidos graxos da fração lipídeos polares (LP) são apresentados na tabela 4. Entre os SFA, o C16:0 apresentou maiores valores em ovócitos e LRE, valores intermediários no músculo e inferiores LPA houve ( $P < 0,05$ ). O C18:0 apresentou maiores valores em ovócitos e ( $P < 0,05$ ).

Para MUFA na fração lipídeos polares, maiores porcentagens foram verificadas para C18:1n 9 e C18:1n 7 em ovócitos e LPA. As menores porcentagens de C18:1n 7 foi verificada em LRE ( $P < 0,05$ ). O C16:1n 7 e C16:1n 9 não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ), sendo que o C16:1n 9 não foi detectado em LPA.

Entre os PUFAs da fração lipídeos polares as maiores porcentagens foram verificadas para C18:2n 6 e C22:5n 6 no músculo, com menores valores nos ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). Para o C20:4n 6 (AA) maiores porcentagem foram encontrados no músculo, intermediárias em LPA e inferiores em ovócitos e LRE ( $P < 0,05$ ). O C20:5n 3 (EPA) foi maior no músculo e ovócitos e inferior durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). O C18:3n 3, C22: 5n 3 e o C22:6n 3 (DHA) não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

O  $\sum$ SFA foi observado maiores porcentagens em LRE e inferiores em LPA e no músculo. O  $\sum$ MUFA apresentou maiores porcentagens em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário e valores inferiores no músculo ( $P < 0,05$ ). O  $\sum$ PUFA não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Composição de ácidos graxos de lipídeos polares (% de AG total) em músculos de reprodutores, ovócitos, larvas recém-eclodidas (LRE) e larvas na primeira alimentação (LPA)

	Músculo	Ovócitos	LRE	LPA
Fatty acids				
C16:0	18,71 ± 2,03 <sup>ab</sup>	21,24 ± 1,58 <sup>a</sup>	25,56 ± 9,17 <sup>a</sup>	15,86 ± 0,51 <sup>b</sup>
C18:0	9,09 ± 0,59 <sup>b</sup>	12,25 ± 0,39 <sup>a</sup>	8,94 ± 2,23 <sup>b</sup>	8,08 ± 0,20 <sup>b</sup>
∑ SFA	34,17 ± 1,67 <sup>c</sup>	40,22 ± 1,02 <sup>b</sup>	43,25 ± 5,20 <sup>a</sup>	38,35 ± 3,04 <sup>c</sup>
C16:1n 7	1,43 ± 0,12	2,13 ± 0,71	4,62 ± 3,92	2,39 ± 0,09
C16:1n 9	0,49 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,19 ± 0,01	-
C18:1n 9	5,93 ± 0,78 <sup>b</sup>	10,89 ± 0,86 <sup>a</sup>	5,01 ± 1,04 <sup>b</sup>	9,76 ± 0,57 <sup>a</sup>
C18:1n 7	2,99 ± 0,25 <sup>b</sup>	4,53 ± 0,45 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,31 ± 0,47 <sup>a</sup>
∑ MUFA	13,46 ± 1,48 <sup>b</sup>	20,18 ± 0,75 <sup>a</sup>	22,23 ± 7,98 <sup>a</sup>	18,60 ± 1,11 <sup>a</sup>
C18:2n 6	8,92 ± 1,06 <sup>a</sup>	5,56 ± 0,78 <sup>b</sup>	4,60 ± 0,66 <sup>b</sup>	4,49 ± 0,22 <sup>b</sup>
C18:3n 3	0,71 ± 0,08	0,43 ± 0,07	0,44 ± 0,01	0,37 ± 0,01
C20:4n 6 (AA)	9,45 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,03 ± 0,57 <sup>b</sup>	3,65 ± 2,51 <sup>b</sup>	6,51 ± 0,77 <sup>ab</sup>
C20:5n 3 (EPA)	4,39 ± 0,71 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,34 ± 1,55 <sup>b</sup>	2,84 ± 0,91 <sup>b</sup>
C22:5n 3	2,76 ± 0,08	2,44 ± 0,18	1,96 ± 1,07	2,30 ± 0,74
C22:5n 6	4,46 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,65 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,76 <sup>b</sup>	1,94 ± 0,21 <sup>b</sup>
C22:6n 3 (DHA)	9,94 ± 0,63	13,22 ± 0,96	9,35 ± 5,96	14,37 ± 4,45
∑ PUFA	50,65 ± 1,92	40,53 ± 1,19	34,97 ± 17,11	43,78 ± 2,00
n-9	7,76 ± 0,98 <sup>b</sup>	11,22 ± 0,75 <sup>a</sup>	5,42 ± 0,75 <sup>c</sup>	9,92 ± 0,54 <sup>a</sup>
n-6	28,93 ± 1,98 <sup>a</sup>	19,68 ± 2,88 <sup>a</sup>	15,06 ± 6,13 <sup>b</sup>	18,29 ± 1,29 <sup>b</sup>
n-3	18,86 ± 1,25	20,29 ± 1,53	14,93 ± 8,75	21,22 ± 6,41
n-3HUFA	18,09 ± 1,38	19,77 ± 1,59	14,45 ± 8,73	20,80 ± 6,59
n-6HUFA	17,30 ± 0,61 <sup>a</sup>	11,48 ± 1,75 <sup>a</sup>	8,55 ± 5,05 <sup>b</sup>	12,86 ± 1,30 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0,66 ± 0,07	1,03 ± 0,25	0,99 ± 0,30	1,16 ± 0,40
DHA/EPA	2,27 ± 0,23 <sup>c</sup>	4,11 ± 0,44 <sup>b</sup>	4,02 ± 0,33 <sup>b</sup>	5,06 ± 0,22 <sup>a</sup>
EPA/AA	0,46 ± 0,07	0,64 ± 0,18	0,64 ± 0,18	0,43 ± 0,10
DHA/AA	1,05 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,63 ± 0,50 <sup>a</sup>	2,56 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,52 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste de Tukey (P < 0,05). Média (± desvio padrão)

Palmitico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoléico (C16:1n 7), ácido cis-7 hexadecenóico (C16:1n 9), oleico (C18:1n 9), vacénico (C18:1n 7), linoleico C18:2 n 6), linolênico (C18:3n 3), araquidônico (C20:4n 6) (AA), eicosapentaenóico (C20:5n 3) (EPA), docosapentaenóico (C22:5n 3), docosapentaenóico (22:5n 6), docosahexaenóico (C22:6n 3) (DHA), ácido graxos saturados (SFA), ácido graxo monoinsaturado (MUFA) e ácido graxo poli-insaturado (PUFA), ácido graxo altamente insaturado (HUFA).

Os ácidos graxos da série n-3, n-3HUFA e as relações n-3/n-6 e EPA/AA não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ). A série n-9 apresentou maiores valores em ovócitos e LPA e inferiores em LRE ( $P < 0,05$ ). A série n-6 apresentou maiores porcentagens no músculo e ovócitos e valores inferiores durante o desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). A série n-6HUFA apresentou os menores valores em LRE ( $P < 0,05$ ). Na relação DHA/EPA maiores porcentagens foram encontrados em LPA, intermediários em ovócitos e LRE e inferiores no músculo de reprodutores. Já na relação DHA/AA maiores porcentagens foram encontrados em ovócitos, LRE e LPA ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

Os lipídeos apresentam uma importante relação com múltiplas funções durante o desenvolvimento embrionário e larval, atuando como fonte de energia metabólica para os peixes e para a formação de órgãos e tecidos (Sargent et al., 1999a; Sargent et al., 1999b; Izquierdo et al., 2000; Tocher, 2003). Durante o desenvolvimento inicial, os lipídeos presentes no saco vitelínico serão utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento do embrião (Heming e Buddington, 1988; Wiegand, 1996). Este fato foi verificado no presente estudo, onde foram registradas porcentagens mais elevadas de lipídeos totais em ovócitos e LRE e menores em LPA. Em *Carassius auratus* (Wiegand, 1996), *Maccullochella macquariensis* e *M. peelii peelii* (Gunasekera et al., 1999) também foi verificado a redução dos lipídeos totais, indicando o catabolismo deste nutriente para a produção de energia durante o desenvolvimento larval.

Porém, a quantidade de lipídeos polares e neutros em ovócitos, LRE e LPA se mantiveram constantes. Ao contrário do verificado para os lipídeos totais. Os lipídeos polares são os principais componentes das membranas biológicas (Contreras-Guzmán, 2002), sendo indispensáveis para inúmeras funções, como crescimento, resistência ao estresse (Nelson e Cox, 2005) e aumento de sobrevivência durante os períodos larvais e de juvenis (Azarm et al.,

2013), enquanto os lipídeos neutros são catabolizados pra prover energia metabólica para o desenvolvimento larval (Lovell, 1998) além de fornecer ácidos graxos essenciais, atuar na síntese de membranas como também são importantes moduladores do metabolismo e sinalizadores químicos (Gurr e Harwood, 1991). Este fato sugere que esta espécie pode estar armazenando os ácidos graxos para a fase de início de alimentação exógena, quando há a necessidade de busca por alimento exógeno (Watanabe e Kiron, 1994).

Entretanto, no músculo de reprodutores de *P. argenteus* foram encontrados menores porcentagens de lipídeos totais e lipídeos polares. Este fato pode estar relacionado com a espécie e hábito alimentar (Aras et al., 2003a; Aras et al., 2003b), idade e dieta oferecida aos peixes (Kiessling et al., 1991a). Conseqüentemente, as porcentagens de lipídeos neutros foram maiores no músculo, cerca de 82 %, e estão de acordo com o encontrado na maioria das espécies, onde os lipídeos neutros somam cerca de 90% dos lipídeos totais (Wiegand, 1996).

Na fração LN, o C16:0 foi maior em ovócitos e durante o desenvolvimento embrionário indicando armazenamento e não utilização como fonte de energia metabólica, já que este é um importante substrato catabolizado em embriões de peixes (Henderson e Tocher, 1987). Entretanto, o C18:0 da fração LN apresentou maiores porcentagens no músculo e LPA de *P. argenteus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Abi-Ayad et al. (2000) com *Perca fluviatilis*. Desta forma, é possível o uso do C18:0 para a síntese de acetil-CoA por bioconversão (Henderson e Sargent, 1985).

Na fração LP o C16:0 foi o ácido graxo mais abundante no músculo de fêmeas, ovócitos e em LRE. Isso sugere que nestas fases ocorre armazenamento energético metabólico para utilização nas fases subsequentes do desenvolvimento larval e formação de tecidos como já discutido anteriormente para o C16:0 na fração LN. Estes resultados também indicam a transferência de nutrientes da mãe para os ovócitos, uma vez que há uma relação entre a nutrição e a qualidade das proles onde as reservas dos reprodutores podem ser mobilizadas e transportadas para os ovócitos (Harvey e Carosfeld, 1993). As reservas mobilizadas são utilizadas como fontes de nutrientes no período inicial de desenvolvimento embrionário (Mazorra et al., 2003) e no período em que as larvas permanecem dependentes das reservas endógenas, até o desenvolvimento funcional do trato digestório, quando inicia a alimentação exógena (Watanabe e Kiron, 1994). Estudos realizados com *Oreochromis niloticus* (Gunasekara et al., 1996) e *Salmo Trutta lacustris* (Lahnsteiner et al., 1999) relataram que a incorporação de nutrientes essenciais para o desenvolvimento de ovócitos, dependendo da

disponibilidade destes nas fêmeas e que a alimentação que antecede o período reprodutivo influencia na qualidade dos ovócitos. Desta forma a nutrição dos reprodutores é de suma importância para a produção de embriões e larva de qualidade (Tocher, 2010). Porém, a redução em LPA de C16:0 pode ser devido a utilização como fonte de energia metabólica como também foi observado em *Dentex dentex* (Tulli e Tibald, 1997) e *Sarda sarda* (Ortega e Mourente, 2010).

O C18:0 da fração LP apresentou maiores valores em ovócitos e redução ao longo do desenvolvimento embrionário. Isso pode ser devido a sua exigência como componente de membrana (Gunasekera et al., 1999; Dantagnan et al., 2007; Mello et al., 2012) ou a sua utilização como fonte de energia no momento da eclosão que exige alto fluxo e consumo de energia para o rompimento do córion (Zhu et al., 2002) e para natação após eclosão (Cejas et al., 2004; Gimenez et al., 2008).

Os MUFAs também podem ser requeridos como fonte de energia ao longo do desenvolvimento embrionário e larval (Tulli e Tibaldi, 1997; Abi-Ayad et al., 2004; Dantagnan et al., 2007). Estes desempenham importante papel na sinalização do hipotálamo sobre o estado nutricional dos animais, provocando respostas íntegras e compensatórias em fases de desenvolvimento larval ou fase adulta (Lam et al., 2005). Entre os ácidos graxos monoinsaturados da fração lipídeos neutros, o C16:1n 7 apresentou maiores porcentagens em ovócitos e reduziu ao longo do desenvolvimento embrionário de *P. argenteus*. Esta redução mostra que este ácido graxo está sendo catabolizado como fonte de energia ou sendo mobilizado para formar outros ácidos graxos de cadeias maiores. Relatos semelhantes foram observados na espécie marinha *Scophthalmus maximus* (Mourente et al., 1991) e na espécie de água doce *C. auratus* (Wiegand, 1996).

Já o C18:1n 9 foi superior no músculo de fêmeas e em ovócitos, indicando transferência de nutrientes da mãe para os ovócitos, fato que pode ser reflexo das altas porcentagens deste ácido graxo na dieta. Estes resultados elucidam a importância da nutrição materna em transferir lipídeos e ácidos graxos (Terova et al., 1998). A redução de C18:1n 9 em LPA também evidencia que este ácido graxo pode estar sendo catabolizado como fonte de energia, já que na fase de LPA ocorre maior demanda energética para natação e busca pelo alimento, como observado para o C16:1n 7 no presente estudo.

O C18:1n 7 foi mais abundante ao longo do desenvolvimento larval. De acordo com Wiegand (1996) isso demonstra que este ácido graxo pode estar sendo armazenado para

posterior utilização durante um possível período de restrição alimentar ou atuando como reserva de energia nas larvas pós absorção do vitelo como verificado para outros ácidos graxos já discutidos anteriormente.

Na fração LP C18:1n 9 e o C18:1n 7 apresentaram menores porcentagens em LRE. Na eclosão há grande demanda de energia como substratos para o rompimento do córion (Wiegand, 1996), como verificado em *Salminus hilarii* (Araújo et al., 2012). Esses ácidos graxos também são importantes na fluidez de membrana (Wiegand, 1996) e na formação da maior parte dos órgãos e do trato digestório (Mello, 2009). São importantes também para o desenvolvimento do cérebro como descrito na espécie *S. maximus* (Mourente et al., 1991).

Entre os ácidos graxos polinsaturados, o C18:2n 6 da fração de LN e LP apresentaram maiores valores no músculo de fêmeas enquanto o C18:3n 3 da fração LN foi mais abundante no músculo e em ovócitos. Esses resultados mostram que esses ácidos graxos são incorporados ao vitelo a partir de fonte dietética fornecida durante a vitelogênese ou de reservas corporais que ficam estocadas antes da vitelogênese e são mobilizados para os ovócitos (Wiegand, 1996). Este fato indica a importância da composição destes ácidos graxos na dieta a ser oferecido aos reprodutores, sendo que no presente estudo a dieta continha grande quantidade total de C18:2n 6. A redução de C18:3n 3 em LRE e LPA e o aumento na porcentagem de DHA nas respectivas fases, evidencia o potencial de bioconversão de ácidos graxos nesta espécie, através da atividade de enzimas dessaturases e elongases (Ling et al., 2006; Jaya-Ram et al., 2008; Tocher, 2010), como o observado em *Maccullochella peelii peelii* (Turchini et al., 2006) espécie de água doce. Estudos mostraram que a expressão de genes elongases e dessaturases ocorre logo após a eclosão indicando a possibilidade de síntese de PUFA de cadeias maiores neste momento do desenvolvimento (Morais et al., 2012; Cunha et al., 2013).

Entre os PUFAs, alguns ácidos graxos merecem especial atenção, entre eles temos o DHA da fração LN que apresentou maiores valores em LRE e LPA. Este ácido graxo é o mais importante do grupo n-3 e tem funções estruturais em membranas celulares além de apresentar diversas funções de importância em peixes, como a manutenção da estrutura e integridade funcional das células (Sargent 1999b; Furuita et al., 2003), formação de tecidos neurais (Wiegand, 1996) entre elas, cérebro e formação de retina (Sargent, 1995; Wiegand, 1996). Além disso, estes tecidos representam grandes proporções de massa corporal do



embrião e larvas (Sargent, 1995), refletindo nos elevados requerimentos do DHA para garantir o adequado desenvolvimento visual e neural das larvas.

Na fração LN e LP foram observados maiores porcentagens de AA no músculo de reprodutores e em LPA. Este ácido graxo está relacionado ao crescimento, sobrevivência e resistência ao estresse, por meio da produção de eicosanoides (Bell e Sargent, 2003; Tocher, 2010). Considerando os eicosanoides produzidos a partir do 20:4n 6 que são biologicamente ativos em peixes, os ácidos graxos PUFAs (n-6) são nutrientes essenciais para peixes (Sargent, 1995). Na reprodução, o ácido graxo AA é mobilizado, metabolizado e utilizado como mensageiro pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Van Der Kraak et al., 1997). Este ácido graxo também participa de diversas funções fisiológicas como respostas do sistema imune e respostas inflamatórias (Sargent, 1995; Nelson e Cox, 2002; Zuanon et al., 2011).

O EPA da fração LP reduziu ao longo do desenvolvimento embrionário. Este ácido graxo é responsável pela manutenção da fluidez e permeabilidade das membranas biológicas (Sargent et al., 2002). É importante lembrar que nesta fase, as larvas são extremamente dependentes desta propriedade. Segundo Kamler (2008) as larvas realizam muitas de suas funções biológicas através da fluidez e permeabilidade das membranas e do córion.

O somatório dos SFA da fração de lipídeos neutros foram superiores em ovócitos, LRE e LPA. Esses resultados mostram que esses ácidos graxos não foram utilizados como fonte de energia. Contudo, o somatório de SFA da fração de lipídeos polares foi menor em LPA devido a maior demanda energética para a formação de novos tecidos (Sargent, 1995). Já os MUFAs da fração LN mantiveram-se constantes em músculo de reprodutores, ovócitos e LRE e reduziram em LPA. Esta redução pode estar relacionada ao consumo energético para natação e busca de alimento. Por outro lado, MUFAs da fração LP foram armazenados desde a fase de ovócitos até LPA mostrando sua essencialidade para fases posteriores.

O somatório de PUFAs da fração LN apresentaram maiores porcentagens em músculo de fêmeas e LPA. Esses ácidos graxos são ricos em série n-3, esperando-se que sejam conservados para a formação de novos tecidos em embriões e larvas (Wiegand, 1996).

Ovócitos, LRE e LPA apresentaram menores porcentagens de n-9 e n-6 na fração de LN em *P. argenteus*, o que pode ser um indicativo do consumo dessas classes para demanda metabólica. Por outro lado, na fração de lipídeos polares o n-9 foi menor em LRE e o n-6 reduziu ao longo do desenvolvimento embrionário. Possivelmente, esta classe de PUFA foi

utilizada para a formação de tecidos, órgão e rompimento do córion. O aumento de n-3HUFA e n-6HUFA da fração LN em LPA sugere suas essencialidades para as larvas de *P. argenteus*. Já o n-6HUFA da fração polar em *P. argenteus* reduziu durante o desenvolvimento embrionário e larval. Esta redução é devido a estes ácidos graxos atuarem como constituintes dos fosfolipídios estruturais de membranas celulares na formação do tecido neural e junções neuromusculares (Sargent et al., 2002; Tocher, 2010).

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a transferência de nutrientes da matriz para os ovócitos. SFAs e MUFAs mantiveram-se constante ao longo do desenvolvimento dos embriões e larvas permitindo o armazenamento temporário de ácidos graxos essenciais, que poderão ser mobilizados para função estrutural. O aumento de DHA reflete a capacidade da espécie para alongar e desaturar C18:3n 3 para obtenção de n-3HUFA, demonstrando a importância deste ácido graxo durante o desenvolvimento larval. O conhecimento da composição química e mudanças na composição de ácidos graxos no músculo, ovócitos, LRE e LPA de *P. argenteus* podem levar a uma melhor compreensão sobre as necessidades nutricionais de larvas na primeira alimentação exógena assim como auxiliar no manejo nutricional dos reprodutores.

### **Referências Bibliográficas**

- Abi-Ayad, S.M.E. A., Kestemont, P., Mélard, C., 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish Physiol. Biochem.* **23**, 233-243.
- Adams, M.S., 1998. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: Arts, M. T., Wainman, B.C. *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer-Verlag, pp. 132-160.
- AOAC - The Official Methods of Analysis of AOAC (2016) – Disponível em: [http://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC/Publications/Official\\_Methods\\_of\\_Analysis/AOAC](http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC). Acesso em: 01 fev. 2016.

- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2011. Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* **2**, 84 - 853.
- Aras, N. M., Haliloglu, H. I., Ayık, O., Yetim, H., 2003a. Comparison of fatty acid profiles of different tissues of mature trout (*Salmo trutta labrax*, Pallas, 1811) caught from Kazandere Creek in Coruh region, Erzurum, Turkey. *Turk. J.Vet. Anim. Sci.* **27**, 311-316.
- Aras, N. M., Haliloglu, H. I., Bayır, A., Atamanalp, M., Sirkecioğlu, A. N., 2003b. Comparison of fatty acid composition of different tissues in mature trout (*Salmo trutta macrostigma*, Dumeril, 1858) Yesildere Creek in Karasu Basin. *Turk. J.Vet. Anim. Sci.* **27**, 887-892.
- Araújo, B.C., Honji, R.M., Mello, PH., Moreira, R.G., 2012. The influence of captive breeding on the fatty acid profiles of *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) eggs and larvae. *Aquacult. Int.* **20**, 1161-1181.
- Azarm, H.M., Kenari, A.A., Hedayati, M., 2013. Effect of dietary phospholipid sources and levels on growth performance, enzymes activity, cholecystokinin and lipoprotein fractions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquacult. Res.* **44**, 634-644.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture.* **218**, 491-499.
- Bromage, N.R., Roberts, R.J., 1995. Broodstock management and egg and larval quality. pp. 1-25. Univ.Press. Cambridge.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Felipe, B., Lorenzo, A., 2004. Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comp. Biochem. Phys.* **139**, 209-216.

- Cunha, I., Galante-Oliveira, S., Rocha, E., Planas, M., Urbatzka, R., Castro, L.F., 2013. Dynamics of PPARs, fatty acid metabolism genes and lipid classes in eggs and early larvae of a teleost. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **164**, 247–258.
- Christie, W.W., 1982. Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipid. p. 207. (Eds.), Pergamon Press, Oxford.
- Contreras-Guzmán, E.S., 2002. Bioquímica de pescados e invertebrados. p. 308. Santiago (Chile): CECTA-USACH.
- Cruzado, I.H., Rodríguez, E., Herrera, M., Lorenzo, A., Almansa, E., 2013. Changes in lipid classes, fatty acids, protein and amino acids during egg development and yolk-sac larvae stage in brill (*Scophthalmus rhombus* L.). *Aquacult. Res.* **44**, 1568-1577.
- Dantagnan, H., Bórquez, A.S., Valdebenito, I.N., Salgado, I.A., Serrano, E.A., Izquierdo, M.S., 2007. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye *Galaxias maculatus Jenyns*, 1842, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations. *J. Fish Biol.* **70**, 770-781.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquacult. Res.* **4**, 684-716.
- Flecker, A.S., 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, **77**, 1845–1854.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Takeuchi, T., 2003. Effect of dietary arachidonic acid levels on larval and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. **220**, p.725–735.

- Giménez, G., Estévez, A., Henderson, R.J., Bell, J.G., 2008. Changes in lipid content, fatty acid composition and lipid class composition of eggs and developing larvae (0-40 days old) of cultured common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus 1758). *Aquacult. Nutr.* **14**, 300-308.
- Godinho, A.L., Godinho, H.P., 2003. Breve visão do São Francisco. In: Godinho HP, Godinho AL., (Eds.), *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. pp. 15-24. Belo Horizonte: PUC Minas.
- Gunasekera R.M., De Silva, S.S., Ingram, B.A., 1999. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and Murray cod, *M. peelii peelii*. *Aquat. Living Resour.* **12**, 219-227.
- Gunasekera, R.M.; Shim, K.F.; Lam, T.J., 1996. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture.* **146**, 245-259.
- Gurr, M.I., Harwood, J.L., 1991. *Lipid Biochemistry, an Introduction*. 4a edition Chapman e Hall. Fourth Edition.
- Haliloglu, H.I., Bayir, A., Sirkecioglu, A.N., 2004. Comparisons of fatty acid composition in some tissues of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chem.* **86**, 55-59.
- Harvey, b., Carolsfeld, J., 1993. *Induced breeding in tropical fish culture*. p. 144. Ottawa:IDRC.
- Heming, T.A., Buddington, R.K., 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: *Fish Physiology*, ed. Hoar, W.S., Randall, D.J. pp. 407- 446. New York: Academic Press.

- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.* **26**, 281-347.
- Henderson, R. J., Sargent, J. R., 1985. Fatty acid metabolism in fish. In: Cowey, C. B., A. M. Mackie and J. G. Bell., *Nutrition and Feeding in Fish.* (Eds.) pp. 349-364. London, Academic Press.
- Ihering, R.V., 1935. Die wirkung von Hypophyseinjektion auf den Laichakt von Fischen. *Zoo. Anz.* **111**, 273-279.
- Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernandez-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 97-107.
- Jaya-Ram, A., Kuah, M.K., Lim, P.S., Kolkovski, S., Shu-Chien, A.C., 2008. Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture.* **277**, 275-281.
- Kamler, E., 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **18**, 143-200.
- Kiessling, A., Kiessling, K-H., Storebakken, T., Åsgård, T., 1991a. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. I: Growth dynamics. *Aquaculture.* **93**, 335-356.
- Kjorsvik, E., Mangor-Jesen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. *Mar. Biol.* **26**, 71-113.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R.A., 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiol. Biochem.* **20**, 375-388.

- Lam, T.K.T., Schwartz, G.J., Rosseti, L., 2005. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat. Neurosci.* **8**, 579-584.
- Ling, S., Kuah, M-K., Muhammad, T.S.T., Kolkovski, S., Shu-Chien, A.C., 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture.* **261**, 204-214.
- Lovell, T., 1998. Nutrition and feeding of fish. p. 267. London: Kluwer Academic Publishers.
- Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J.G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N., 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture.* **227**, 21-33.
- Mello, P.H., Araújo, B.C., Venturieri, R.L.L., Moreira, R.G., 2012. Fatty acids as a tool to compare cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (Siluriformes: Pimelodidae) and hybrid (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) larvae during early development. *Aquacult. Int.* **20**, 1139-1160.
- Mello, P.H.; Venturieri, R.L.L.; Honji, R.M.; Moreira, R.G., 2009. Threatened fishes of the world: *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae). *Env. Biol. Fish.* **85**, 359- 360.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1991. Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Lipids.* **26**, 871-877.
- Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceição, L.E.C., Tocher, D.R., 2012. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with  $\Delta^4$  activity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* **1821**, 660-671.

- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Lehninger: Principles of biochemistry. p. 1119. Freeman, New York, EUA.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2002. Lehninger: Princípios de bioquímica. 3a ed. p. 687. São Paulo: Sarvier.
- Ortega, A., Mourente, G., 2010. Comparison of the lipid profiles from wild caught eggs and unfed larvae of two scombroid fish: northern Bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) and Atlantic bonito (*Sarda sarda* Bloch, 1793). *Fish Physiol. Biochem.* **36**, 461-471.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., 2003. Check list of the freshwater fishes of outh and Central America. p. 742. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 2002. The Lipids. In: Halver, J., Hardy, E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier, pp. 181–257. San Diego, California.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D.R., Estevez, A., 1999a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*. **177**, 191-199.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, J.G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D.R., 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: Status and future direction. *Aquaculture*. **179**, 217-229.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Ed.) *Broodstock management and egg and larval quality*. pp. 353-372. London: Blackwell Science.
- Statistical Analysis System. Versão 8.0. Cary: SAS Institute Inc., 2002. Version 8.1.
- Sato, Y., Godinho, H.P., 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. In: *Migratory fishes of South America*. J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross and A. Baer (Eds). pp. 195–232. World Fisheries Trust, vic, Canada.



- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Nuner, A.P.O., Godinho, H.P., Verani, J.R., 2003a. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Águas, peixe e pesca no São Francisco das Minas Gerais. Godinho, H.P., Godinho, A.L (Eds). pp. 229-374. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Godinho, H. P., 2003b. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, In: Godinho, H. P., Godinho, A. L. (Ed.) Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais, pp. 275-290. Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas.
- Sato, Y., Cardoso, E.L., Godinho, A.L., Godinho, H.P., 1996a. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station conditions. Rev. Brasil. Biol. **56**, 59 - 64.
- Terova, G., Saroglia, M., Papp, Z.G., Cecchini, S., 1998. Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from broodstock fed with different vitamin C content in diet. Comp. Biochem. Physiol. Part A. **12**, 111– 118.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. Aquacult. Res. **41**, 717-732.
- Tocher, D.r., Bell, J.G., MacGhee, F., Dick, J.R., Fonseca-Madrigal, J., 2003. Effects os dietary lipid level and vegetable oil on fatty acid metabolism in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) over the whole production cycle. Fish Physiol. Biochem. **29**, 193-209.
- Tulli, F., Tibaldi, E., 1997. Changes in amino acids and essential fatty acids during early larval rearing of dentex. Aquacult. Int. **5**, 229-236.
- Turchini, G.M., Francis, D.S., De Silva, S.S., 2006. Fatty acid metabolism in the freshwater fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) deduced by the whole-body fatty acid balanced method. Comp. Biochem. Phys. **144**, 110 - 118.

- Van Der Kraak, G., 1997. Reproduction. In: The physiology of fishes, (Evans, D.H., Ed.), pp. 465-490, London: RC Press.
- Watanabe, T., Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*. **124**, 223-251.
- Wiegand, M.D., 1996. Utilization of yolk fatty acids by goldfish embryos and larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 21-27.
- Yeganeh, S., 2014. Variations of fatty acids in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during eyed egg and larval development stages. *Intl. J. Aquat. Sci.* **5**, 167-180.
- Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* **31**, 367-373.
- Zhu, P.; Evans, R.P.; Parrish, C.C.; Brown, J.A.; Davis, P.J., 2002. Is there a direct connection between amino acid and lipid metabolism in marine fish embryos and larvae? *Bull. Aquacult. Assoc. Can. Bulletin.* **97**.
- Zuanon, J.A.S., Salaro, A.L., Furuya, W.M., 2011. Produção e nutrição de peixes ornamentais. *Ver. Bras. Zootecn.* **40**, 165-174.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior compreensão da dinâmica do perfil de ácidos graxos dessas espécies e suas necessidades nutricionais na fase embrionária e larval até a primeira alimentação exógena auxiliam na obtenção de melhores taxas de sobrevivência e ajustes no manejo dos reprodutores visando melhorar os índices produtivos na larvicultura. É possível observar no presente estudo que as espécies *B. orthotaenia* e *P. argenteus* apresentaram aumento de n-3HUFA e n-6HUFA sugerindo suas essencialidades para as larvas para atuarem em funções estruturais de membranas celulares na formação do tecido neural e junções neuromusculares. É a evidência de transferência de nutrientes da matriz para os ovócitos, oriundos da fonte dietética dos reprodutores.

Também é observado o aumento de DHA em ambas as espécies, reflete a capacidade de alongar e desaturar C18:3n 3 para obtenção de n-3HUFA, demonstrando a importância deste ácido graxo durante o desenvolvimento larval. O conhecimento da composição química e mudanças na composição de ácidos graxos no músculo, ovócitos, LRE e PLA podem levar a uma melhor compreensão sobre as necessidades nutricionais de larvas, assim como auxiliar no manejo nutricional dos reprodutores.

Estudos futuros voltados para avaliar o perfil lipídico de reprodutores e suas proles devem ser realizados, para elucidar os efeitos de outras variáveis, tais como, o período mínimo necessário para garantir o efeito das dietas sobre os parâmetros reprodutivos e a dinâmica do perfil de ácidos graxos ao decorrer do desenvolvimento embrionário e larval de espécies de interesses zootécnicos.