

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura

**Desenvolvimento embrionário, descrição e cultivo de paralarvas
do polvo comum (*Octopus vulgaris*) da costa sul do Brasil**

LISIANE BARCELOS DA SILVA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura, no PPG em Aqüicultura da FURG.
Orientadora: Prof. Dr^a Érica A. G. Vidal

Rio Grande, fevereiro de 2006

Índice

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Resumo geral	viii
Abstract	x
Introdução Geral	1
Referências bibliográficas.....	4
Capítulo I: Utilização do vitelo, conteúdo orgânico e inorgânico de ovos de <i>Octopus vulgaris</i> durante o desenvolvimento embrionário.	
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discussão.....	18
Referências Bibliográficas.....	24
Figuras e Tabelas.....	27
Capítulo II: Descrição morfológica de paralarvas da costa sul do Brasil e comparação do padrão de cromatóforos entre paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia (Vigo, Espanha).	
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados.....	43
Discussão.....	46
Referências Bibliográficas.....	50
Figuras e Tabelas.....	52

Capítulo III: Influência da configuração interna e hidrodinâmica de tanques de cultivo na ocorrência de lesões em braços de paralarvas do polvo comum.

Resumo.....	61
Abstract.....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	65
Resultados.....	67
Discussão.....	71
Referências Bibliográficas.....	75
Figuras e Tabelas.....	78
Discussão Geral.....	89

*Aos meus queridos pais e
ao Douglas pelo amor, compreensão e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A CAPES, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

À Dr. Érica Vidal por sua excelente orientação e contribuição à minha formação profissional e pessoal.

Aos professores Dr. Manuel Haimovici e Dr. José Angel Perez por suas valiosas críticas e sugestões como membros da banca examinadora.

Em especial, agradeço ao professor Dr. José Guilherme Bersano Filho (Duda) pelo auxílio nos experimentos e sugestões para melhoria deste trabalho.

À Dra. Lúcia Fuentes e ao Dr. José Iglesias do Instituto Espanhol de Oceanografia (IEO) em Vigo, pelo fornecimento de imagens de paralarvas do polvo comum da Galícia.

Ao pessoal do Laboratório de Cultivo de Moluscos Cefalópodes, pelo auxílio nos experimentos e momentos de descontração: Vivian, Augusto, Márcio (Misi-Márcio), Marcinho, Michele, Marcelo, Sabrina, Mara e Diana.

À Sabrina por sua ajuda em todos os momentos e pela grande amizade.

À grande família Bainy pelo carinho e amizade: Mara, Fábio, Dona Irene, Clarisse e Clara.

Ao pessoal da Ema, funcionários, professores e estagiários.

À minha amiga Neide (Neidoca) por toda a sua ajuda em todos os momentos que precisei, conselhos e carinho.

À Viviana, que apesar de termos nos conhecido há pouco tempo, considero minha amiga de verdade.

Aos colegas de mestrado, em especial à Maurem, Andréa, Caru e Tagor.

Em especial, à Maria Helena (mãe do Tagor) pela ajuda em momentos cruciais.

Ao pessoal do Laboratório de Zooplâncton (DOC-FURG), Waldemar, Charles e Sônia por terem tornado o ambiente ainda mais agradável.

Ao meu amigo Francis, que me ajudou muito em várias fases do meu trabalho, pelo incentivo, paciência e carinho! Te adoro!

A todos os meus divertidos amigos: Kido, Cris, Fabi, Rosi, Vivi, Odila, Igor, Bruna, Munir, Paulo, Talibã, Roberta, Marcos, Mila, Scuby, Jeison, Grafulha, Marina, André e Cláudia.

Muito obrigada pelos anos de convivência e pelas risadas.

Aos meus queridos e amados pais e irmãos, pelo amor, incentivo, e apoio em todos os momentos. Amo vocês!

À minha querida família Paulista Ganança.

Ao meu único e verdadeiro amor, Douglas: obrigada pela paciência, carinho, alegria. Você é a razão de todo o meu esforço.

RESUMO GERAL

Existe uma grande carência de informações sobre as necessidades físicas e comportamentais das paralarvas, bem como de suas preferências alimentares, o que dificulta a sua manutenção em laboratório. Estudos que contribuam para verificar os fatores que afetam a sobrevivência das paralarvas durante a larvicultura e para um maior conhecimento das fases iniciais de desenvolvimento, biologia e ecologia das paralarvas do polvo comum da costa sul do Brasil, são necessários para o desenvolvimento de protocolos experimentais para o cultivo. Para avaliar as fases iniciais de desenvolvimento do polvo comum, estimativas da taxa de absorção de vitelo, peso úmido e seco, peso orgânico e inorgânico, foram obtidos de ovos incubados a $24 \pm 1^\circ \text{C}$, a cada 48 horas ao longo do desenvolvimento embrionário. Após a eclosão as paralarvas foram separadas em dois grupos, inanição a 19°C e inanição a 24°C , para avaliar a importância do conteúdo de vitelo no potencial de sobrevivência das mesmas durante a larvicultura. Os resultados indicam que a perda de biomassa do embrião foi relativamente baixa, pois houve uma redução de apenas 12 % no peso orgânico dos ovos, sugerindo que o vitelo tenha sido convertido com eficiência em massa corpórea na temperatura de incubação escolhida. A reserva de vitelo representou de 20 a 32 % do peso úmido do corpo das paralarvas na eclosão, permitindo que as mesmas sobrevivessem até 8 dias a 19°C e até 10 dias a 24°C quando em inanição. Porém, taxas de sobrevivência acima de 70 % foram registradas no Dia 5 para paralarvas mantidas a 19°C e no Dia 3 a 24°C . Estes resultados indicam que maiores taxas de mortalidade foram registradas anteriormente para paralarvas mantidas a 24°C , devido às maiores taxas metabólicas, resultando na absorção de vitelo mais rápida. Existem evidências que o polvo comum seja membro de um complexo de espécies crípticas. Assim, a descrição morfológica de paralarvas da costa sul do Brasil e comparação do padrão de cromatóforos entre paralarvas da costa sul do Brasil e do noroeste do Atlântico (Vigo, Espanha) foram realizadas. Os ovos e paralarvas de ambas as localidades foram incubados e mantidos à temperaturas de $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Foram observadas diferenças importantes entre o padrão de cromatóforos das paralarvas de ambas localidades, principalmente na região ventral do manto e da cabeça. Porém, para avaliar em que grau estas diferenças possam estar envolvidas na complexidade da posição taxonômica da

espécie, seria ainda necessário o suporte de genética molecular. Um fator que tem contribuído para o aumento das taxas de mortalidade das paralarvas está relacionado às inadequadas condições físicas dos sistemas de cultivo, sendo observadas lesões nos braços das paralarvas mantidas em tanques circulares de 96 L. Com o objetivo de reduzir estas lesões 3 configurações internas de tanques de cultivo e hidrodinâmica foram testadas. Análises histológicas de braços normais e lesionados das paralarvas foram realizadas para caracterizar e identificar a causa destas lesões. Paralarvas mantidas em tanques com corrente circular e com idades de 20, 24 e 30 dias (d) apresentaram perda de ventosas e diminuição ou ausência dos OK. As paralarvas com idade de 15 d mantidas em tanques com corrente ascendente apresentaram uma estrutura nodular que indicou o início do processo abrasivo. Paralarvas de 24 d mantidas em tanques com correntes convergentes verticais não apresentaram danos epiteliais, representando a melhor hidrodinâmica testada. Os resultados indicam que as lesões são físicas, e que podem ser reduzidas através da remodelagem da configuração interna dos tanques e hidrodinâmica. Portanto, isto evidencia que a hidrodinâmica é uma das causas de mortalidade das paralarvas durante o cultivo, a qual ainda não havia sido observada anteriormente. Assim, o contato das paralarvas com as paredes deve ser evitado sempre que possível.

ABSTRACT

The rearing of *Octopus vulgaris* paralarvae is hindered by the deficiency of information on its physical and nutritional requirements. To develop experimental protocols on paralarval rearing, studies on the factors that affect the embryonic development, survival and growth of paralarvae are necessary. In this study, the humid, dry, organic and inorganic weight of eggs incubated at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ were obtained every 48 h and compared to the estimate yolk content of eggs. After hatching, paralarvae were divided in two groups and kept at starvation at 19°C and 24°C in order to evaluate the importance of the yolk content on the survival of paralarvae. The results showed that during embryonic development there was a reduction of only 12% in the organic weight of the eggs, suggesting that the yolk has been effectively converted into corporal tissue at the chosen incubation temperature. The yolk reserve represented from 20 to 32% of the paralarvae humid weight at hatching, allowing the paralarvae to survive up to 8 days at 19°C and 10 days at 24°C in starvation, although a survival rate of 70% was registered at Day 5 after hatching at 19°C and at Day 3 at 24°C .

Additionally, the morphological description of paralarvae from southern Brazilian including their chromatophore pattern was described and compared to that of paralarvae from northeastern Atlantic (Vigo, Spain). The eggs and paralarvae from both localities were incubated and maintained at $20^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. Important differences were observed on the chromatophore pattern of paralarvae from both localities, mainly in the ventral area of the mantle and head. However, other studies are necessary to determine other taxonomic differences between specimens from both localities.

A factor that is associated with paralarval mortality is the inadequate physical conditions of the cultivation tanks, since it was observed that the arms of paralarvae maintained in 96 L circular tanks had lesions on their extremity. With the aim of reducing the incidence of these lesions, 3 designs of cultivation tanks with different hydrodynamics, were tested. To characterize and to identify the cause of these lesions, histological analyses of normal and damaged arms of paralarvae were accomplished. Paralarvae maintained in tanks with circular current presented loss of suckers and absence or damage in the Köllikers

organ at 20, 24 and 30 days after hatching. Fifteen days old paralarvae maintained in tanks with ascending current presented a nodular structure on the arms that indicated the beginning of the abrasive process. On the other hand, twenty-four days old paralarvae maintained in tanks with a vertical convergent current did not showed epithelial damage on the arms, showing that this was the best tank design tested. This result clearly indicate that the lesions observed are physical and caused by excessive contact of paralarvae with the tank walls. The lesions can be reduced by re-modeling the configuration and hydrodynamic of the tanks. Therefore, the hydrodynamics of the tank is one of the causes of mortality during rearing of paralarvae, showing that the contact of the paralarvae with the tank walls should be always avoided.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os cefalópodes possuem um ciclo de vida curto que varia de 6 meses a 2 anos (Boyle 1987), são dióicos e o dimorfismo sexual se torna evidente em juvenis (Boletzky 1989). Os machos apresentam o terceiro braço direito modificado em um órgão copulador, o hectocótilo (Iglesias *et al.* 2000, Moxica *et al.* 2001), através do qual se dá a transferência dos espermatozoides para o interior da cavidade do manto da fêmea (Mangold 1987). Durante o período que compreende a postura e o desenvolvimento do embrião, a fêmea limpa e oxigena os ovos com o auxílio dos seus braços e o funil, pára de se alimentar, e morre após o início da eclosão das paralarvas (Iglesias *et al.* 2000, Mangold 1983, Moxica *et al.* 2001).

O polvo comum (*Octopus vulgaris*) distribui-se em águas tropicais e temperadas ao redor do mundo (Mangold 1983) e praticamente ao longo de toda a costa brasileira (Haimovici *et al.* 1994). Diversas características, tais como, altas taxas de crescimento e conversão alimentar, ciclo de vida curto, desenvolvimento direto e alto valor de mercado, apontam para a potencialidade de cultivo do polvo comum (Iglesias *et al.* 2000, Mangold 1983, Mangold 1987, Nixon 1969, Vaz-Pirez *et al.* 2004).

Diversos estudos demonstraram ótimos resultados quanto à reprodução em laboratório, de tal forma que através das técnicas empregadas se consegue obter ovos e paralarvas viáveis, e em quantidades suficientes para serem utilizadas durante o cultivo (Iglesias *et al.* 2000, Moxica *et al.* 2001, Okumura *et al.* 2005, Villanueva 1995). Entretanto, o gargalo tecnológico para o cultivo reside nas baixas taxas de sobrevivência das paralarvas nas primeiras semanas após a eclosão (Vidal *et al.* 2004, Villanueva *et al.* 1996).

Algumas espécies de polvos do gênero *Octopus* que produzem relativamente poucos ovos com muito vitelo, tais como *O. joubini*, *O. briareus*, *O. maya*, *O. bimaculoides* e *O. digueti* tem sido cultivadas com grande sucesso através de todo o seu ciclo de vida em laboratório, sendo amplamente utilizados para fins biomédicos (Hanlon & Forsythe

1985). A principal vantagem de se cultivar estas espécies é a ausência da fase planctônica, assim emerge do ovo um pequeno polvo capaz de se alimentar imediatamente de presas de maior tamanho, e conseqüentemente apresentam maiores taxas de crescimento e sobrevivência (Hanlon & Forsythe 1985). Em contraste, a fecundidade do polvo comum é relativamente alta, uma única fêmea pode produzir entre 100, 000 e 500, 000 ovos, o que facilita a disponibilidade de paralarvas para o cultivo. Porém, as paralarvas são planctônicas ao eclodir, possuem pouca quantidade de vitelo e altas taxas metabólicas, entrando rapidamente em inanição na ausência de alimento (Mangold 1983).

A carência de informações sobre as principais presas selecionadas por estas paralarvas está intimamente relacionada às altas taxas de mortalidade durante a larvicultura. Entretanto, juvenis foram obtidos em laboratório através do oferecimento de zoés de crustáceos decápodes como alimento às paralarvas, porém somente em pequenos volumes, em escala experimental (Carrasco *et al.* 2003, Iglesias *et al.* 2004, Itami *et al.* 1963, Villanueva 1995). Outro fator primordial para maximizar o cultivo para fins comerciais reside na produção de alimento vivo em variedade, quantidade e qualidade, que supra as elevadas taxas metabólicas e as necessidades nutricionais das paralarvas (Villanueva 1994).

Tendo em vista que a tecnologia de produção de polvos ainda está sendo desenvolvida, e praticamente todos os estudos têm sido centrados na sobrevivência e crescimento das paralarvas, é de fundamental importância contribuir para o maior conhecimento das fases iniciais de desenvolvimento do polvo comum. Existem estudos que relatam estimativas de fecundidade e taxa de eclosão de ovos incubados em diferentes temperaturas (Iglesias *et al.* 1997, Moxica *et al.* 2001). Entretanto, informações sobre a morfologia e fisiologia do embrião durante o desenvolvimento embrionário e influência da quantidade de vitelo das paralarvas no momento da eclosão no potencial de sobrevivência durante o cultivo são inexistentes. Tais informações provavelmente atuem como parte do processo que ainda precisa ser desvendado para

completar o ciclo de vida em laboratório e futuramente maximizar cultivos em escala comercial.

Outro ponto de interesse para o cultivo de cefalópodes reside na busca do maior conhecimento do seu ciclo de vida e biologia. De acordo com Sweeney *et al.* (1992), o ciclo de vida de muitas espécies de cefalópodes com paralarvas planctônicas são pouco estudados e inadequadamente descritos, pois existe uma grande carência de informações sobre a distribuição das paralarvas na natureza (Rocha *et al.* 1999). Devido à ampla distribuição mundial do polvo comum, recentes evidências indicam que o mesmo possa ser membro de um complexo de espécies crípticas (Mangold 1998). Uma particularidade importante dos cefalópodes é o padrão de distribuição dos cromatóforos, os quais podem ser utilizados como importantes caracteres taxonômicos (Hoechberg *et al.* 1992). Desta forma, a análise do padrão de cromatóforos de paralarvas de *O. vulgaris* cultivadas e de diferentes regiões geográficas, poderia ser uma ferramenta útil na análise da complexidade desta espécie.

Ainda, devido à escassez de informações sobre as necessidades físicas e comportamentais das paralarvas, uma ampla variedade de tipos de tanques (formas, tamanhos e cores) têm sido empregados no cultivo destes cefalópodes (Carrasco *et al.* 2003, Iglesias *et al.* 2004, Okumura *et al.* 2005, Vidal *et al.* 2004, Villanueva 1995). Estudos recentes com paralarvas da lula *Loligo opalescens* mostraram que maiores taxas de sobrevivência e crescimento podem ser alcançadas através do aprimoramento das condições físicas dos sistemas de cultivo (Vidal *et al.* 2002). É provável que os mesmos fatores que contribuam para aumentar as taxas de sobrevivência das paralarvas da lula *L. opalescens* também se apliquem às paralarvas do polvo comum, pois ambas são planctônicas e morfologicamente muito semelhantes.

Com base neste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar quais os fatores afetam a sobrevivência das paralarvas durante a larvicultura e contribuir para o maior conhecimento das fases iniciais de desenvolvimento, biologia e ecologia das paralarvas do polvo comum da costa sul do Brasil, a fim de desenvolver protocolos experimentais para o cultivo.

LITERATURA CITADA

- BOLETZKY SV (1989) Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the cephalopoda. *Advances in Marine Biology.*, 25: 85-115.
- BOYLE PR (1987). Cephalopod life cycles. Academic Press, London, vol. II
- CARRASCO, JF, C RODRIGUEZ & M RODRIGUEZ. 2003. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797), en tanques parabólicos de 30 l utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. In: *IX Congreso Nacional de Acuicultura* (anais). Espanha. 191-194p.
- HAIMOVICI, M, JAA PEREZ & RA DOS SANTOS. 1994. Class Cephalopoda Cuvier, 1798. SEASHELLS OF BRAZIL. E. C. Rios. Segunda edição. Editora da FURG, Rio Grande, Brasil. p. 311-320.
- HANLON, RT & JW FORSYTHE. 1985. Advances in the Laboratory Culture of Octopuses for Biomedical Research. *Laboratory Animal Science.* 35(1): 33-40.
- HOCHBERG, FG, M NIXON, RB TOLL & RE YOUNG. 1992. Order Octopoda Leach, 1818. In MJ Sweeney *et al.* (eds.), Larval and juvenile cephalopods: a manual for their identification. Smithsonian Contributions to Zoology., 213-268.
- IGLESIAS, J, FJ SÁNCHEZ & JJ OTERO. 1997. Primeras experiencias sobre el cultivo integral del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier) en el IEO. Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Cartagena, 456 pp.
- IGLESIAS, J, FJ SÁNCHEZ, JJ OTERO & C MOXICA. 2000. Cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier): situación actual, problemas y perspectivas. *Cahiers Options Méditerranéennes.*, 77: 313-321.
- IGLESIAS, J, JJ OTERO, C MOXICA, L FUENTES & FJ SÁNCHEZ. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier) under culture conditions: paralarvae rearing using Artemia and Zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International.*, 12: 481-487.
- ITAMI, K, Y IZAWA, S MAEDA & K NAKAI. 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 29: 514-520.

- MANGOLD, K. 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, vol. I, pp 335-364.
- MANGOLD, K. 1987. Reproduction. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, Vol. II, pp 157-200.
- MANGOLD, K. 1998. The Octopodinae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: NA Voss et al. (eds.), *Systematics and Biogeography of cephalopods*. Smithsonian Contributions to Zoology, vol. II., 586: 521-528.
- MOXICA, C, JJ OTERO, J IGLESIAS & FJ SÁNCHEZ. 2001. Comportamiento reproductor, puestas y desarrollo embrionario del pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1798) en cautividad. In: 7^o Congreso Nacional de Acuicultura (anaís). Los Palms de Gran Canaria. 549-554p.
- NIXON, M. 1969. The lifespan of *Octopus vulgaris*. Proc. Soc. Lond., 38: 529-540.
- OKUMURA, S, A KURIHARA, A IWAMOTO & T TAKEUCHI. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific Sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture*. 244 (1-4): 147-157.
- ROCHA, F, A GUERRA, R PREGO & U PIATKOWSKI. 1999. Cephalopod paralarvae and upwelling conditions off Galician waters (NW Spain). *Journal of Plankton Research*., vol. 21 (1): 21-33.
- SWEENEY, MJ, CFE ROPER, KM MANGOLD, MR CLARKE & SV BOLETZKY. 1992. "Larval" and juvenile cephalopods: A manual for this identification. *Smithsonian contributions to zoology*., 513: 213-279.
- VAZ-PIRES, P, P SEIXAS & A BARBOSA. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture*, 238: 221-238.
- VIDAL, EAG, PF DIMARCO, JH WORMUTH & PG LEE. 2002. Optimizing rearing conditions of hatchling squid. *Marine Biology*., 140:117-127.
- VIDAL, EAG, LB SILVA, MT COSTA & MN LOPES 2004. Aprimoramento das técnicas de larvicultura para cultivo do polvo comum. In. AQUIMERCO 2004, Livro de resumos. p.183-183.
- VILLANUEVA, RN. 1994. Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture*., 12: 143-152.
- VILLANUEVA, RN. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2639-2650.

VILLANUEVA, RN, C NOZAS & SV BOLETZKY. 1996. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 208: 169-184.

CAPÍTULO I

Utilização do vitelo, conteúdo orgânico e inorgânico de ovos de *Octopus vulgaris* durante o desenvolvimento embrionário

RESUMO

Um fator de extrema importância para viabilizar o cultivo de polvos é conhecer as fases iniciais do seu ciclo de vida e o efeito da quantidade de vitelo das paralarvas na eclosão no potencial de sobrevivência durante a larvicultura. Para tal, a utilização de vitelo, água, conteúdo orgânico e inorgânico de ovos de *Octopus vulgaris* durante o desenvolvimento embrionário, o peso úmido e seco (PU, PS), peso seco livre de cinzas (PSLC) e peso das cinzas (PC) de amostras de 100-150 ovos (n=1650) incubados a $24 \pm 1^\circ \text{C}$ foram avaliados a cada 48 horas ao longo do desenvolvimento. Após a eclosão, as paralarvas foram mantidas em inanição a duas temperaturas (19°C e 24°C) para avaliar o tempo de sobrevivência das mesmas. Medidas do saco vitelínico foram realizadas através de imagens capturadas dos ovos, e posteriormente convertidas em peso (PV). A média do PU e PS no 1º dia foi de 1,1 mg e 0,37 mg, respectivamente. Enquanto o PS permaneceu praticamente constante durante todo o desenvolvimento, o PU aumentou 68 %, atingindo 1,81 mg no 21º dia. A média do PV no 1º dia foi de 0,50 mg, representando 46 % do PU e mostrando uma diminuição gradual durante a organogênese (0,24 mg no 21º dia). Enquanto uma redução de 12 % no peso orgânico dos ovos foi observada, o inorgânico aumentou 54 %, devido principalmente à formação do bico, estatólitos e absorção de sais inorgânicos e elementos traço da água do mar. Os resultados sugerem que o aumento no PU dos ovos esteve relacionado à absorção de água pelo embrião e que a perda de biomassa foi relativamente baixa (12 %), indicando que o vitelo foi convertido com eficiência em massa corpórea na temperatura de incubação escolhida. O vitelo representou de 20 a 32 % do peso úmido das paralarvas na eclosão, permitindo que as mesmas sobrevivessem até 8 dias a 19°C e até 10 dias a 24°C quando em inanição. Taxas de sobrevivência acima de 70 % foram registradas no Dia 5 para paralarvas mantidas a 19°C e no Dia 3 a 24°C . Estes resultados indicam maiores taxas de mortalidade para paralarvas mantidas a 24°C , devido às maiores taxas metabólicas, resultando na absorção de vitelo mais rápida.

ABSTRACT

One factor of extreme importance to make feasible the cultivation of octopus is to know the initial phases of their life cycle and the effect of quantity of yolk of paralarvae on the eclosion on the potentiality for survival during the larviculture. On account of this, the use of yolk, water, organic and inorganic content, the humid and dry weight (WW, DW), the dry weight free of ashes (DWFA) and the weight of ashes (WA) of samples of 100-150 eggs (n=1650) of *Octopus vulgaris* incubated at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ have been obtained every 48 hours throughout the development. After the eclosion the paralarvae were maintained in starvation at 2 temperatures (19° and 24°C) to evaluate the time of survival of the same. Measurements of vitelinic sac were carried out through the images captured of the eggs, and later on converted into weight (YW). The average of WW and DW on the first day was of 1,1 mg and 0,37 mg, respectively. Whereas the DW maintained practically constant during all the development, the WW increased 68% reaching 1,81 mg on the 21st day. The average of YW on the first day was of 0,5 mg, representing 46% of WW and showing a gradual diminution during the organogenesis (0,24 mg on the 21st day). Whereas a reduction of 12% on the organic weight of eggs have been observed, the inorganic increased 54%, due specially to the formation of beak, statoliths and absorption of inorganic salts and traces of water elements of sea water. The results suggest, that the increase on WW of eggs was related to the absorption of water by the embryo and that the loss of body tissues was relatively low (12%), pointing out that the yolk was converted successfully into corporal mass at the temperature of incubation chosen. The yolk represented from 20 to 32% of the humid weight of paralarvae at the eclosion, thus allowing that the same could survive up to 8 days at 19°C and even up to 10 days at 24°C , when they were starvation. Nevertheless, survival rates above 70% have been registered on Day 5 for paralarvae maintained at 19°C , and on Day 3 at 24°C . These results show higher rates of mortality for paralarvae maintained at 24°C , due to higher rates of metabolics, resulting in a quicker absorption of yolk.

1. INTRODUÇÃO

O polvo comum (*Octopus vulgaris*) possui grande importância comercial em várias partes do mundo, sendo considerado um excelente candidato para o cultivo (Iglesias *et al.* 2000, Vaz-Pires *et al.* 2004). Porém, o cultivo de polvos ainda se encontra em fase de desenvolvimento, visto que as paralarvas eclodem com pequeno tamanho, em torno de 2 mm de comprimento total e apresentam uma fase de vida planctônica bastante complexa (Iglesias *et al.* 2000, Mangold 1987)). Assim, durante as últimas décadas diversas tentativas de cultivo foram realizadas, visando conhecer as técnicas para a produção de polvos em escala comercial (Carrasco *et al.* 2003, Hamazaki *et al.* 1991, Iglesias *et al.* 2000, Inamura 1990, Itami 1963, Moxica *et al.* 2002, Villanueva 1994, Villanueva 1995).

Uma das causas das altas taxas de mortalidade reside na falta de informações sobre as principais presas selecionadas pelas paralarvas. Porém, existem evidências de que as paralarvas se alimentam de larvas de crustáceos decápodes na natureza (Villanueva 1994), pois a obtenção de polvos juvenis em laboratório foi possível somente através do oferecimento de zoés de crustáceos decápodes como alimento (Carrasco *et al.* 2003, Itami *et al.* 1963, Villanueva 1995), e o fechamento do ciclo de vida alcançado pela primeira vez ao oferecerem às paralarvas *Artemia* adulta (1-4mm) e zoés de *Maja squinado* como alimento complementar (Iglesias *et al.* 2004). Porém, embora nos últimos anos vários estudos tenham sido avaliados a sobrevivência e crescimento de paralarvas de *Octopus vulgaris* durante o cultivo, pouca atenção tem sido destinada aos fatores que atuam sobre o desenvolvimento do embrião.

Os cefalópodes produzem ovos que variam de menos de 1 a 30 mm, os quais possuem grande quantidade de vitelo e são denominados telolécitos (Boletzky 2002). Os ovos de *Octopus vulgaris* são alongados, medem cerca de 2,0 x 1,0 mm e são depositados em cachos (Mangold 1983). Sabe-se que a duração do desenvolvimento embrionário de *O. vulgaris* é inversamente proporcional à temperatura da água (Moxica *et al.* 2001). Porém, existe uma grande carência de informações sobre a fisiologia do embrião durante o

desenvolvimento embrionário e influência da quantidade de vitelo das paralarvas no momento da eclosão no potencial de sobrevivência durante o cultivo.

Estudos sobre a fisiologia de absorção do vitelo e peso úmido e seco dos ovos durante o desenvolvimento do embrião são praticamente inexistentes, com exceção de *Sepia officinalis* (Bouchaud 1991, Bouchaud & Daguzan 1990). Além disso, o efeito da quantidade de vitelo das paralarvas na eclosão e respectivo potencial de sobrevivência das mesmas em diferentes temperaturas são inexistentes até o momento para o polvo comum. Ao comparar o peso úmido dos ovos e peso de vitelo, pode-se obter o quanto de vitelo foi consumido pelo embrião na produção de seus tecidos e, então conhecer o percentual de vitelo das paralarvas no momento da eclosão. Desta forma, pode-se avaliar a importância do conteúdo de vitelo no momento da eclosão através do tempo de sobrevivência das paralarvas em inanição e da temperatura.

Com base neste contexto, este capítulo teve como principais objetivos: 1) Avaliar as fases iniciais do ciclo de vida do polvo comum em laboratório, através do estudo do desenvolvimento embrionário e absorção de vitelo em ovos incubados a temperatura média de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 2) Estimar o peso de vitelo dos ovos ao longo do desenvolvimento embrionário e avaliar sua relação com o peso úmido e seco dos ovos; 3) Examinar o percentual de água e conteúdo orgânico e inorgânico dos ovos; 4) Avaliar o efeito da quantidade de vitelo no momento da eclosão no potencial de sobrevivência de paralarvas mantidas em inanição a duas temperaturas (19°C e 24°C).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de adultos e desova

Um macho e uma fêmea do polvo comum foram coletados no dia 15 de maio de 2004 em Porto Belo ($27^{\circ}09'28''\text{ S}$, $48^{\circ}33'11''\text{ O}$), Santa Catarina. Os animais foram acondicionados em sacos plásticos com água marinha, providos de aeração e transportados em caixas de isopor para o laboratório de Maricultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

Em laboratório, os animais foram mantidos em tanques separados em um sistema de recirculação de água fechado a uma temperatura de 17°C e salinidade 35. Alimento vivo foi oferecido diariamente aos polvos constituído do: siri-azul (*Callinectes sapidus*), siri-chita (*Arenaeus cribrarius*), camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) e camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). O macho foi transferido para o tanque da fêmea após aproximadamente 30 dias de acondicionamento, sendo imediatamente observada a cópula. Após 10 dias a fêmea iniciou a desova, a qual se prolongou por um período de aproximadamente 8 dias.

Os cachos de ovos produzidos foram cuidadosamente amarrados um a um com um barbante e transferidos para um tanque retangular de 120 L, conectado a outro tanque de 96 L, totalizando 216 L. A entrada de água nos tanques foi realizada através de um cano de 25 mm perfurado em toda sua extensão e suspenso a aproximadamente 2 cm do nível da água, no qual os cachos de ovos foram pendurados. A disposição dos cachos de ovos abaixo do cano de entrada de água garante aeração adequada, visando à obtenção de maiores taxas de eclosão. Em cada tanque foi colocada uma moto bomba submersa (SARLO Better 300-110v) com vazão de 280 L/h, para a manutenção de um fluxo contínuo de água entre ambos. Além disso, os tanques foram equipados com aquecedores submersos e mangueiras de ar, para manutenção da temperatura de incubação escolhida e aeração adequada. Os cachos de ovos foram incubados a temperatura média de 24°C (22,5-25) e salinidade 32 (30-34). A aeração foi mantida de forma constante a fim de permitir valores de oxigênio em torno de 8 mg/l.

2.2 Determinação dos estádios de desenvolvimento de *Octopus vulgaris*

Imagens de aproximadamente 50 ovos foram capturadas a cada 48 horas ao longo do desenvolvimento em aumento de 12,5 X e 16 X através do programa IPWin,. Para tal, uma das oculares de um microscópio estereoscópio Olympus SZX-9 foi substituída por uma câmera SONY DXC-197A, conectada a um microcomputador. Através das imagens capturadas foi possível determinar os diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, de acordo com a escala proposta por Naef (1928).

2.3 Peso úmido, peso seco e peso seco livre de cinzas dos ovos

Após a captura de imagens, os 50 ovos mais outros 100, totalizando o número de 150 ovos foram pesados a cada 48 horas para obtenção do peso úmido e peso seco. Para tal, os ovos foram mergulhados rapidamente em água destilada para remoção de cristais de sal, passados em papel absorvente, e após separados em 15 sub-amostras, cada uma contendo 10 ovos, foram pesados em balança analítica (Sartorius Analytyc AC 210S) com precisão de 0,00001 g. Para obtenção do peso seco, as 15 sub-amostras com 10 ovos cada foram colocadas em uma estufa por 24 h a 60° C quando atingiram peso constante. Antes de serem pesadas foram mantidas em um dessecador por pelo menos 4 h. Após, estes ovos foram separados em sub-amostras, cada uma contendo de 15 a 16 ovos, quando o peso mínimo de aproximadamente 5 mg foi atingido. Para obtenção do peso seco livre de cinzas, as sub-amostras foram incineradas em forno mufla a $500 \pm 20^{\circ}\text{C}$ por 6 h, quando atingiram peso constante segundo método de Omori & Ikeda (1984).

2.4 Taxa de absorção de vitelo (Peso do Vitelo)

Para se estimar o volume de vitelo dos ovos as imagens capturadas foram analisadas através do programa de domínio público NIH-Image versão (1.61). Para tal, formas geométricas padrão (cilindro, elipse e esfera) foram sobrepostas às formas do saco vitelínico do embrião em desenvolvimento. Pôr exemplo, o volume do saco vitelínico externo no início do desenvolvimento foi medido por aposição a uma elipse, porém à medida que o vitelo foi sendo absorvido passou a ter a forma esférica. O volume do saco vitelínico interno foi inicialmente medido por aposição a um cilindro, mas à medida que o vitelo foi sendo absorvido passou a ter a forma de elipse ou esfera (Fig. 1).

Entre o 15° e 19° dias de desenvolvimento foi observada a constrição do saco de vitelo, a qual resultou em um prolongamento em forma de cilindro que uniu o saco vitelínico externo e interno do embrião. Porém, esta constrição do saco de vitelo se tornou menos evidente nos dias posteriores do desenvolvimento embrionário.

Após o 21° dia o volume de vitelo dos ovos não pôde mais ser estimado, pois estímulos luminosos ou mecânicos causavam a eclosão prematura das paralarvas.

As seguintes fórmulas foram usadas:

$$\text{Cilindro: } V = \frac{\pi D^2 H}{4}; \quad \text{Elipsóide rotacional: } V = \frac{\pi AB^2}{3}; \quad \text{Esfera: } V = \frac{\pi D^3}{6}$$

Onde V é o volume do vitelo (mm^3), A e B são respectivamente a metade do comprimento e a metade da largura do saco vitelínico e, D e H são respectivamente a largura e o comprimento do saco vitelínico (Fig. 1). Os volumes calculados para o saco vitelínico externo e interno foram somados para obtenção do volume total de vitelo de cada embrião, o qual foi convertido em peso quando multiplicado pela densidade de $1,036 \text{ mg mm}^{-3}$ (O`Dor *et al.* 1986). O peso úmido dos ovos obtido através de pesagens foi comparado ao peso estimado de vitelo, para se estimar o percentual de conversão do vitelo em massa corpórea.

Para se obter o percentual de vitelo das paralarvas no momento da eclosão, a média do peso estimado de vitelo obtido no 21º dia de desenvolvimento foi dividida pela média do peso úmido das mesmas no momento da eclosão (Dia 0).

2.5 Fase pós-embrionária

No primeiro dia de eclosão as paralarvas foram transferidas uma a uma com a utilização de um recipiente de vidro para uma “water table”, constituída por 4 tanques circulares de 50 L. Estas paralarvas foram mantidas em inanição e separadas em dois grupos: a) Inanição a 19° C e, b) Inanição a 24° C . Havia uma réplica para cada um destes grupos e cada réplica foi mantida em um tanque. O número inicial de indivíduos em cada tanque foi de 350 (7 paralarvas L^{-1}). O dia de eclosão foi considerado dia experimental 0 (Dia 0), o próximo dia foi Dia 1 e assim sucessivamente.

2.5.1 Sobrevivência

A mortalidade das paralarvas foi monitorada diariamente através da contagem do número de paralarvas mortas em cada tanque. A sobrevivência foi calculada como a porcentagem do número de paralarvas vivas em cada tanque em relação ao número existente no início do experimento.

3. RESULTADOS

3.1 Fase embrionária

O desenvolvimento embrionário durou de 25 a 32 dias a $24^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$ (Tabela 1). Foram observados diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo cacho de ovos, resultando em um prolongado período de eclosão em consequência da desova parcial.

3.1.1 Descrição do desenvolvimento embrionário de *Octopus vulgaris*

Após a fecundação os ovos sofreram sucessivas divisões mitóticas, iniciando assim o desenvolvimento do embrião. No início do desenvolvimento embrionário ocorreu o aumento no número de células, os blastômeros, porém não no volume celular, sendo esta fase denominada de segmentação ou clivagem.

A distribuição de vitelo nos ovos de *Octopus vulgaris* condicionou a existência da clivagem do tipo meroblástica discoidal, a qual formou um disco de células germinativas no ápice do ovo, o blastodisco, dando início à formação do embrião. Estas células germinativas da margem do disco migraram ao redor da massa vitelínica, originando o saco vitelínico externo, ou seja, a primeira estrutura em formação.

A segmentação ocorreu segundo duas fases distintas, mórula e blástula. Na fase de mórula formou-se um maciço celular com poucas células e na fase de blástula ocorreu o aumento no número celular e a formação de uma cavidade interna. A forma da blastocele varia de acordo com o tipo de ovo e segmentação. No caso dos cefalópodes, os quais possuem ovos telolécitos, não há formação de uma blastocele verdadeira, pois a cavidade formada não é inteiramente delimitada pelos blastômeros, e sim pelo vitelo.

A partir do 1° dia de desenvolvimento embrionário de pôde-se visualizar a segmentação meroblástica discoidal no ápice dos ovos e o início da formação do saco vitelínico externo, pois a blastoderme cobria de 10 a 20 % do comprimento dos ovos (estádios IV e V). Entre o 5° e 7° dias foi observado o aumento no número de células do blastodisco, sendo que a

blastoderme cobriu da 10 a 60% do comprimento dos ovos (estádios IV e VII). Neste estágio de pré-organogênese o vitelo ocupou a maior parte do ovo, ficando restrito a região apical a formação do blastodisco, onde o embrião iniciou seu desenvolvimento. Após o estágio de blástula, inicia-se a gastrulação, ocorrendo o aumento do número de células e volume total do ovo. Neste estágio, ocorre a formação dos três folhetos embrionários, do intestino primitivo e do blastóporo. O blastóporo é o orifício que comunica o intestino primitivo com o ambiente externo, o qual dá origem à boca nos animais protostômios, como os cefalópodes. No presente estudo, após o 7º dia de desenvolvimento foi observado o início da gastrulação, pois ocorreu uma evidente diferenciação entre o pólo animal e pólo vegetativo. O estágio seguinte ao da gastrulação é o da organogênese, que se caracteriza pela diferenciação dos órgãos a partir dos três folhetos embrionários formados na gastrulação. No início da organogênese o embrião de *O. vulgaris* reverte a sua posição dentro do ovo, ou seja, para o lado oposto ao da haste de fixação dos ovos no cacho. No presente estudo, esta reversão pôde ser visualizada no 11º dia de desenvolvimento.

Foram observados oito braços em forma de botão e primórdio das 3 ventosas. Os olhos apresentavam cor alaranjada e estavam em estágio avançado de desenvolvimento, onde deu-se o início da formação da retina e da lente. Também foi observado o início da formação dos estatólitos. Pôde-se ainda observar o desenvolvimento inicial do funil e do manto, sendo que próximo à borda do manto foi verificada a presença das brânquias rudimentares e da papila anal (estádio XIII).

Foi observado que no 13º dia de desenvolvimento os olhos dos embriões estavam mais desenvolvidos, inclusive a retina apresentou coloração vermelha. Outras estruturas visualizadas foram os corações acessórios e os cromatóforos funcionais na região dorsal e ventral do manto e ventral da cabeça, logo abaixo do funil. Neste dia o manto estava mais desenvolvido que no 11º dia, o qual recobriu parcialmente ou totalmente as brânquias e a papila anal dos embriões (estádio XIV).

No 15º dia de desenvolvimento os braços estavam mais desenvolvidos, inclusive com as 3 ventosas bem formadas, típicas de paralarvas recém eclodidas de *O. vulgaris*. Foram observados cromatóforos funcionais distribuídos no manto, braços ventrais, cabeça e funil. O manto e o funil apresentaram as mesmas proporções do 13º dia de desenvolvimento. Os

olhos dos embriões se apresentaram maiores e mais pigmentados quando comparados aos do 13º dia, porém ainda com coloração vermelha (estádio XVI).

No 17º dia foi observado o aumento relativo no tamanho do manto, funil e braços em relação ao tamanho total do embrião. O manto recobriu parcialmente ou totalmente as brânquias, papila anal e região posterior do funil. Foram visualizados cromatóforos nos braços, manto, funil e cabeça. Os olhos também se apresentaram maiores e mais pigmentados, pois já possuíam retina com coloração marrom (estádios XVI a XVIII).

A partir do 19º dia foi observado o início da segunda reversão do embrião que caracteriza o fim do processo de organogênese. Neste dia, os olhos apresentaram retina marrom-escuro e lente bem visível. Outra estrutura visualizada foi a bolsa de tinta na região mediana do manto. O manto e o funil estavam bem desenvolvidos (estádios XIX e XX).

No 21º dia não foram observadas modificações morfológicas nos embriões, em relação ao 19º dia de desenvolvimento (estádios XIX e XX). Neste dia, foi observada uma grande redução do saco vitelínico externo e conseqüentemente, um grande aumento no saco vitelínico interno.

3.1.2 Peso úmido e Peso estimado de vitelo dos ovos

O peso úmido médio dos ovos manteve-se praticamente constante entre o 1º e 7º dia de desenvolvimento (Fig. 2), período no qual foi observada maior variabilidade individual. A partir do 7º dia houve um aumento gradual no peso úmido, o qual passou de 1,07 mg para 1,66 mg no 17º dia, ou seja, 54 % em 10 dias. Porém, a partir do 17º dia o aumento no peso úmido médio dos ovos foi menos pronunciado (14 %), atingindo 1,81 mg no 21º dia, isto é, um aumento de 68 % ao longo do desenvolvimento (Fig. 2).

O peso estimado de vitelo obtido no 1º dia de desenvolvimento foi de 0,50 mg, representando cerca de 46 % do peso úmido médio dos ovos. Durante os primeiros 7 dias de desenvolvimento o vitelo contido nos ovos foi estimado pela associação de sua forma a forma geométrica de uma elipse, não sendo observada grande variabilidade individual. A partir de então, o peso de vitelo apresentou uma diminuição gradual, atingindo o valor de 0,24 mg no 21º dia, isto é, cerca de 13 % do peso úmido. Entre o 13º e 17º dias de desenvolvimento foi constatada maior variabilidade individual no peso estimado de vitelo

dos ovos, período que coincidiu com grande variação na morfologia do saco vitelínico externo e interno do embrião, os quais foram associados às formas de elipse, esfera ou cilindro (Fig. 2).

3.1.3 Peso seco dos ovos

O peso seco representa os constituintes orgânicos e inorgânicos dos ovos após toda a água ter sido eliminada. Similarmente ao peso úmido, o peso seco médio dos ovos apresentou maior variabilidade individual nos primeiros 7 dias de desenvolvimento (Fig. 3). A partir do 7º dia o peso seco se manteve praticamente constante e menos variável, com valores de 0,38 mg no 9º dia para 0,37 mg no 21º dia de desenvolvimento. Próximo ao fim do desenvolvimento embrionário o peso seco médio dos ovos tendeu a se estabilizar (Fig. 3).

3.1.4 Peso seco livre de cinzas dos ovos

Representa o peso do conteúdo orgânico dos ovos livre de água e de materiais inorgânicos. O conteúdo orgânico dos ovos praticamente não variou durante os 15 primeiros dias de desenvolvimento, apresentando valores médios de 0,34 mg no 1º dia e 0,30 mg no 21º dia (Fig. 4). Portanto, uma redução de aproximadamente 12 % no peso orgânico dos ovos foi verificada, ocorrendo principalmente a partir do 15º dia (Fig. 4).

3.1.5 Água como percentual do peso úmido dos ovos

A água representou 58 a 79 % do peso úmido médio dos ovos (Fig. 5). Porém, as modas estiveram nos intervalos de classe de 73 e 79 %. Assim sendo, os maiores teores de água como percentual do peso úmido foram de 73 e 79 % em 60 % dos ovos analisados (Fig. 5).

3.1.6 Peso seco livre de cinzas como percentual do peso seco dos ovos

O conteúdo orgânico dos ovos oscilou de 83 a 95 % do peso seco (Fig. 6). Porém, os maiores teores de matéria orgânica estiveram entre os valores de 83 % e 89 %, e a moda no intervalo de classe de 86 %. Assim sendo, o maior teor de matéria orgânica como percentual do peso seco foi de 86 % em 66 % dos ovos analisados (Fig. 6).

3.1.7 Conteúdo de cinzas como percentual do peso seco dos ovos

O conteúdo inorgânico dos ovos obtido através do peso das cinzas alcançou valores percentuais de 4 a 16 % do peso seco dos ovos (Fig. 7). As maiores frequências obtidas estiveram entre 8 a 16 %, porém a moda esteve no intervalo de classe de 12 %, representando o maior percentual de conteúdo inorgânico presente nos ovos (Fig. 7).

3.2 Fase pós-embrionária

As paralarvas apresentaram, na eclosão, peso úmido médio de 1,03 (\pm 0,10 mg) e peso seco de 0,26 (\pm 0,010 mg). A reserva de vitelo variou de 20 a 32 % do peso úmido do corpo das paralarvas no momento da eclosão.

3.2.1 Sobrevivência

Para as paralarvas mantidas em inanição a 19°C taxas de sobrevivência acima de 70 % foram registradas no Dia 5. As maiores taxas de mortalidade foram registradas entre o Dia 5 e 6 em ambas as réplicas, sendo que uma taxa de mortalidade em torno de 97 % foi verificada no Dia 7 e a maior sobrevivência individual foi de 8 dias.

Para as paralarvas mantidas em inanição a 24° C taxas de sobrevivência acima de 70 % foram registradas no Dia 3. As maiores taxas de mortalidade foram registradas entre o Dia 4 e 6 e no Dia 5 a sobrevivência esteve acima de 40 %. Uma taxa de mortalidade em torno de 95 % foi verificada no Dia 7 e a maior sobrevivência individual foi de 10 dias. Em uma das réplicas o número final de paralarvas dentro do tanque foi diferente do inicial, pois paralarvas sumiram de dentro do tanque, resultando em uma sobrevivência de 20 % ao final do experimento.

4. Discussão

Os resultados demonstraram um aumento de 68 % no peso úmido dos ovos ao longo do desenvolvimento embrionário do polvo comum. Este aumento foi intensificado após o início da organogênese, devido à formação dos tecidos do embrião e à absorção de água.

Simultaneamente, o peso estimado de vitelo diminuiu 48 % ao longo do desenvolvimento, representando apenas 13 % do peso úmido dos ovos no 21º dia. A energia contida no vitelo foi usada na formação dos tecidos embrionários, na respiração e como fonte endógena de alimento para as paralarvas após a eclosão. A reserva de vitelo é de vital importância para a sobrevivência das paralarvas durante os primeiros dias após a eclosão que é o período crítico do cultivo, onde são observadas as maiores taxas de mortalidades (Vidal *et al.* 2002, Vidal *et al.* 2005).

No presente estudo, esta reserva de vitelo representou de 20 a 32 % do peso úmido do corpo das paralarvas na eclosão. É interessante observar que para a lula *Loligo opalescens* proveniente de ovos incubados a 12°C e 16°C, o conteúdo de vitelo representou apenas de 10 a 15% do peso úmido das paralarvas no momento da eclosão (Vidal *et al.* 2002). A reserva de vitelo que as paralarvas do presente estudo apresentaram na eclosão permitiu que as mesmas sobrevivessem até 8 dias a 19° C e até 10 dias a 24° C na ausência de alimento. Porém, as maiores taxas de mortalidade foram registradas entre o Dia 5 e 6 para as paralarvas mantidas em inanição a 19°C, enquanto após o Dia 3 para as mantidas em inanição a 24°C. Como esperado, as maiores taxas de mortalidade foram registradas anteriormente para as paralarvas mantidas a 24°C, e isto se deve provavelmente a absorção de vitelo mais rápida em animais mantidos em maiores temperaturas, devido às maiores taxas metabólicas. Em uma das réplicas mantidas a 24°C uma sobrevivência de 20% ao final do experimento, a qual pode ter sido causada canibalismo, influenciando assim o maior tempo de sobrevivência das paralarvas mantidas a 24°C. Uma outra possibilidade para explicar o maior tempo de sobrevivência destas paralarvas seria a absorção de matéria orgânica particulada (DOM) presente na água do mar (Lucas *et al.* 1987, Manahan 1983). Estudos recentes demonstraram que as paralarvas de *O.vulgaris* são capazes de absorver aminoácidos dissolvidos na água dos tanques de cultivo (Villanueva & Riba 2004).

O peso seco dos ovos se manteve praticamente constante durante todo o desenvolvimento, porém tendeu a se estabilizar próximo ao final da organogênese, devido à completa formação dos tecidos do embrião. A perda de biomassa foi relativamente baixa, pois houve uma redução de apenas 12 % no peso orgânico dos ovos devido ao gasto energético na manutenção do metabolismo dos embriões, sugerindo que o vitelo tenha sido

convertido com eficiência em massa corpórea na temperatura de incubação escolhida ($24 \pm 1^\circ \text{C}$).

Embora o peso orgânico tenha apresentado uma pequena redução ao longo do desenvolvimento, o inorgânico aumentou 54 %. Este aumento pode estar relacionado à formação do bico e estatólito do embrião, bem como, à absorção de sais inorgânicos presentes na água do mar (Berner & Berner 1996). Dois elementos presentes na água do mar também podem ter contribuído, pelo menos parcialmente, para este aumento no peso inorgânico dos ovos, o cobre (Cu) e o estrôncio (Sr). O cobre é utilizado na síntese de hemocianina, o pigmento respiratório presente no sangue dos cefalópodes (Lee 1994). Porém, o estrôncio é um elemento traço essencial para a formação normal dos estatólitos durante o desenvolvimento embrionário (Hanlon *et al.* 1989).

Os cefalópodes apresentam altas taxas de crescimento e um metabolismo acelerado (Forsythe & Van Heukelem 1987). O rápido crescimento é possível devido à ausência de um esqueleto interno e externo, além da eficiente utilização de proteína na dieta. Assim, as diferenças mais marcantes na composição bioquímica dos cefalópodes em relação a outros organismos marinhos são o alto conteúdo de proteínas (75 a 85 % do peso seco) e baixo teor de cinzas (Lee 1994). Os resultados do presente estudo não foram exceção, pois as maiores frequências obtidas do conteúdo orgânico e inorgânico em relação ao peso seco dos ovos foram de 86 % e 11 %, indicando semelhança com a composição bioquímica dos cefalópodes sugerida por Lee (1994).

Os ovos de *Octopus vulgaris* são envolvidos pelo córion, uma membrana semipermeável (Hoechberg *et al.* 1992, Mangold 1983). O embrião libera ao longo do desenvolvimento substâncias que favorecem a entrada de água pelo córion, podendo ocasionar um aumento de até 80 % no volume dos ovos (Boletzky 1998, Boletzky 2003). Durante o desenvolvimento embrionário da sépia *Sepiella japonica* foi registrado um aumento linear no conteúdo de proteínas do fluido perivitelínico dos ovos, sugerindo que as mesmas sejam produzidas pelo embrião e atuem na manutenção da pressão osmótica do fluido perivitelínico em níveis superiores ao da água do mar, possibilitando assim a entrada de água pelo córion (Gomi *et al.* 1986). Estes resultados corroboram com os obtidos no

presente estudo, onde foi ainda observado que a absorção de água não é constante ao longo de todo o desenvolvimento, mas se intensifica após o início da organogênese.

A desova de *Octopus vulgaris* se estende por vários dias resultando em cachos de ovos em diferentes estádios de desenvolvimento. Tal fato, pode explicar a variabilidade individual observada no peso úmido médio dos ovos durante os 7 primeiros dias, já que ovos em diferentes estádios podem conter teores de água desiguais. De acordo, os teores de água dos ovos também foram variáveis nos primeiros 7 dias, comprovando esta ser uma das causas da variabilidade observada no peso úmido.

Segundo Mangold (1983), o tamanho dos ovos pode variar dentro de um mesmo grupo. Foi observado no presente estudo que o peso seco também apresentou maior variabilidade individual durante os primeiros 7 dias, sugerindo então a existência de ovos com diferentes tamanhos em um mesmo cacho. Contudo, após o 7º dia, o peso seco permaneceu praticamente constante. Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes ao observado para a sépia *Sepia officinalis*, pois diferentes teores de água nos ovos foram apontados como causadores da variabilidade no peso úmido (Bouchaud & Daguzan 1990). Além disso, o peso seco dos ovos de *S. officinalis* incubados em diferentes temperaturas (12° C, 15° C, 18° C e 21° C) mantiveram-se praticamente constantes ao longo de todo o desenvolvimento (Bouchaud & Daguzan 1990).

De forma similar ao presente estudo, foi observado um aumento no peso úmido dos ovos após o início da organogênese para *Octopus mimus*, sendo que o teor de água dos ovos também representou por volta de 80 % do peso úmido (Fuentes *et al.* 2002). Os polvos adultos apresentam cerca de 82 % de água em sua composição corporal, indicando que esta representa o seu principal constituinte e corroborando com os resultados obtidos (O`Dor & Wells, 1987). Ainda, no presente estudo foi constatado que o percentual de água dos ovos e paralarvas de *O. vulgaris* são similares, pois a água representou de 71 a 79 % do peso úmido das paralarvas na eclosão. Cabe ressaltar, que as paralarvas apresentaram um percentual de água levemente inferior ao dos ovos, pois estavam livres do córion e do fluido perivitelínico. Em paralarvas da lula *Loligo opalescens* foi verificado que o percentual de água representou de 74 a 80 % do peso úmido (Vidal *et al.* 2002). Portanto, os resultados do presente estudo indicam que o teor de água nos tecidos dos cefalópodes já

se estabelece durante o desenvolvimento embrionário e parece não diferir consideravelmente entre diferentes espécies.

Os ovos dos cefalópodes são envolvidos pelo saco vitelínico externo durante a gastrulação (Boletzky 1989, Boletzky 2002). Estudos sobre a absorção de vitelo em cefalópodes demonstraram que o saco vitelínico pode ser considerado como um órgão independente, onde a atividade enzimática do seu sincício atua na digestibilidade dos glóbulos de vitelo (Boletzky 1975). A organogênese somente tem início após a completa formação do saco vitelínico externo (Boletzky 1989), o qual torna-se conspícuo devido à progressiva contração da zona brachial e cefálica do embrião. Posteriormente, a compressão do saco vitelínico externo e pressão exercida por órgãos situados na massa visceral do embrião, resulta na formação de um prolongamento em forma de cilindro que une o saco vitelínico externo ao interno do embrião, aqui denominado de constrição do saco vitelínico. Segundo Boletzky (2002), enquanto existe uma variação relativamente maior na morfologia do saco vitelínico em estádios embrionários posteriores, pouca variação ocorre no início do desenvolvimento. Assim, no presente estudo o peso de vitelo dos ovos foi estimado pela associação de sua forma morfológica a forma geométrica de uma elipse durante os primeiros 7 dias de desenvolvimento. Nestes dias, foi observada pouca variabilidade individual no peso de vitelo dos ovos, sendo que os mesmos estavam em fase gástrula e o saco vitelínico externo não estava completamente formado, resultando em uma menor área de absorção e, portanto, no consumo mais lento de vitelo. Entre os dias 13° e 17° houve uma maior variabilidade no peso estimado de vitelo, devido provavelmente a maior variação morfológica do saco vitelínico externo e interno dos embriões. Os resultados deste estudo sugerem que a variabilidade morfológica do saco vitelínico é decorrente da heterogeneidade na absorção de vitelo entre embriões de um mesmo cacho, resultando em uma variabilidade natural no peso de vitelo dos ovos. Porém, é importante ressaltar que a maior variabilidade ocorreu em estádios intermediários de desenvolvimento, após o início da organogênese.

Embora o peso estimado de vitelo tenha se mantido praticamente constante durante a gastrulação, o mesmo diminuiu 48% após o início da organogênese, representando 23% do peso úmido das paralarvas na eclosão. Assim, os resultados do presente estudo mostraram

que ovos incubados a 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), produzem paralarvas com uma relação entre o peso do vitelo e o peso úmido do corpo bastante elevada (23%) e um baixo gasto metabólico (12%). Entretanto, visando-se reduzir os custos metabólicos, os resultados do presente estudo também indicam que após a eclosão as paralarvas devem ser mantidas à menores temperaturas. Estes resultados têm grande aplicabilidade para a aqüicultura, pois estão relacionados ao potencial de sobrevivência das paralarvas durante a larvicultura. Paralarvas com maior quantidade de vitelo provavelmente terão maior habilidade na competição por alimento e resistência à inanição. Contudo, a eficiência da utilização do vitelo durante o desenvolvimento embrionário necessita ser avaliada em diferentes temperaturas, para se obter uma maior compreensão da temperatura ótima para a incubação dos ovos de *O. vulgaris*, o que pode refletir no maior potencial de sobrevivência das paralarvas após a eclosão.

LITERATURA CITADA

- BERNER, EK & RA BERNER. 1996. Global environment: water, air, geochemical cycles. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, USA. 376p.
- BOLETZKY, SV. 1975. A contribution to the study of yolk absorption in the cephalopoda. *Z. Morph. Tiere.*, 80: 229-246.
- BOLETZKY, SV. 1989. Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Adv. Mar. Biol.*, 25: 85-115.
- BOLETZKY, SV. 1998. Cephalopods eggs and egg masses. *Ocenography an Marine Biology: an Annual Review.*, 36: 341-371.
- BOLETZKY, SV. 2002. Yolk sac morphology in cephalopod embryos. *Abhandlungen der geologischen bundesanstalt.*, 57: 57-68.
- BOLETZKY, SV. 2003. Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv. Mar. Biol.*, 44: 143-203.
- BOUCHAUD, O & J DAGUZAN. 1990. Étude expérimentale de l'influence de la température sur le déroulement embryonnaire de la seiche *Sepia officinalis* L. (Céphalopode, *Sepioidae*). *Cah. Biol. Mar.*, 31: 131-145.
- BOUCHAUD, O. 1991. Energy consumption of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during embryonic development, preliminary results. *Bulletin of marine science.*, 49 (1-2): 333-340.
- CARRASCO, JF, C RODRIGUEZ & M RODRIGUEZ. 2003. Cultivo intensive de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier 1797), en tanques parabólicos de 30 l utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. In: *IX Congreso Nacional de Acuicultura* (anais). Espanha. 191-194p.
- FORSYTHE, JW & VAN HEUKELEM, WF. 1987. Growth. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*, vol. 2. Academic Press, London, 351-365p.
- FUENTES, HC, AO PAZ, AO FELLAY & OZ ROMERO. 2002. Descripción del desarrollo embrionario y paralarva de *Octopus mimus* (Gould, 1852) (Mollusca: Cephalopoda) en cautiverio. *Estud. Oceanol.*, 21: 13-25.
- GOMI, F, M YAMAMOTO & T NAKAZAWA. 1986. Swelling of egg during development of the cuttlefish, *Sepiella japonica*. *Zoological Science.*, 3: 641-645.

- HAMAZAKI, K, K FUKUNAGA, Y YOSHIDA & K MARUYAMA. 1991. Effects of marine microalgae *Nanocloropsis* sp. On survival and growth on rearing pelagic paralarvae of *Octopus vulgaris*, and results of mass culture in the tank of 20 metric tons. *Saibai-giken.*, 19: 75-84.
- HANLON, RT, JP BIDWELL & R TAIT. 1989. Strontium is required for statolith development and thus normal swimming behaviour of hatchling cephalopods. *J. exp. Biol.*, 141:187-195.
- HOCHBERG, FG, M NIXON & RB TOLL. 1992. *Octopus vulgaris*. In: Sweeney et al. (ed) "Larval" and juvenile cephalopods: a manual for their identification. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 503., 211-268
- IGLESIAS, J, FJ SÁNCHEZ, JJ OTERO & C MOXICA. 2000. Cultivo del pulpo (*Octopus vulgaris*, Cuvier): situación actual, problemas y perspectivas. *Cahiers Options Méditerranéennes.*, 77: 313-321.
- IGLESIAS, J, JJ OTERO, C MOXICA, L FUENTES & FJ SÁNCHEZ. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier) under culture conditions: paralarvae rearing using Artemia and Zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International.*, 12: 481-487.
- INAMURA, S. 1990. Larval rearing of octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier). The progress of technological development and some problems remained. *Collecting and Breeding.*, 52: 339-343).
- ITAMI, K, Y IZAWA, S MAEDA & K NAKAI. 1963. Notes on the laboratory culture of the octopus larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 29: 514-520.
- LEE, PG. 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.*, 25: 35-51.
- LUCAS, MI, RC NEWELL, SE SHUMWAY, LJ SEIDERER & R BALLY. 1987. Particle clearance and yield in relation to bacterioplankton and suspended particulate availability in estuarine and open coast populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecol. Prog. Ser.*, 36: 215-224.
- MANAHAN, TD. 1983. The uptake and metabolism of dissolved amino acids by bivalve larvae. *Biol. Bull.*, 164: 236-250.
- MANGOLD, K. 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, vol. I, 335-364p.
- MANGOLD, K. 1987. *Octopus vulgaris*. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, Vol. I, pp 335-364.

- MOXICA, C, JJ OTERO, J IGLESIAS & FJ SÁNCHEZ. 2001. Comportamiento reproductor, puestas y desarrollo embrionario del pulpo *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1798) en cautividad. In: 7^o Congreso Nacional de Acuicultura (anais). Los Palmos de Gran Canaria. 549-554p.
- MOXICA, C, F LINARES, JJ OTERO, J IGLESIAS & FJ SÁNCHEZ. 2002. Cultivo intensivo de pulpo, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, en tanques de 9 m³. Bol. Inst. Esp. Oceanogra., 18 (1-4): 31-36.
- NAEF, A. 1928. Cephalopoda, Embriology. Part I, Vol II (Mongraph No. 35). Fauna and Flora of the Bay of Naples, vol. 35. Translated by the Smithsonian Institution Libraries, Washington, DC, pp. 1-461.
- O'DOR, RK, EA FOY, PL HELM, N BALCH. 1986. The locomotion and energetics of hatchling squid *Illex illecebrosus*. *Amer. Mall. Bull.*, 4: 55-60.
- O'DOR, RK & MJ WELLS. 1987. Energy and nutrient flow. In Boyle P.R. (Ed.), *Cephalopod life cycles*, vol. 2. Academic Press, London, 109-133p.
- OMORI, M & T IKEDA. 1984. Methods in marine zooplankton ecology. John Wiley & Sons Publ., New York. 332p.
- VAZ-PIRES, P, P SEIXAS & A BARBOSA. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture*, 238: 221-238.
- VIDAL, EAG, PF DIMARCO, JH WORMUTH & PG LEE. 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. *Bul. Mar. Sci.*, 71: 915-931.
- VIDAL, EAG, MJ ROBERTS & RS MARTINS. 2005. Yolk utilization, metabolism and growth in reared *Loligo vulgaris reynaudii* paralarvae. *Aquat. Living Resou.*, 18: 385-393.
- VILLANUEVA, RN. 1994. Decapod crab zoeae as food for rearing cephalopod paralarvae. *Aquaculture.*, 12: 143-152.
- VILLANUEVA, R. N. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2639-2650.
- VILLANUEVA, RN & J RIBA. 2004. Aminoacid composition of early stages of cephalopods and effect of aminoacid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*. 242 (1-4): 455-478.

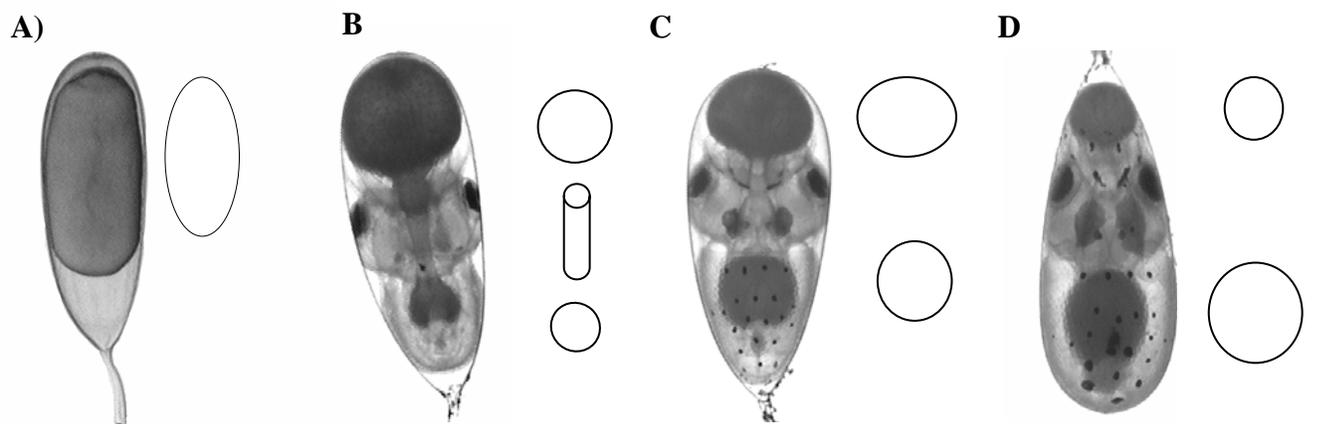


Figura 1. Ovos de *Octopus vulgaris* em vista ventral. A) Vitelo associado a forma de uma elipse do 1° ao 9° dia de desenvolvimento; B) Vitelo associado a forma de elipse e cilindro entre o 11° e 13° dia; C) Vitelo associado a forma de esfera e cilindro no 15° dia; D) Vitelo associado a forma de elipse, cilindro e esfera entre o 17° e 19° dia; E) Vitelo associado a forma de esfera ou elipse no 21° dia.

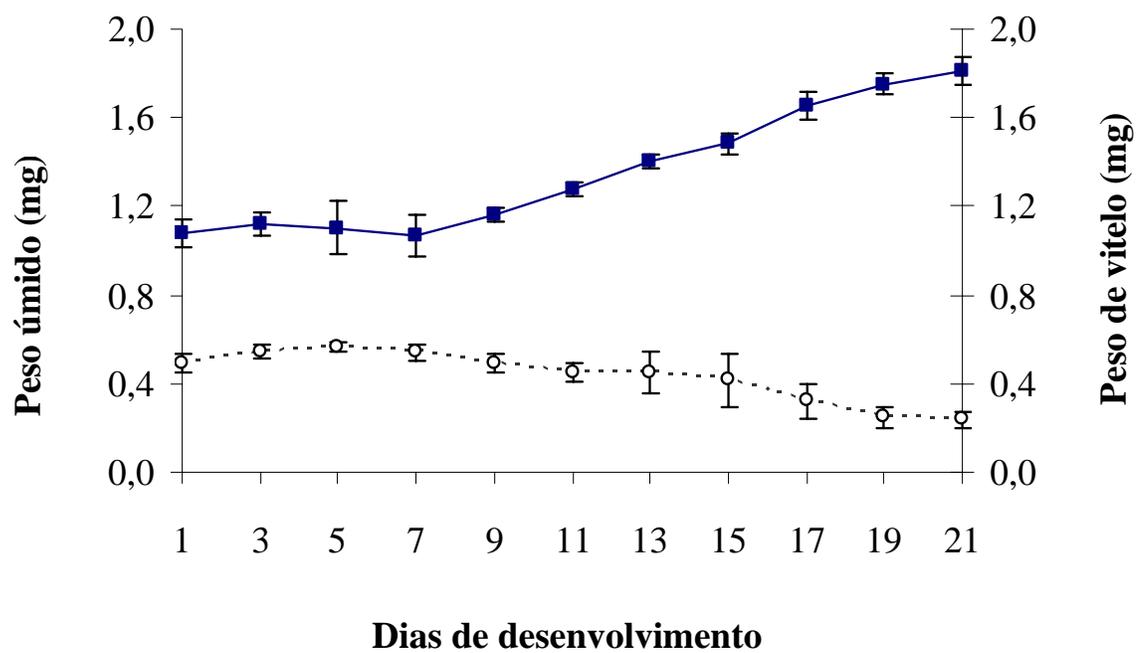


Figura 2. *Octopus vulgaris*. Peso úmido e peso estimado de vitelo de ovos incubados à temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e salinidade 32. Valores médios de 150 ovos \pm Desvio padrão ($n= 1.690$). A linha contínua representa o peso úmido e a pontilhada o peso estimado de vitelo.

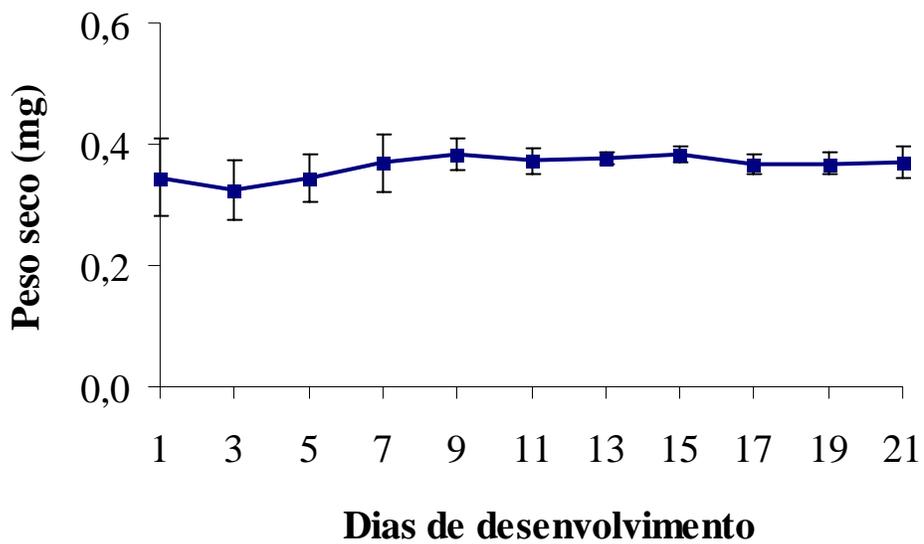


Figura 3. *Octopus vulgaris*. Peso seco médio de ovos incubados à temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade 32. Valores médios de 150 ovos \pm Desvio padrão (n= 1.614).

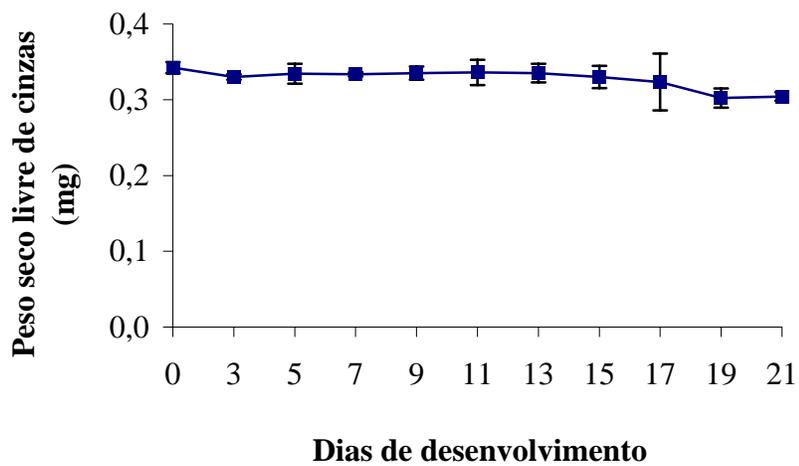


Figura 4. *Octopus vulgaris*. Peso seco livre de cinzas de ovos incubados à temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade 32. Valores médios \pm Desvio padrão (n= 630).

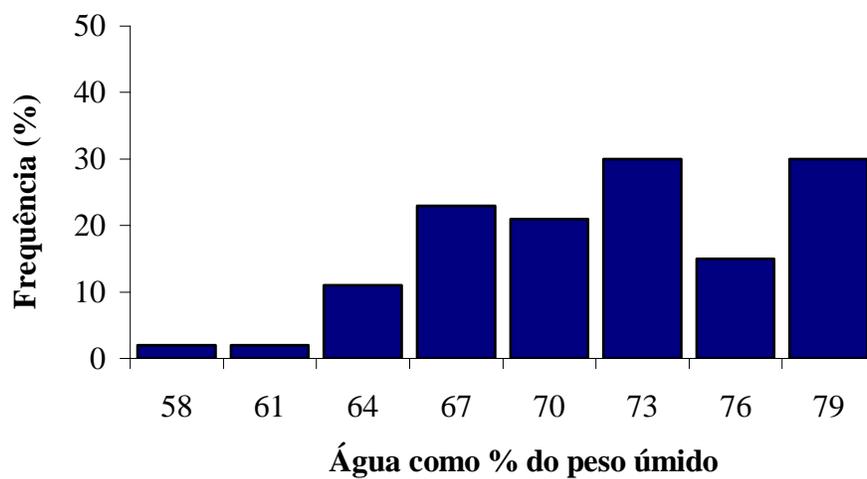


Figura 5. *Octopus vulgaris*. Distribuição de frequência do conteúdo de água em percentual do peso úmido em ovos incubados à temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade 32.

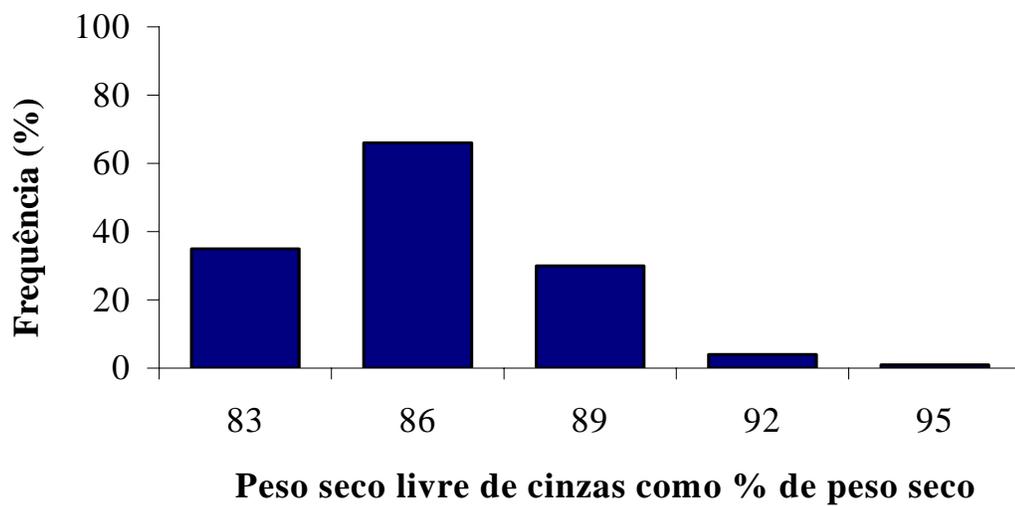


Figura 6. *Octopus vulgaris*. Distribuição de frequência do peso seco livre de cinzas em percentual do peso seco de ovos incubados à temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade 32.

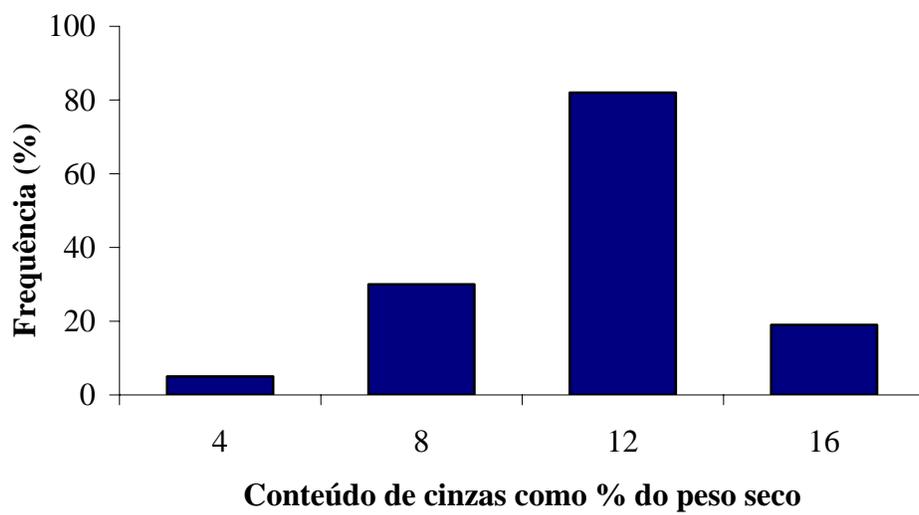


Figura 7. *Octopus vulgaris*. Distribuição de freqüência do conteúdo de cinzas em percentual do peso seco de ovos incubados em temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade 32.

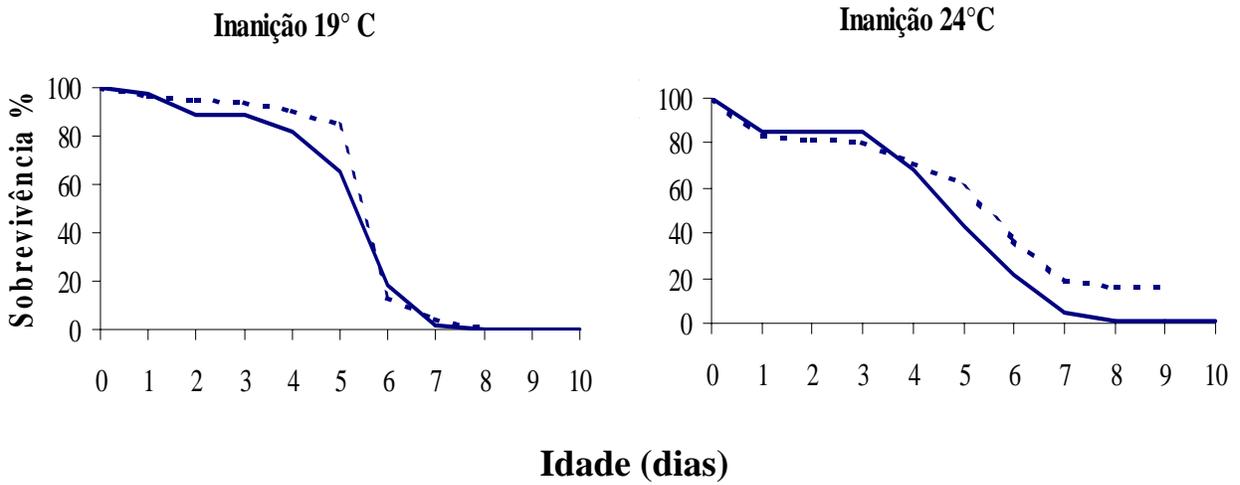


Figura 8. *Octopus vulgaris*. Percentual de sobrevivência de paralarvas mantidas em inanição a 19° C e 24°C. Cada linha representa uma réplica.

TABELA 1: Principais alterações ocorridas durante o desenvolvimento embrionário de *Octopus vulgaris*, à temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e salinidade 33. Os estádios de desenvolvimento foram determinados de acordo com a escala proposta por Naef (1928). PS, peso seco médio; Pu, peso úmido médio. Pv, peso médio do vitelo; Sve, saco vitelínico externo; Svi, saco vitelínico interno; V, região ventral; D, região dorsal; Cr, cromatóforos.

Dias de desenvolvimento	Vitelo	Demais observações
1°	Vitelo em forma elíptica, disposto na porção inferior do blastodisco. Representou 46% do peso úmido médio dos ovos. Pv (0,50 mg)	Pré-organogênese (Gastrulação): Blastodisco evidente no ápice dos ovos (estádios IV-V).
3°	Vitelo em forma elíptica e alongado. Pv (0,54 mg).	Ovos em estádios iniciais de desenvolvimento (estádios IV-V).
5°	Vitelo em forma elíptica e menos alongado que no 3° dia. Pv (0,56 mg).	A maior parte dos ovos em VI, porém alguns ainda se encontram no estágio V.
7°	Vitelo restrito ao pólo vegetativo. Pv (0,54 mg).	Ovos em estágio mais avançado de desenvolvimento (estádios VI-VII).
11°	Sve e Svi formados, em forma de elipse e cilindro, respectivamente. O embrião se apresenta discretamente separado do Sve. Pv (0,45 mg)	Início da organogênese: foi observada a 1° reversão do embrião (estádio XIII).
13°	Redução do Sve e aumento do Svi. Pv (0,45 mg).	Manto um pouco mais alongado que no 11° dia; Cromatóforos funcionais no manto e na região ventral da cabeça, abaixo do funil (estádio XV).
15°	Sve em forma de esfera, e o Svi de esfera ou cilindro. Pv (0,41 mg).	Braços mais desenvolvidos, inclusive com as 3 ventosas típicas de paralarvas recém eclodidas; Cromatóforos funcionais no manto, funil, cabeça e braços ventrais (estádio XVI).
17°	Sve em forma de elipse ou esfera. O Svi com forma de cilindro e ou esfera. Pv (0,32 mg).	Cromatóforos nos braços, manto e cabeça; Manto recobre parcialmente ou completamente a margem posterior do funil (estádios XVII-XVIII).
19°	Sve em forma de esfera ou elipse, o Svi em cilindro, esfera ou elipse. Redução de 50% no peso estimado de vitelo, o qual representou 14 % do peso úmido dos ovos. Pv (0,25mg).	Final da organogênese: foi observada a 2° reversão do embrião (estádios XIX-XX).
21°	Sve em forma de esfera ou elipse e Svi em forma de esfera. Redução de 48% no peso estimado de vitelo, o qual representou 13 % do peso úmido dos ovos. Pv (0,24mg).	Embrião formado (XIX-XX)
Paralarva recém eclodida	Paralarvas eclodiram após o Sve ter sido completamente absorvido. Pu (1,03 mg) e Ps (0,26 mg)	Braços curtos com três ventosas. Braços: V e D (3Cr) Cabeça: D (10 Cr); V(2 Cr). Manto: D (6-7 Cr) e V (18-24 Cr). Funil: (4 Cr)

CAPÍTULO II

Descrição morfológica de paralarvas da costa sul do Brasil e comparação do padrão de cromatóforos entre paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia (Vigo, Espanha).

RESUMO

O polvo comum (*Octopus vulgaris*) é cosmopolita e recentes evidências sugerem que o mesmo seja membro de um complexo de espécies crípticas. Neste caso, diferenças no padrão de cromatóforos de paralarvas de diferentes localidades poderia indicar até mesmo a ocorrência de sub-espécie. Assim, o objetivo deste trabalho foi contribuir para o avanço da identificação de estádios paralarvais de *O. vulgaris* através da descrição morfológica de paralarvas da costa sul do Brasil. Além disso, o padrão de cromatóforos destas paralarvas foi comparado ao de paralarvas provenientes da Galícia (Vigo-Espanha). Paralarvas da costa sul do Brasil com 0, 6, 10, 13 e 17 dias de idade foram cultivadas à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e após a captura de imagens as mesmas foram preservadas em álcool 70% e formalina 4%. Através das imagens capturadas medidas de estruturas morfométricas foram tomadas, tais como: comprimento (CM) e largura (LM) do manto, comprimento do funil (CF) e largura da cabeça (LC). O padrão de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil foi comparado ao de paralarvas da Galícia (Vigo-Espanha) através de imagens cedidas. As paralarvas brasileiras e galegas apresentaram na eclosão 3-4 cromatóforos nos braços, sendo observado um notável acréscimo apenas para as últimas (3-9). O número de cromatóforos na região dorsal da cabeça das paralarvas brasileiras (8-11) e galegas (8) foram semelhantes. Ventralmente foi observado menor número para as brasileiras (2-4), quando comparadas às galegas (6-8). Na região dorsal dos olhos as paralarvas brasileiras apresentaram 1-4 cromatóforos, enquanto as galegas 1-2. Ventralmente, as brasileiras apresentaram 1-2 e as galegas apenas 1. As paralarvas brasileiras apresentaram desde a eclosão um maior número de cromatóforos (20-28) na região ventral do manto, quando comparadas as galegas (15-20). Foram observados 4-6 cromatóforos no funil das paralarvas brasileiras e 4 galegas. Os resultados indicam diferenças no padrão de cromatóforos entre as paralarvas das duas localidades, porém para comprovar se as mesmas se devem à complexidade de espécies seria necessário o suporte de genética molecular.

ABSTRACT

The common octopus (*Octopus vulgaris*) is cosmopolitan, but recent evidences suggest that the same could be a member of a complex of criptical species. In this case, differences in pattern of chromatophores of paralarvae of different localities could indicate even an existence of sub-specie. Thus the aim of this work was to contribute for the advance of identification of “larval” stages of *O. vulgaris* through the morphological description of paralarvae of south coast of Brazil. moreover the pattern of chromatophores of these paralarvae was compared to those of paralarvae from Galicia (Vigo, Spain) paralarvae of south coast of Brazil with 0, 6, 10,13,17 days of age have been cultivated a at $20^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ and after the catch of images, the same were kept in alcohol 70% and formalin 4% through the captured images, measurements of structures were taken, such as: length (ML) and width (MW) of the mantle, length of funnel (FL) and the width of head (HW). The pattern of chromatophores of paralarvae of south coast of Brazil was compared to those of paralarvae of Galicia (Vigo, Spain) through the given images. The Brazilian and Galician paralarvae showed in the eclosion (3-4) chromatophores on the arms, and it has been observed considerable increase only on the last ones. The number of chromatophores on the dorsal area of the head of Brazilian paralarvae and Galician were similar. What the ventral area was concerned it has been observed smaller number for the Brazilian paralarvae (2-4) compared to those of Galician (6-8) on the dorsal area of eyes the Brazilian paralarvae showed (1-4) chromatophores, mean while the Galician (1-2) what ventral area is concerned the Brazilian showed (1-2) and the Galician only 1. The Brazilian paralarvae showed since the eclosion a higher number of chromatophores (20-28) on the ventral region of the mantle, compared to the Galician (15-20). It has been observed (4-6) chromatophores in the funnel of Brazilian paralarvae and 4 in the Galician. These results point out differences on the pattern of chromatophores between the paralarvae of the both localities, however to evaluate in that level the same ones can be involved in the complexity of the species position of these paralarvae, it would be necessary molecular genetics support.

1. INTRODUÇÃO

O polvo comum (*Octopus vulgaris*) apresenta ampla distribuição em águas tropicais, subtropicais e temperadas, ocorrendo desde o Oceano Atlântico e Índico até o oeste do Pacífico (Mangold 1983), e inclusive ao longo de praticamente toda a costa brasileira (Haimovici *et al.* 1994). O polvo comum é cosmopolita, e recentes evidências sugerem que o mesmo seja membro de um complexo de espécies crípticas (Mangold 1998).

Segundo Sweeney *et al.* (1992), as paralarvas de apenas quatro espécies de *Octopus* foram estudadas em detalhe e, entre outras espécies, as de *Octopus vulgaris* Cuvier 1797 necessitam ser re-examinadas. A posição taxonômica de muitas espécies de cefalópodes do gênero *Octopus* é incerta, isto é particularmente verdadeiro para *Octopus mimus*, o qual foi considerado por um grande período como sinônimo de *O. vulgaris* e somente recentemente reconhecido como uma nova espécie (Warnke 1999, Warnke *et al.* 2000).

O tipo de *O. vulgaris* foi denominado somente no ano de 1988, quando um dos grupos de trabalho do CIAC (Cephalopod International Advisory Council) selecionou um neótipo em Banyuls-sur-Mer (Oeste do Mediterrâneo), o qual é geograficamente restrito ao Mediterrâneo e leste do Atlântico. De acordo com esta nova descrição, as espécies morfologicamente semelhantes capturados em águas da América do Sul são frequentemente denominadas de espécies “*O. vulgaris-like*” (Söller *et al.* 2000).

A descrição da diversidade genética entre espécimes “*O. vulgaris-like*” e a respectiva reconstrução da árvore filogenética foram realizadas por Söller *et al.* (2000). As diversas sequências de DNA investigadas foram baseadas em genes mtCOIII de exemplares de *Octopus mimus* Gould, 1852, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 e *Scaevurgus unicolor* Chiaie, 1839. Os espécimes de *O. vulgaris* analisados eram provenientes de diferentes regiões geográficas, tais como: oeste do Mediterrâneo, França (Banyuls-sur-Mer); sudoeste do Atlântico (Itajaí- SC); noroeste do Atlântico (Recife, PE); leste do Pacífico (Costa Rica); mar do Caribe (Costa Rica). Os autores tentaram correlacionar dados de distância genética e geográfica, no entanto foi observado que *O. vulgaris* do Mediterrâneo apresentou pouca distância genética quando comparado a espécimes de *O. vulgaris* do sul do Brasil. Em contraste, grande distância genética foi observada entre espécimes do sul e norte do Brasil,

porém o último apresentou similaridade genética quando comparado a espécimes de *O. vulgaris* da Costa Rica.

Outra informação que pode ser bastante útil para avaliar a complexidade de espécies seria analisar o padrão de cromatóforos de paralarvas de diferentes regiões geográficas. De acordo, segundo Berry (1912) o padrão de cromatóforos de paralarvas pode ser usado como um meio rápido e relativamente fácil de identificação visual, pois são característicos para cada espécie. Os cromatóforos são órgãos neuromusculares que consistem de um *sacculus* elástico com pigmento, cercados por fibras musculares radiais inervadas por neurônios motores (Messenger 2001). Os neurônios motores quando estimulados atuam na contração dos músculos radiais, causando a expansão do *sacculus* e a mudança de cor da pele dos cefalópodes (Ferguson & Messenger 1991). Assim, a principal função dos cromatóforos é a camuflagem, seguida de comunicação intraespecífica e interespecífica entre os cefalópodes (Messenger 2001).

O ciclo de vida de muitas espécies de cefalópodes com paralarvas planctônicas são pouco estudados e inadequadamente descritos (Sweeney *et al.* 1992). A principal causa diz respeito à escassez de informações sobre a distribuição de paralarvas na natureza (Rocha *et al.* 1999), o que dificulta estudos taxonômicos. Entretanto o cultivo destes animais pode representar uma ferramenta viável na busca do maior conhecimento do ciclo de vida e biologia destas espécies.

O presente trabalho tem por objetivo contribuir para o maior conhecimento da biologia de *Octopus vulgaris* através da descrição morfológica de paralarvas da costa sul do Brasil, bem como comparar o padrão de cromatóforos entre paralarvas da costa sul do Brasil e às paralarvas provenientes da Galícia (Vigo, Espanha). Estas informações podem também auxiliar na identificação das paralarvas de *O. vulgaris* de diferentes regiões geográficas, levando em consideração o padrão de cromatóforos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta, transporte e acondicionamento da fêmea e cachos de ovos

Uma fêmea (1340 g) com cachos de ovos foi coletada no dia 13 de fevereiro de 2004 em Bombinhas (27°07'54" S, 48°31'40" O), Santa Catarina. Em laboratório, a fêmea e os cachos de ovos foram mantidos em um sistema de recirculação de água fechado a uma temperatura média de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e salinidade 33. Os cachos de ovos foram cuidadosamente amarrados um a um com um barbante e acondicionados junto com a fêmea em um tanque retangular de 120L.

2.2 Fase pós-embrionária

Após a eclosão, as paralarvas foram transferidas uma a uma com a utilização de um recipiente de vidro para um sistema de recirculação de água fechado, constituído por 6 tanques circulares de 96 L conectados a um filtro biológico. Foram oferecidos como alimento as paralarvas náuplios de *Artemia* spp. enriquecidos com SUPER SELCO (INVE®), copépodes (*Acartia tonsa*, *Temora turbinata*, *Oncaea* spp., *Paracalanus* sp.) e misidáceos juvenis (*Metamysidopsis elongata atlantica*). Também foram oferecidos eventualmente zoés de siri-azul (*Callinectes sapidus*) e do caranguejo (*Cyrtograpsus angulatus*), obtidas através da manutenção de fêmeas ovadas em laboratório.

2.3 Captura de imagens e medidas de estruturas morfológicas de paralarvas

Para a captura de imagens, as paralarvas foram anestesiadas com cloreto de magnésio, de acordo com Oestmann *et al.* (1997). As imagens foram obtidas em aumento de 10X em microscópio estereoscópio Olympus SZX-9, na qual a ocular foi substituída por uma câmera SONY DXC- 197A conectada a um microcomputador. As imagens foram capturadas através do programa IPWin e posteriormente analisadas com o auxílio do programa de domínio público NIH-Image versão (1.61). Assim, o crescimento de estruturas morfológicas foram obtidas, tais como: comprimento do manto (CM), largura do manto (LM), comprimento do funil (CF) e largura da cabeça (LC) (Fig. 1).

2.4 Padrão de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil

O padrão de cromatóforos representa a disposição com que os mesmos se distribuem em determinadas regiões do corpo das paralarvas, sendo aqui descritos como sugerido por Hoechberg *et al.* (1992). Portanto, o padrão foi descrito da região anterior em direção a posterior. Por exemplo, o padrão de distribuição comumente observado no funil: 2+2 significa que 2 estão localizados próximos ao seu orifício, e os outros 2 em direção a sua base (Fig. 2). A respectiva denominação dos cromatóforos foi determinada de acordo com Fiorini (1965) e Packard (1985), através de sua localização nas diferentes regiões do corpo das paralarvas (Fig. 3).

Durante a larvicultura, amostras de 10 a 15 paralarvas com idades de 0, 6, 10, 13 e 17 dias foram coletadas dos tanques de cultivo e preservadas em formalina 4% e álcool 70%. Estas paralarvas foram levadas ao microscópio estereoscópio Olympus SZ 40, no qual foi acoplado um duplicador Olympus Japan 110 AL2X, para a observação do padrão de distribuição e coloração dos cromatóforos. Posteriormente, foram realizados desenhos esquemáticos em lupa acoplada a uma câmara clara (Fig. 4) de três paralarvas, com 0, 10 e 17 dias de idade (Fig. 5).

2.5 Diferenças entre o padrão de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia (Vigo, Espanha).

O padrão de cromatóforos de paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil foi comparado ao de paralarvas da Galícia com idades de 0, 6, 10 e 17 dias, através de imagens cedidas pela equipe do Dr. José Iglesias, do Instituto Espanhol de Oceanografia (IEO), na sede de Vigo, Espanha (Fig. 6). Os ovos e paralarvas de ambas as localidades foram incubados e mantidos à temperaturas de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3. RESULTADOS

3.1 Descrição de paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil

O padrão de cromatóforos das paralarvas de *Octopus vulgaris* aqui descrito foi obtido de animais com comprimento de manto (CM) médio de 1,5 a 2,0 mm (Tabela 1). O CM foi medido dorsalmente, desde a extremidade posterior até a borda anterior do manto.

Paralarvas recém-eclodidas (Dia 0)

1,50 mm CM (Fig. 4A, 4B e 4C) e (Fig. 5A e 5B): Manto: Alongado com forma de U, apresentando largura equivalente a 3/4 do CM. **Cabeça:** Levemente quadrada, com largura média de 0,93 mm e representando um pouco mais de 3/5 do CM. **Funil:** Bem desenvolvido, com comprimento médio de 0,84 mm, ocupando quase todo o comprimento da cabeça e atingindo a base do 4° par de braços. **Olhos:** Conspícuos e ligeiramente ventrais, ocupando aproximadamente metade do comprimento da cabeça. **Braços:** São pontiagudos em sua região distal e apresentam aproximadamente o mesmo tamanho, cada um possui 3 ventosas na região aboral. **Cromatóforos: Braços:** Dorsalmente, 1° par com 4 e 2° par com 3, todos dispostos em série única. Ventralmente, 3° par com 3 e 4° par com 4, também dispostos em série. **Cabeça:** Dorsalmente 8, 4 encobertos pela borda do manto, 2 na base dos olhos e outros 2 entre os olhos em posição mediana. Ventralmente 2, os quais estão encobertos pelo funil. **Olhos:** Dorsalmente 4, 2 na margem superior do olho (sobre a membrana epitelial que recobre o animal), 2 sobre o olho. Ventralmente 2, 1 adjacente a base do 4° par de braços e outro na margem superior, sob a base do 3° par de braços. **Funil:** 4, 2 estão localizados próximo à abertura do funil, 2 posteriormente e adjacentes à margem do manto. **Manto:** Dorsalmente 6, 4 dispostos anteriormente e adjacentes à borda do manto e outros 2 na região posterior. Sob o manto e acima da glândula digestiva, estão localizados 6 cromatóforos extrategumentais ou viscerais. Ventralmente 20, 5 logo abaixo da margem do manto e os restantes distribuídos aleatoriamente sem nenhum padrão específico. **Coloração:** A coloração dos cromatóforos depende do grau de expansão do *sacculus* elástico, no qual estão contidos os grânulos de pigmento. **Cromatóforos contraídos: Manto:** Dorsalmente vermelhos, porém os extrategumentais são pretos. Ventralmente pretos. **Cabeça:** Dorsalmente e ventralmente pretos. **Funil:** pretos. **Olhos:** vermelhos e

pretos. **Braços:** Dorsalmente, vermelhos. Ventralmente pretos. **Cromatóforos expandidos:** **Manto:** Dorsalmente laranjas ou amarelos, porém os extrategumentais são marrons ou laranjas. **Cabeça:** Dorsalmente e ventralmente marrons ou laranjas. **Funil:** marrons ou laranjas. **Olhos:** vermelhos. **Braços:** Dorsalmente, laranjas ou amarelos. Ventralmente, vermelhos, laranjas ou amarelos. A coloração dos cromatóforos se manteve ao longo do desenvolvimento morfológico, e por isso somente foi descrita a coloração de paralarvas recém-eclodidas.

Paralarvas com 6 dias de idade (Dia 6)

1,62 mm CM: Manto: Alongado, extremidade posterior ligeiramente em forma de U. **Cabeça:** sem modificações morfológicas marcantes. **Funil:** Apresenta comprimento médio de 0,91 mm, com ápice disposto paralelamente à margem superior dos olhos. **Olhos:** Proeminentes. **Cromatóforos: Braços:** sem modificações. **Cabeça:** Dorsalmente 9, 4 encobertos pela borda do manto, 3 estão dispostos em série horizontal e adjacentes a base dos olhos, dos quais 2 estão parcialmente encobertos pelo manto, 2 entre os olhos em posição mediana. Ventralmente 2, os quais estão parcialmente encobertos pelo funil. **Olhos:** Dorsalmente 4, 3 dispostos ao longo da margem superior dos olhos na membrana epitelial e sob a base do 1° e 2° pares de braços, 1 na margem lateral. Ventralmente, sem modificações. **Funil:** 4, os 2 posteriores estão parcialmente encobertos pela borda do manto. **Manto:** sem modificações.

Paralarvas com 10 dias de idade (Dia 10)

1,62 mm CM (Fig. 4D, 4E e 4F) e (Fig. 5C e 5D): Manto: sem modificações aparentes. **Cabeça:** com largura média de 1,06 mm e representando 2/3 do CM. **Funil:** Com comprimento médio de 0,94 mm, equivalente a 3/5 do CM. **Cromatóforos: Braços:** sem modificações. **Cabeça:** Dorsalmente 10, 6 estão encobertos pela borda do manto, 2 entre os olhos em posição mediana, 2 na base do 1° par de braços. Ventralmente 2. **Olhos:** sem modificações. **Funil:** 5, 3 adjacentes ao seu orifício, 2 posteriormente e parcialmente encobertos pela borda do manto. **Manto:** Dorsalmente 7, aparecendo portanto mais um

cromatóforo extrategumentar. Ventralmente 23, 4 próximos a margem do manto e o restante distribuído aleatoriamente.

Paralarvas com 13 dias de idade (Dia 13)

1,70 mm CM: Manto e Cabeça: sem modificações morfológicas aparentes. **Funil:** Com comprimento médio de 1 mm. **Cromatóforos: Braços:** sem modificações. **Cabeça:** Dorsalmente 10, 4 estão encobertos pela borda do manto, 2 estão dispostos horizontalmente e adjacente à base dos olhos, 4 entre os olhos em posição mediana e 2 adjacentes a base do 1º par de braços. Ventralmente 4, aparecendo portanto mais 2 na base do 4º par de braços. **Olhos:** sem modificações. **Funil:** 5, sem modificações em relação às paralarvas de 10 dias de idade. **Manto:** Dorsalmente 7, 4 dispostos anteriormente e adjacentes à borda do manto e 3 dispostos horizontalmente na região posterior. Sob o manto e acima da glândula digestiva, estão localizados 6 cromatóforos extrategumentais. Ventralmente 26, 4 próximos a margem do manto e o restante distribuído aleatoriamente.

Paralarvas com 17 dias de idade (Dia 17)

2 mm CM (Fig. 4G, 4H e 4I) e (Fig. 5E e 5F): Manto, Funil e Cabeça: sem modificações marcantes. **Cromatóforos: Braços:** sem modificações. **Cabeça:** Dorsalmente 10, 4 estão encobertos pela borda do manto, 2 parcialmente encobertos pela borda do manto, 2 entre os olhos em posição mediana, 2 na base do dos olhos. Ventralmente, sem modificações. **Olhos:** sem modificações. **Funil:** 5, 2 próximos à sua abertura, 2 posteriormente e parcialmente encobertos pela borda do manto, 1 em posição lateral e mediana. **Manto:** Dorsalmente 7, 4 dispostos anteriormente e adjacentes à borda do manto, 2 dispostos horizontalmente próximos à região posterior da glândula digestiva, 1 na região posterior. Sob o manto e acima da glândula digestiva, estão localizados 7 cromatóforos extrategumentais. Ventralmente, sem modificações.

3.2 Principais diferenças no padrão de cromatóforos de paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil e da Galícia

As principais diferenças observadas no padrão de cromatóforos foram as seguintes (Fig. 5 e 6) e (Tabela 2 e 3):

Braços: O número de cromatóforos dos braços das paralarvas da costa sul do Brasil praticamente não sofreu alterações (3-5), porém nas da Galícia houve um notável acréscimo (3-9); **Cabeça:** Dorsalmente, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram menor ou igual número de cromatóforos na região dorsal da cabeça (8-11), quando comparadas as da Galícia (8), porém o padrão de distribuição dos mesmos foi bem diferenciado; Ventralmente, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram de 2-4 cromatóforos e as da Galícia de 6-8. **Olhos:** Dorsalmente, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram 1 a 4 cromatóforos, enquanto as da Galícia de 1 a 2. Ventralmente, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram 1 a 2 cromatóforos, porém as da Galícia apenas 1. **Manto:** Dorsalmente, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram 6 a 8 cromatóforos extrategumentais, enquanto as da Galícia de 6 a 20. Ventralmente, o número de cromatóforos das paralarvas da costa sul do Brasil (20-28) foi maior quando comparado ao de paralarvas da Galícia (15-20) desde o momento da eclosão (Dia 0). **Funil:** as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram 4 a 6 cromatóforos distribuídos em 3 diferentes padrões, enquanto as da Galícia apenas apresentaram apenas 4 cromatóforos, e um único padrão de distribuição.

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram diferenças consideráveis entre o padrão de cromatóforos de paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil e da Galícia (Vigo-Espanha), as quais foram mantidas em temperaturas semelhantes ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram ao eclodir igual ou maior número de cromatóforos em todas as regiões do corpo, quando comparadas as da Galícia, exceto na região ventral da cabeça. Entretanto, a coloração dos cromatóforos não diferiu entre as paralarvas dos dois hemisférios. As diferenças observadas no número e padrão de cromatóforos das paralarvas de ambas as localidades poderiam estar relacionadas ao

método de preservação das paralarvas da costa sul do Brasil. Entretanto, visto que em um período de 1 ano foram realizadas 2 observações e não houve mudanças, pode-se descartar esta hipótese.

Segundo Hoechberg *et al.* (1992), paralarvas recém eclodidas de *Octopus vulgaris* provenientes do Mediterrâneo e, com CM entre 1,5 mm e 2 mm, apresentam na eclosão 3 ventosas e 2 cromatóforos em cada braço. As paralarvas do presente estudo de ambas as localidades e CM similares apresentaram na eclosão o mesmo número de ventosas nos braços, porém o número de cromatóforos variou de 3 a 4. Entretanto, foi observado que as paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia com 10 dias de idade apresentaram o mesmo número de cromatóforos nos braços, porém o aumento do número de ventosas ocorreu somente para as galegas, as quais variaram de 3 a 6. Cabe salientar, que as paralarvas do Mediterrâneo com a mesma idade e similar CM (2,4 mm) apresentaram o mesmo número de ventosas, quando comparadas às galegas (Hoechberg *et al.* 1992).

No presente estudo foi observado que paralarvas recém eclodidas da costa sul do Brasil e as provenientes da Galícia apresentaram número de cromatóforos semelhantes na região dorsal da cabeça. Contudo, enquanto o número de cromatóforos nesta região permaneceu praticamente constante em paralarvas da costa sul do Brasil, nas galegas houve um pequeno acréscimo. As paralarvas provenientes da Galícia e observadas no presente estudo apresentaram desde a eclosão um maior número de cromatóforos na região ventral da cabeça, quando comparadas às da costa sul do Brasil. Em paralarvas de *Octopus vulgaris* do Mediterrâneo descritas por Hoechberg *et al.* (1992) e com CM entre 1,5 mm e 6 mm foi observado número de cromatóforos similar às das costa sul do Brasil em ambas às regiões da cabeça. Por outro lado, o número de cromatóforos na região ventral do manto de paralarvas da Galícia foi semelhante ao observado por Hoechberg *et al.* (1992) para paralarvas do Mediterrâneo com CM de 1,5 a 2,4 mm. É interessante observar que as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram desde a eclosão um número consideravelmente maior de cromatóforos na região ventral do manto em relação às paralarvas galegas, representando a maior diferença observada entre as paralarvas das duas localidades. Além disso, as paralarvas recém eclodidas da costa sul do Brasil com CM médio de 1,5 mm apresentaram número semelhante de cromatóforos às do Mediterrâneo

com CM de 6 mm (Hoechberg *et al.* 1992). De acordo com Villanueva *et al.* (1996, 2002) o maior número de cromatóforos observado na região ventral do manto de paralarvas de *O. vulgaris* se deve provavelmente à posição ocupada pelas mesmas na coluna d'água durante a fase planctônica, pois a função sugerida para os cromatóforos desta região do corpo seria cobrir o trato digestivo das paralarvas, dificultando assim sua visualização por predadores.

De acordo com Fiorini (1965) paralarvas de *O. vulgaris* do Mediterrâneo apresentam na eclosão até 8 cromatóforos tegumentares na região dorsal do manto. Entretanto, segundo Packard (1985) as mesmas apresentam na eclosão 6 a 8 cromatóforos sob o tegumento e acima da glândula digestiva, denominados viscerais. No presente estudo, as paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia apresentaram até os 10 dias de idade, número bastante similar destes cromatóforos em ambas às regiões do corpo. Similarmente ao presente estudo, paralarvas com 10 dias de idade e 2,4 mm de CM do mediterrâneo, apresentaram de 6 a 7 cromatóforos viscerais acima da glândula digestiva (Hoechberg *et al.* 1992). No entanto, enquanto as paralarvas da costa sul do Brasil com 17 dias de idade e 2 mm de CM apresentaram o mesmo número observado aos 10 dias de idade, as da Galícia com 2,9 mm de CM apresentaram um acréscimo de até 13 cromatóforos. Segundo Packard (1985), ocorre um rápido aumento no número de cromatóforos tegumentares e viscerais na região dorsal do manto das paralarvas, durante a transição do modo de vida planctônico para o bentônico. Entretanto, as paralarvas provenientes da Galícia e observadas no presente estudo provavelmente ainda não se encontravam em pré-assentamento.

Os resultados do presente estudo indicam a existência de muitas diferenças no número e padrão de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia. Diferenças no número de cromatóforos poderiam estar relacionadas à latitude térmica, pois paralarvas que eclodem em maiores latitudes podem apresentar maior tamanho de eclosão, e, portanto, um maior número de cromatóforos. No entanto, foi observado no presente estudo que embora as paralarvas da Galícia tenham apresentado maior CM, apresentam menor número de cromatóforos em determinadas regiões do corpo, quando comparadas às da costa sul do Brasil com menor CM, portanto, esta não parece ser a causa das diferenças observadas no número de cromatóforos destas paralarvas.

Segundo Berry (1912) o padrão de cromatóforos pode ser usado na identificação visual de espécies, pois os mesmos são caracteres específicos. No presente estudo, foram observadas importantes diferenças entre o padrão de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil e as provenientes do leste do Atlântico (Galícia). De acordo com Mangold (1998) a distribuição de *O. vulgaris* se restringe ao Mediterrâneo e leste do Atlântico, e por isso as paralarvas da costa sul do Brasil do presente estudo são aqui denominadas como espécimes *O. vulgaris*. Entretanto, Warnke *et al.* (2000) relataram semelhanças na seqüência de bandas de DNA entre polvos do Mediterrâneo e espécimes *O. vulgaris* do sul do Brasil, sugerindo que a restrição de distribuição de *O. vulgaris* descrita por Mangold (1998) é equivocada. A tentativa de correlacionar dados de distância genética e geográfica através de seqüências de DNA baseadas em genes mtCOIII por Sollër *et al.* (2000) falhou, pois foi observada pouca distância genética entre *O. vulgaris* do Mediterrâneo e espécimes *O. vulgaris* do sul do Brasil, corroborando com os resultados obtidos por Warnke *et al.* (2000). Entretanto, surpreendentemente, uma grande distância genética foi observada entre espécimes de *O. vulgaris* do sul e norte do Brasil. Contudo, para avaliar o quanto estas diferenças observadas no padrão de cromatóforos possam estar ligadas a uma complexidade de espécies seria ainda necessário o suporte de genética molecular.

LITERATURA CITADA

- BERRY. 1912. A review of the cephalopods of western North America. *Bulletin of the Bureau of Fishies.*, 30: 269-336.
- FERGUSON, GP & JB MESSENGER. 1991. A countershading reflex in cephalopods. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 243: 63-67.
- FIORINI, P. 1965. The embryonic development of pattern of some Mediterranean cephalopod species. *Vie et Milieu.*, Vol.16 (2): 656-756.
- HAIMOVICI, M, JAA PEREZ & RA DOS SANTOS. 1994. Class Cephalopoda Cuvier, 1798. SEASHELLS OF BRAZIL. E. C. Rios. Segunda edição. Editora da FURG, Rio Grande, Brasil. p. 311-320.
- HOCHBERG, FG, M NIXON, RB TOLL & RE YOUNG. 1992. Order Octopoda Leach,1818. In MJ Sweeney *et al.* (eds.), Larval and juvenile cephalopods: a manual for their identification. Smithsonian Contributions to Zoology., 213-268.
- MANGOLD, K. 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, vol. I., pp 335-365.
- MANGOLD, K. 1998. The Octopodinae from the Eastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. In: NA Voss *et al.* (eds.), Systematics and Biogeography of cephalopods. Smithsonian Contributions to Zoology, vol. II., 586: 521-528.
- MESSENGER, JB. 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol. Rev.*, 76: 473-528.
- OESTMANN, DJ, JM SCIMECA, JW FORSYTHE, RT HANLON & PG LEE. 1997. Special Considerations for Keeping Cephalopods in Laboratory Facilities. *Amerian Association for Laboratory Animal Science.*, 36: 89-93.
- PACKARD, A. 1985. Size and distribution of chromatophores during post-embryonic development in cephalopods. *Vie et Milieu.*, 35(3/4): 285-298.
- ROCHA, F, A GUERRA, R PREGO & U PIATKOWSKI. 1999. Cephalopod paralarvae and upwelling conditions off Galician waters (NW Spain). *Journal of Plankton Research.*, vol. 21 (1): 21-33.
- SÖLER, R, K WARNKE, U SAINT-PAUL & D BLOHM. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda: Octopodidae). *Marine Biology.*, 136: 29-35.

- SWEENEY, MJ, CFE ROPER, KM MANGOLD, MR CLARKE & SV BOLETZKY. 1992. "Larval" and juvenile cephalopods: manual for this identification. *Smithsonian contributions to zoology.*, 513: 213-279.
- WARNKE, K. 1999. Observations on the Embryonic Development of *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda) from Northern Chile. *The Veliger.*, 42(3): 211-217.
- WARNKE, K, R SÖLER, D BLOHM & U SAINT-PAUL. 2000. Rapid differentiation between *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) and *Octopus mimus* Gould (1852), using randomly amplified polymorphic DNA. *J. Zool. Syst. Evol. Research.*, 38: 119-122.
- VILLANUEVA, R & C NOZAIS. 1996. Swimming behaviour and food searching in planktonic *Octopus vulgaris* Cuvier from hatching to settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*, 208: 169-184
- VILLANUEVA, RN, N KOUETA & E BOUCAUD-CAMOU. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture.*, 205: 269-286.
- YOUNG, RE, RF HARMAN & FG HOCHBERG. 1989. Octopodid Paralarvae from Hawaiian Waters. *The Veliger.*, 32(2):152-165.

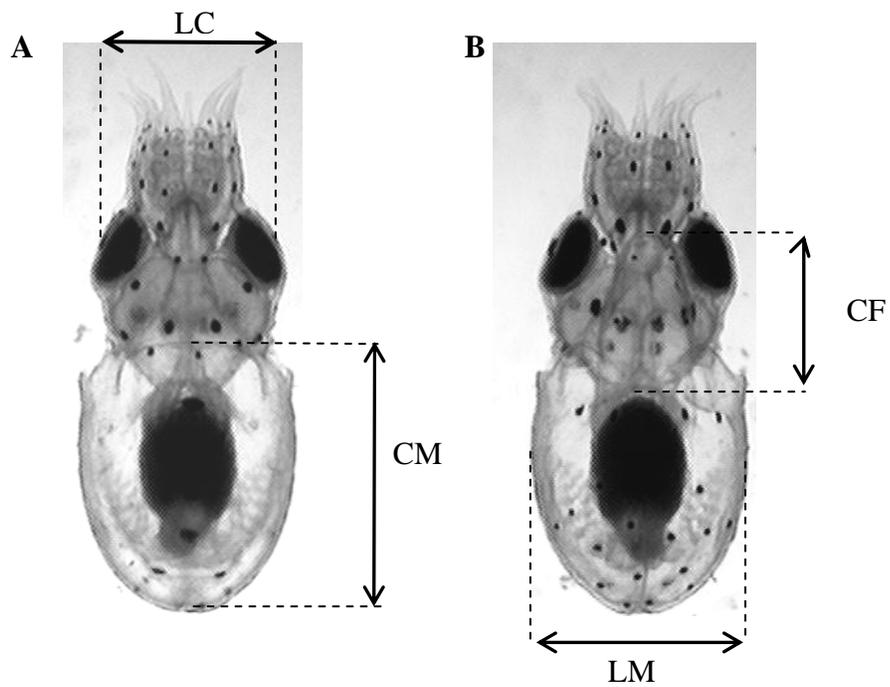


Figura 1: Medidas de estruturas morfológicas obtidas em paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil. A) Paralarva com 6 dias de idade em vista dorsal; B) Paralarva com 6 dias de idade em vista ventral. CF, comprimento do funil; CM, comprimento do manto; LC, largura da cabeça; LM, largura do manto.

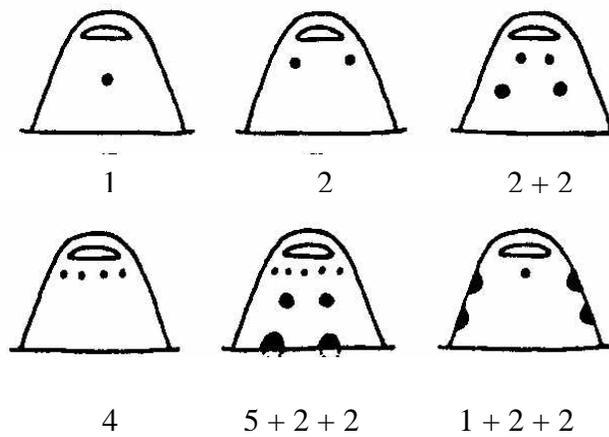


Figura 2: Exemplos de diferentes padrões de cromatóforos observados na região do funil de paralarvas de *Octopus* spp. (extraído de Hoechberg *et al.* 1992).

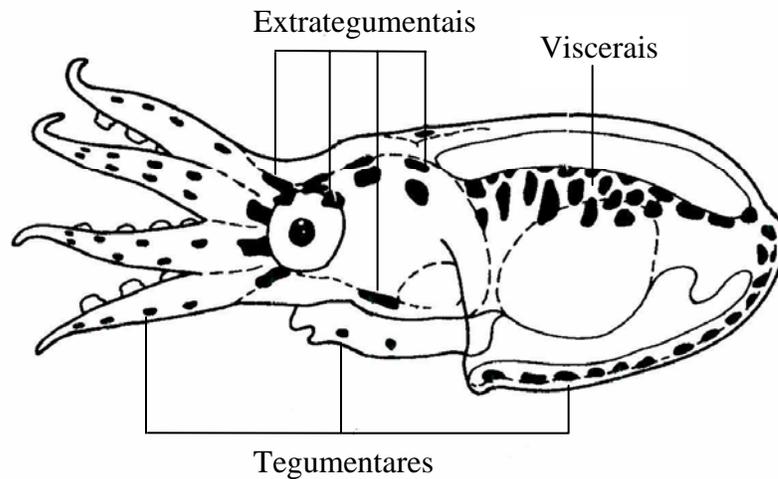


Figura 3: Vista lateral de uma paralarva de *Octopus* spp. ilustrando a localização dos cromatóforos e sua respectiva denominação (extraído de Young *et al.* 1989).

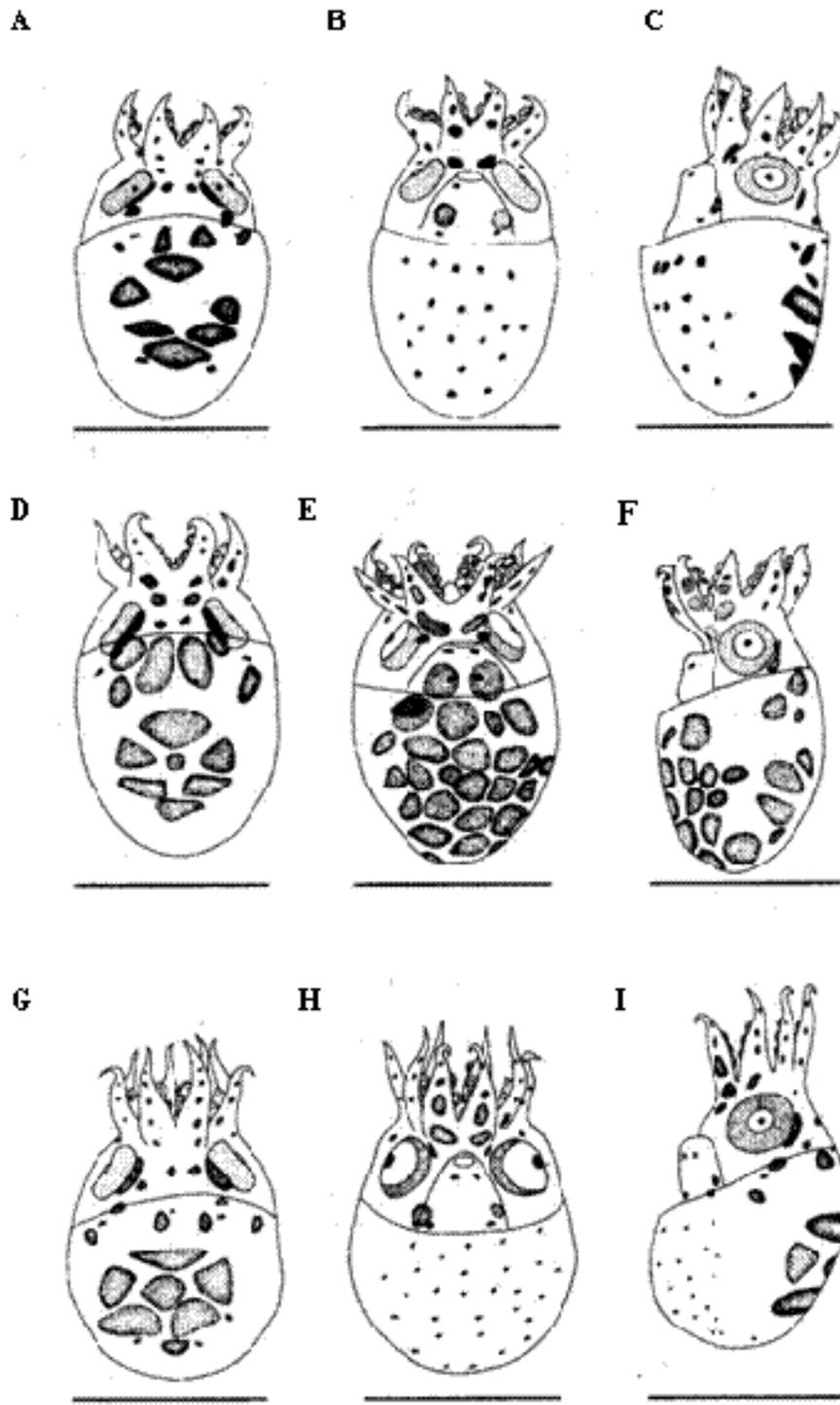


Figura 4: Padrão de cromatóforos de paralarvas de *Octopus vulgaris* em vista dorsal, ventral e lateral, respectivamente. **A, B e C)** Paralarva recém eclodida; **D, E e F)** Paralarva com 10 dias de idade; **G, H e I)** Paralarva com 17 dias de idade. Escala: 1mm.

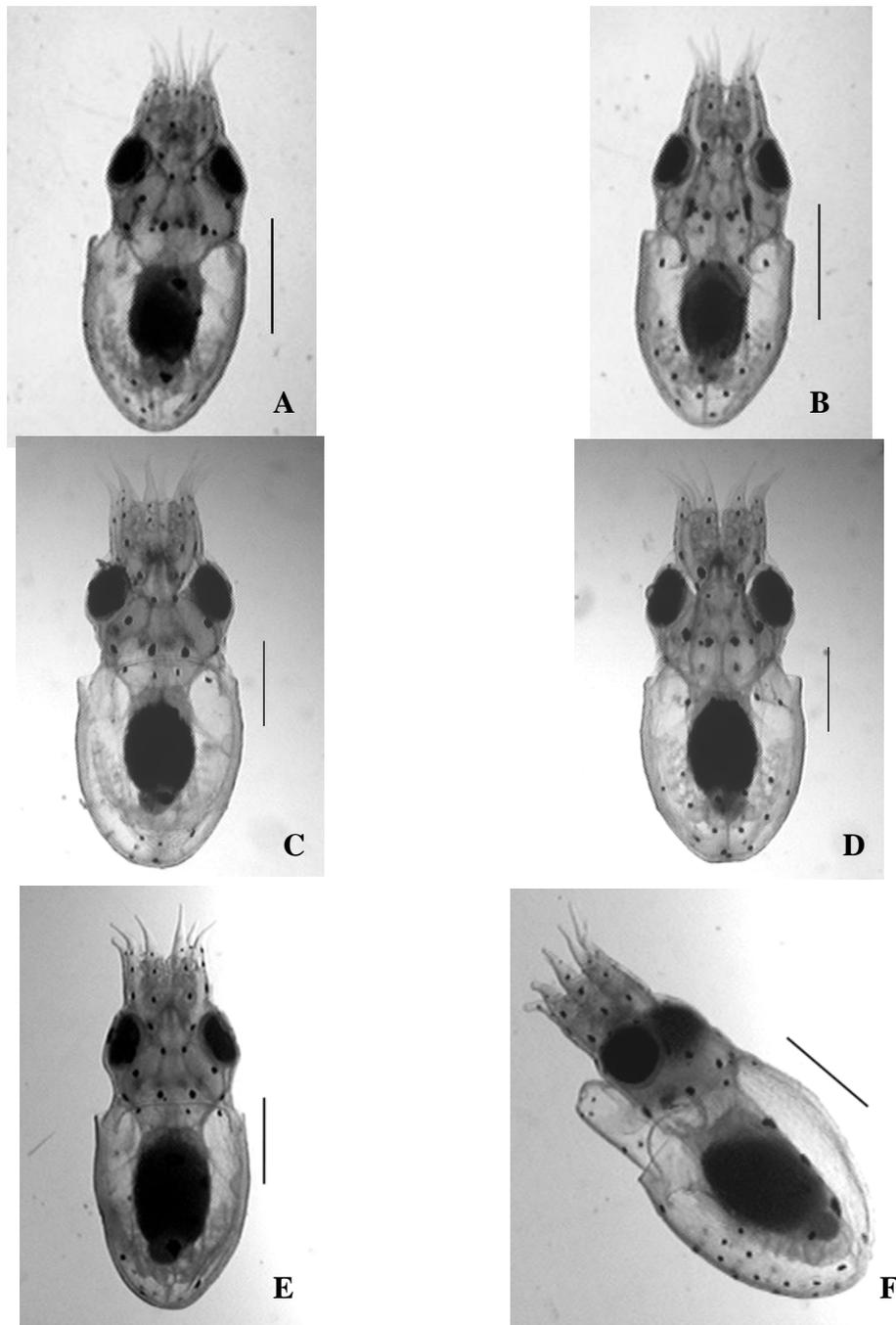


Figura 5: Paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil. **A e B)** Paralarva recém eclodida em vista dorsal e ventral respectivamente; **C e D)** Paralarva com 10 dias de idade em vista dorsal e ventral respectivamente; **E e F)** Paralarva com 17 dias de idade em vista dorsal e lateral respectivamente. Escala: 1mm.

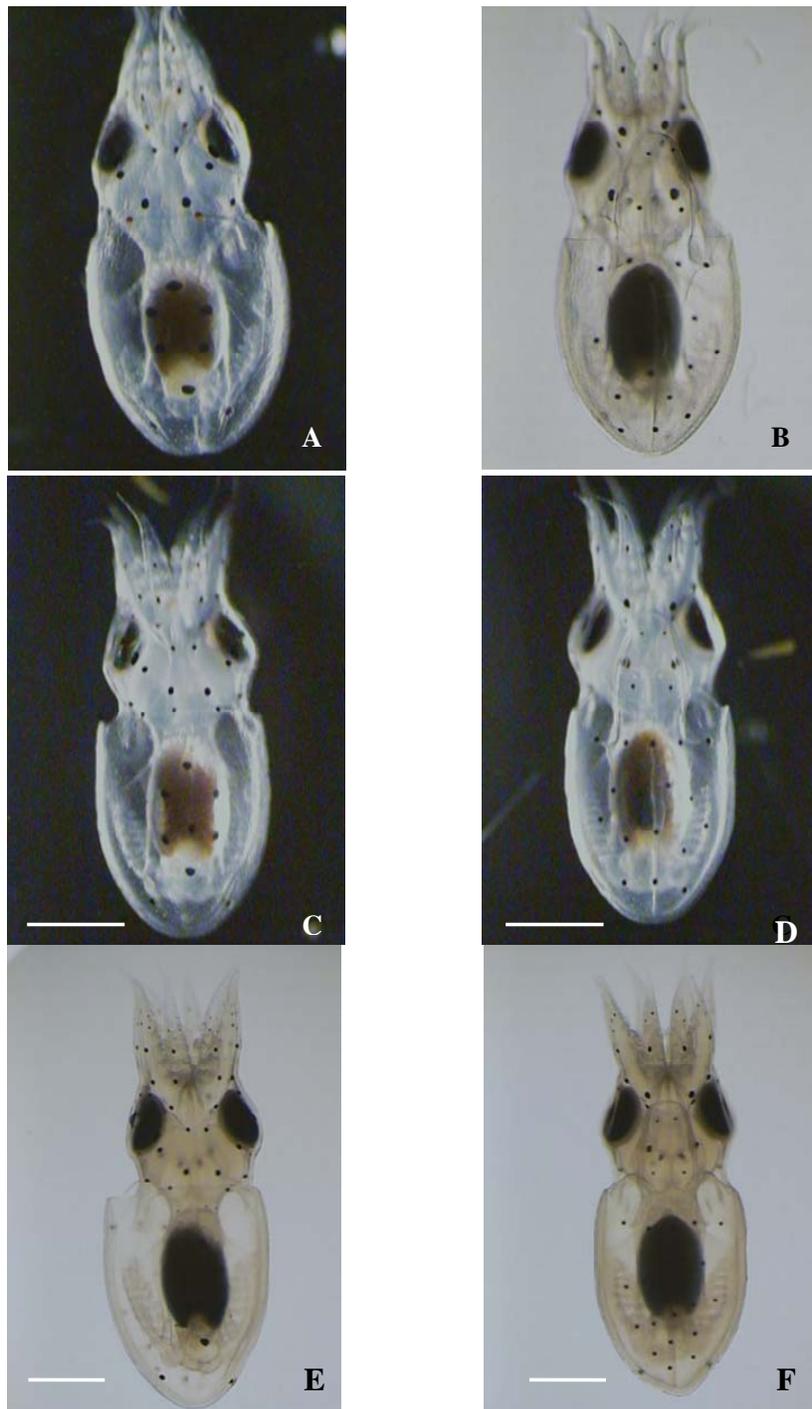


Figura 6: Paralarvas de *Octopus vulgaris* da Galicia (Espanha, Vigo) em vista dorsal e ventral, respectivamente. **A e B)** Paralarva recém eclodida; **C e D)** Paralarva com 10 dias de idade; **E e F)** Paralarva com 17 dias de idade. Escala 1 mm.

Tabela 1. Número, padrão de distribuição e coloração de cromatóforos contraídos em paralarvas de *Octopus vulgaris* da costa sul do Brasil cultivadas a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e salinidade 33. D, região dorsal; V, região ventral; P, preto; Vv, vermelho.

I (dias)	ML ^a	Funil			Manto					Cabeça				Braços				Olhos		
		n ^o	Padrão	cor	D	cor	Padrão	V	cor	D	Padrão	V	Cor	D	Cor	V	Cor	D	V	Cor
0	1,5	4-5	2+2 ou 2+1+2	P	6-8 (6-8*)	Vv e P (*)	3+2+1; 4+2+2; 5+2+2	20-28	P	8-11 *	4+2+4; 2+2+4; 2+4+3+4; 2+2+2+4; 2+2+3+4; 2+2+2+4	2 *	P	2-4 (1*)	Vv	2-4 (1*)	P	2-4	2	Vv e P
6	1,62	4-6	2+2 ou 2+1+2	P	2-8 (6*)	Vv e P (*)	2; 3+2+1; 4+2+2; 4+2+1; 3+2+2; 3+1+2; 4+1+2	20-28	P	7-9 *	2+2+4; 2+3+4; 1+2+4	2 *	P	3-4 (1*)	Vv	3-4 (1*)	P	2-4	1-2	Vv e P
10	1,62	4-5	2+2 ou 2+1+2; 3+2	P	3-7 (6-7*)	Vv e P (*)	3; 4; 4+1; 3+2; 4+2; 3+1+2; 4+1+2; 5+2	23-27	P	8-10 *	2+2+4; 4+2+4	2*	P	2-4 (1*)	Vv	3-4 (1*)	P	1-4	1-2	Vv e P
13	1,7	4-5	2+2 ou 3+2	P	2-8 (6*)	Vv e P (*)	2; 5+2; 4+3; 4+2+2	24-29	P	8-10 *	2+2+4; 2+2+2+4	2-4 *	P	3-4 (1*)	Vv	3-4 (1*)	P	2-4	1-2	Vv e P
17	> 2	4-5	2+2 ou 2+1+2	P	5-7 (6-7*)	Vv e P (*)	2+2+1; 3+1+2; 4+2+1	26-27	P	8-10 *	2+4+2+4; 2+2+2+4	2-4 *	P	3-4 (1*)	Vv	3-4 (1*)	P	3-4	1-2	Vv e P

^a média do comprimento dorsal do manto em mm.

* Cromatóforos extrategumentais ou viscerais.

Cada linha representa diferentes padrões de distribuição de cromatóforos.

Tabela 2. Número, padrão de distribuição e coloração de cromatóforos contraídos em paralarvas de *Octopus vulgaris* da Galícia cultivadas a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. D, região dorsal; V, região ventral; P, preto; Vv, vermelho.

I (dias)	ML ^a	Funil			Manto					Cabeça			
		n°	Padrão	cor	D	cor	Padrão	V	cor	D	Padrão	V	Cor
0	1,72	4	2+2	P	2-3 (6-7*)	Vv	2; 3.	17-19	P	8	2+2+2+2	2-4*	P
6	1,88	4	2+2	P	2-3 (6-7*)	Vv	2; 3	16-18	P	8	2+2+2+2	4*	P
10	2,48	4	2+2	P	2-3 (6-7*)	Vv	2; 3	17-20	P	8-10	2+2+2+2; 2+2+2+2+2	4*	P
17	2,90	4	2+2	P	2-3 (10-20*)	Vv	2; 3	15-19	P	9-12	2+2+2+1+2+2; 2+2+2+2+2; 2+2+1+2+2	4*	P

^a média do comprimento dorsal do manto em mm.

* Cromatóforos extrategumentais ou viscerais.

Tabela 3. Principais diferenças entre o número de cromatóforos de paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia. B, Brasil; D, região dorsal; V, região ventral; E, Espanha; I, idade em dias; ML, comprimento dorsal do manto em mm; Vv, número de ventosas.

I	n	ML (mm)		Vv		Braços				Cabeça				Olhos				Manto				Funil		
		B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E	
0	29	5	1,49	1,72	3	3	3-4	3	3-4	3	8-11	8	2	6-8	2-4	1-2	1-2	1	6-8 (6-8*)	2-3 (6-7*)	20-28	17-19	4-5	4
6	28	3	1,62	1,88	3	3	3-4	3	3-4	3-4	7-9	8	2	8	2-4	1	1-2	1	2-8 (6*)	2-3 (6-7*)	20-28	18	4-6	4
10	26	6	1,62	2,48	3	3-6	3-4	3-4	3-4	3-4	8-10	8-10	2	6-8	1-4	1	1-2	1	3-7 (6-7*)	2-3 (6-7*)	23-27	17-20	4-5	4
17	3	5	>2	2,90	3	6-9	3-5	6-9	3-4	4-7	8-10	9-12	2-4	8	3-4	1	1-2	1	5-7 (6-7*)	2-3 (10-20*)	26-27	15-19	4-5	4

* Cromatóforos viscerais

CAPÍTULO III

Influência da configuração interna e hidrodinâmica de tanques de cultivo na ocorrência de lesões em braços de paralarvas do polvo comum

RESUMO

Com o objetivo de reduzir lesões observadas nos braços de paralarvas do polvo comum, 3 configurações internas de tanques de cultivo e hidrodinâmica foram testadas. Análises histológicas de braços normais e lesionados das paralarvas foram realizadas para caracterizar e identificar a causa destas lesões. Para tal, paralarvas com braços normais e com idades de 0 e 24 dias (d), e lesionados de 15, 20, 24, 30 e 50 d foram fixadas em formol 4 %. Posteriormente, estas foram submetidas ao tratamento histológico de rotina e efetuados cortes longitudinais de 7 μ m. Aquelas com braços lesionados e idades de 15, 24 e 50 d foram coradas com as técnicas Gram, Macchiavello e Azul-de-Metileno, para detecção de bactérias em tecidos, enquanto as restantes apenas com Hematoxilina-Eosina. O epitélio de braços normais apresentou células do tipo: mucípara, granular, germinativa e órgão de Kölliker (OK). Paralarvas mantidas em tanques com corrente circular (20, 24 e 30d) apresentaram perda de ventosas e diminuição ou ausência dos OK. As paralarvas com idade de 15 d mantidas em tanques com corrente ascendente apresentaram uma estrutura nodular que indicou o início do processo abrasivo. Paralarvas de 24 d mantidas em tanques com correntes convergentes verticais não apresentaram danos epiteliais, representando a melhor hidrodinâmica testada. Os resultados indicam que as lesões são físicas, e que podem ser reduzidas através da remodelagem da configuração interna dos tanques e hidrodinâmica. Portanto, isto evidencia que a hidrodinâmica dos tanques é uma das causas de mortalidade das paralarvas durante o cultivo, a qual ainda não havia sido observada anteriormente. Assim, o contato das paralarvas com as paredes deve ser evitado sempre que possível.

ABSTRACT

To reduce the lesions observed in the arms of the common octopus paralarvae, 3 internal hydrodynamic designs of cultivation tanks were tested. Histological analyses of normal and damaged arms were accomplished to characterize and identify the cause of these lesions. In this way, paralarvae with normal arms with ages of 0 and 24 days (d), and damaged arms of 15, 20, 24, 30 and 50 d were fixed in formalin 4%. Then, they were submitted to the histological treatment and made longitudinal cuts of 7 μ m. Those with damaged arms and ages of 15, 24 and 50 d were red-faced with the following techniques: Gram, Macchiavelo and Methilen's Blue, for detection of bacteria in the tissue. While the remaining just with Hematoxilin-Eosin. The epithelium of normal arms presented cells of the type: muciphora, granulate, germinative and Köllikers organ (OK). Paralarvae maintained in tanks with circular current (20, 24 and 30d) presented loss of suckers and decrease or absence of OK. The paralarvae with age of 15 d maintained in tanks with ascending current presented a structure nodular that indicated the beginning of an abrasive process. Paralarvae of 24 d maintained in tanks with vertical convergent currents they didn't present epithelial damages, representing the best hydrodynamic tested. These results indicate that the lesions are physical, and can be reduced by the remodel of the tanks hydrodynamic configuration. Therefore, the tank hydrodynamic is one of the causes of mortality in the paralarvae rearing, which was not observed previously. Then, the contact of the paralarvae with the tank walls should be always avoided.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos grande atenção tem sido destinada à engenharia de tanques para a aquíicultura, na tentativa de entender o impacto do modelo dos tanques sobre o comportamento e performance de peixes (Burley & Klapsis 1985, Losordo *et al.* 2000, Rasmussen & McLean 2004, Timmons *et al.* 1998). A hidrodinâmica no interior dos tanques representa um elemento crítico no processo de engenharia, visto que pode influenciar na qualidade da água, distribuição do alimento, sedimentação e remoção de resíduos sólidos, e na ocorrência de zonas mortas ou de baixa circulação, entre outros (Rasmussen & McLean 2004). Com efeito, outros estudos têm demonstrado que o crescimento de juvenis da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* é afetado pelo modelo do tanque de cultivo, pois o mesmo exerce influência sobre o comportamento e metabolismo destes peixes (Ross *et al.* 1995). Ainda, tanto o modelo dos tanques quanto à densidade de estocagem contribuíram para a distribuição inadequada de juvenis da truta *Salvelinus namaycush* na coluna d'água, intensificando o contato destes peixes com as paredes (Ross & Watenn 1998).

Durante as últimas décadas o interesse no cultivo de cefalópodes tem crescido, devido em grande parte à demanda dos mercados consumidores e ao elevado preço de mercado (Vaz-Pirez *et al.* 2004). Muitas tentativas de cultivo de paralarvas de polvos e lulas têm sido mal sucedidas devido à mortalidades elevadas, principalmente nas duas primeiras semanas após a eclosão (Hanlon 1987, Hanlon *et al.* 1987, Hanlon *et al.* 1989, Villanueva *et al.* 2002, Iglesias *et al.* 2000), causadas por inanição e modelo inadequado dos tanques de cultivo (Boletzky & Hanlon 1983, Vidal *et al.* 2002). Através do aprimoramento do modelo de tanques foi possível reduzir em até 35% a mortalidade de paralarvas da lula *Loligo opalescens* nos dois primeiros meses mais críticos do ciclo de vida (Vidal *et al.* 2002). Uma das principais modificações empregadas foi à redução de 80% do volume dos tanques, resultando em menor quantidade de alimento necessária para manutenção das altas densidades de presas e suprimento das elevadas taxas metabólicas das paralarvas (Vidal *et al.* 2002). A entrada de água nestes tanques foi realizada através de um cano perfurado e suspenso 2 cm acima do nível da água, gerando uma corrente circular de baixa velocidade ($\pm 1 \text{ cm s}^{-1}$) que auxiliou na distribuição homogênea das paralarvas e suas presas (Vidal *et al.* 2002).

Devido à semelhanças morfológicas e comportamentais entre as paralarvas do polvo comum com as de lulas *Loligo*, a mesma hidrodinâmica utilizada por Vidal *et al.* (2002) foi aplicada para o cultivo, porém em tanques com volume de 96 L. No entanto, as paralarvas de polvo possuem maior capacidade de natação que as de lula e a hidrodinâmica gerada não foi suficiente para distribuir as mesmas de forma homogênea, levando-as a se concentrar principalmente junto às laterais e ao fundo dos tanques (referência). Além disso, foram observadas lesões nos braços das paralarvas causadas provavelmente pelo contato excessivo com as paredes do tanque.

Neste contexto, entre os fatores mais críticos para o sucesso da larvicultura de polvos se encontra o modelo, e principalmente a hidrodinâmica dos tanques de cultivo. As lesões observadas possivelmente aumentam as taxas de mortalidade, pois interferem na eficiência com que as paralarvas capturam suas presas, o que ocorre com a utilização dos braços e suas ventosas. Segundo Forsythe *et al.* (1988) lesões teciduais no manto e nadadeiras de sépias e lulas adultas causadas por colisões com as paredes dos tanques de cultivo são comumente observadas. Porém, em polvos adultos mantidos em tanques com alta densidade a maior causa de lesões se deve ao contato entre os indivíduos, ou ainda durante a captura de alimento (Forsythe *et al.* 1987). Estudos têm demonstrado que muitas espécies de cefalópodes são susceptíveis a infecções bacterianas secundárias em tecidos lesionados (Hulet *et al.* 1979, Forsythe *et al.* 1987, Oestmann *et al.* 1997).

Estudos histológicos podem ser utilizados como ferramentas eficazes na identificação e caracterização de lesões, pois auxiliam na descrição dos diferentes tipos celulares que compõem os tecidos. No entanto, para identificar alterações teciduais é necessário caracterizar previamente a estrutura do tecido que se desenvolve normalmente. Com base no que foi exposto, este trabalho teve como objetivos:

- 1) Caracterizar os tecidos de braços normais de paralarvas de *O. vulgaris* recém-eclodidas e com 24 dias de idade;
- 2) Caracterizar as principais alterações teciduais nos braços lesionados de paralarvas de *O. vulgaris* com idades de 15, 20, 24, 30 e 50 dias;
- 3) Verificar se paralarvas com idades de 15, 24 e 50 dias apresentam agentes etiológicos associados aos seus tecidos lesionados;
- 4) Avaliar a influência da configuração interna e hidrodinâmica dos tanques de cultivo na ocorrência de lesões nos braços de paralarvas do polvo comum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Configurações internas e hidrodinâmica dos tanques

Para o cultivo de paralarvas do polvo comum *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Cephalopoda: Octopodidae) foi utilizado um sistema de recirculação de água fechado, formado por seis tanques circulares (0,60 m de diâmetro e 0,50 m de altura, $V = 96$ L) conectados a um filtro biológico e ultravioleta, totalizando este sistema 1,100 L (Fig. 1). Os diferentes tipos configurações internas e hidrodinâmica dos tanques serão descritos brevemente, e estão indicados como Tanque de hidrodinâmica I, e assim sucessivamente.

2.1.1 Tanque de hidrodinâmica I- corrente circular

Neste sistema, a entrada de água no tanque foi realizada através de um tubo de PVC de 25 mm de diâmetro, perfurado em toda sua extensão (metade do diâmetro do tanque) e suspenso a 2 cm do nível da água (Fig. 2). A entrada de água por este cano perfurado em ângulo de 45° gera uma corrente circular de baixa velocidade (± 1 cm s^{-1}) em sentido anti-horário, promovendo a distribuição homogênea das paralarvas e de suas presas e evitando a ocorrência de “zonas mortas”. Dentro de cada tanque havia uma estrutura de PVC (125 mm) suspensa a 7 cm do fundo, na qual foram feitas quatro janelas revestidas com uma malha de 150 μ m para evitar a saída de alimento e das paralarvas.

2.1.2 Tanque de hidrodinâmica II- corrente ascendente

Neste sistema a entrada de água foi feita através de uma mangueira conectada ao tubo central dos tanques (Fig. 3). Esta mangueira conduzia a água até uma câmara isolada e perfurada na sua parte inferior. A água era então liberada em direção ao fundo dos tanques em ângulos de 45° , formando um fluxo de água em espiral ascendente, o qual favorecia a distribuição das paralarvas e presas em toda a coluna d'água.

2.1.3 Tanque de hidrodinâmica III- correntes convergentes verticais

Nestes tanques a entrada de água foi realizada por meio de um tubo PVC de 25 mm perfurado com saída de água paralelo à parede (Fig. 4). Este tubo distribuía a água através de 2 tubulações circulares, uma colada no fundo do tanque e a outra a 15 cm da

superfície. A tubulação circular no fundo do tanque foi perfurada em sua parte superior e lateral, formando então uma corrente ascendente junto à parede e outra em direção ao centro do tanque. Por sua vez, a tubulação próxima à superfície foi perfurada em sua parte superior e inferior, gerando então uma corrente ascendente e a outra em direção ao fundo do tanque. Assim, a convergência causada pelos dois fluxos, um proveniente da tubulação do fundo e o outro da superfície, gerou um fluxo paralelo à superfície convergente das paredes e do fundo, causando um turbilhonamento suave, mantendo o meio de cultivo bem homogeneizado, e principalmente reduzindo o contato das paralarvas com as paredes.

2.2 Coleta de paralarvas e procedimento histológico

Paralarvas do polvo comum com braços normais e lesionados foram coletadas durante a larvicultura para processamento histológico (Tabela 1 e Tabela 2). Após a coleta, as mesmas foram fixadas em formol 4%, sendo posteriormente submetidas ao tratamento histológico de rotina para a caracterização dos tecidos, de acordo com Junqueira & Carneiro (1995) (Tabela 3). Cortes histológicos seriados de 7µm foram efetuados longitudinalmente nas peças histológicas com o auxílio de um micrótomo rotativo American Optical. Os cortes histológicos das paralarvas foram corados pela técnica de rotina Hematoxilina-Eosina (HE) ou de detecção de agentes etiológicos em tecidos, tais como, Azul-de-Metileno, Gram e Macchiavello, de acordo com Junqueira & Carneiro (1993). A técnica de coloração Macchiavello foi adaptada após vários testes terem sido realizados, pois os cortes descolavam das lâminas quando imersos em azul-de-metileno por uma noite, de acordo com o protocolo de rotina. Desta forma, foi padronizado o uso de maior quantidade de gelatina na água da cuba térmica, e o tempo mínimo de 2h de imersão das lâminas em azul-de-metileno. A composição dos reagentes e corantes utilizados durante o processamento histológico das paralarvas é mostrada na Tabela 4. As lâminas foram analisadas em microscópio binocular JENAMED 2- Carl Zeiss, e as imagens dos cortes selecionados foram capturadas através do programa IPWin. Para tal, uma das oculares de um microscópio Nikon foi substituída por uma câmera SONY DXC-197A, conectada a um microcomputador.

2.3 Alimentação das paralarvas

Foram oferecidos como alimento às paralarvas náuplios de *Artemia* spp. enriquecidos com SUPER SELCO (INVE[®]), copépodes (*Acartia tonsa*), misidáceos juvenis (*Metamysidopsis elongata atlantica*) e zoé do siri-azul (*Callinectes sapidus*). Após os primeiros sete dias de cultivo, foram também oferecidos metanáuplios e adultos de *Artemia* sp.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização histológica das lesões

3.1.1 Paralarvas com braços normais

Paralarvas recém eclodidas

Em paralarvas recém eclodidas (Fig. 5A) a região aboral dos braços foi revestida por um epitélio cúbico simples constituído por quatro tipos de células (Fig. 5B):

- a) Células mucíparas ou “globet cells”: Possuem forma arredondada com núcleo periférico e basofílico. O citoplasma se apresenta pouco corado, devido à presença de mucina no seu interior. Estas células são responsáveis pela produção de muco (mucina) na superfície da epiderme das paralarvas.
- b) Células granulares: Possuem forma alongada com núcleo basal fortemente basofílico e citoplasma eosinofílico. Estas células possuem aparência secretora, pois apresentam grânulos imersos no seu interior. Além disso, se assemelham as células Club presentes na epiderme de peixes, sugerindo que as mesmas estejam envolvidas na síntese de ferormônios (comunicação química).
- c) Órgãos de Köllikers: São órgãos transitórios, presentes na superfície aboral dos braços e que possuem função desconhecida (Mangold 1983). Este órgão apresenta uma bainha de células parietais, as quais envolvem uma grande célula basal com núcleo central basofílico, secretora dos feixes de “cílios” que partem para o meio externo.
- d) Células germinativas: Presentes na região aboral e oral dos braços, porém na oral se encontram em maior número. Estas, provavelmente dão origem às células

granulares, pois além de possuírem a mesma forma, possuem grânulos no seu interior.

Abaixo deste epitélio foi observada uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo, a lâmina própria. Nesta camada, foram observadas células com núcleos fracamente corados, os fibroblastos. Sob a lâmina própria, foi observada a camada melânica, inserida na futura derme. Na base da camada pigmentar foi evidenciada uma camada de tecido mióide, o qual futuramente irá se diferenciar em tecido muscular. As células presentes neste tecido possuem forma alongada com núcleo central basofílico. A porção central do braço foi constituída pelo seio hemal, envolvido em toda sua extensão pelo tecido mióide. O seio hemal foi constituído por células sanguíneas com coloração fortemente basofílica e tecido nervoso, corado eosinofílicamente. A partir da camada mióide, foi observado que partem fibras conjuntivas elásticas transversais para o interior do seio hemal, as quais possivelmente atuam no processo de contração e distensão dos braços.

O epitélio cúbico simples da região aboral dos braços tornou-se pavimentoso simples próximo às ventosas. As paralarvas eclodem com 3 ventosas em cada braço, as quais são sustentadas por um tecido miopitelial com células bem delimitadas e núcleos basofílicos (Fig 5B). No ápice das ventosas este epitélio deu lugar ao epitélio cúbico simples, no qual foram observadas células com núcleo esférico e intensamente basofílico, semelhantes aos quitinócitos. Os quitinócitos são responsáveis pela formação e sustentação do anel quitinoso em formação no ápice das ventosas em lulas. Ainda, no eixo central da ventosa foi observado o epitélio pavimentoso simples revestindo externamente o tecido miopitelial.

Paralarvas com 24 dias de idade

As paralarvas com 24 dias de idade e com braços normais mantidas em tanques com correntes convergentes verticais apresentaram epitélio sem alterações celulares significativas quando comparadas às paralarvas recém-eclodidas (Fig. 6A). As extremidades dos braços tornaram-se mais delgadas, porém o número de ventosas permaneceu o mesmo observado em paralarvas recém-eclodidas (Fig. 6B).

3.1.2 Paralarvas com lesões evidentes nos braços

Paralarvas com 15 dias de idade

As paralarvas com idade de 15 dias mantidas em tanques com corrente ascendente apresentaram braços normais e com lesões evidentes, mas ainda com 3 ventosas (Fig. 7A). Foi observada uma estrutura nodular na região distal dos braços constituída por um aglomerado de células sanguíneas (Fig. 7B). As técnicas de coloração utilizadas não detectaram agentes etiológicos associados a esta estrutura.

Paralarvas com 20 e 24 dias de idade

As paralarvas com idade de 20 e 24 dias mantidas em tanques com corrente circular apresentaram braços normais e com lesões evidentes (Fig. 8A). Alguns braços lesionados apresentaram apenas duas ventosas (Fig. 8B). Foi observada a degeneração parcial ou total do tecido miopitelial, ao menos em uma das ventosas restantes, pois as células que compõem este tecido apresentam lise da membrana plasmática e à medida que avança o processo degenerativo, os núcleos tornam-se menores e mais densos originando núcleos picnóticos. Além disso, foi observado a diapedese de células sanguíneas contidas no seio hemal em direção ao tecido conjuntivo frouxo. O tecido epitelial lesionado apresentou degeneração dos órgãos de Kölliker, que careciam de células basais e feixes de cílios. Ainda, foram observadas modificações na forma das células granulares presentes neste epitélio, as quais anteriormente eram alongadas e se tornaram esféricas com núcleo fortemente basofílico e citoplasma eosinofílico. Em um estágio mais avançado de degeneração foi observada a ausência total de ventosas nos braços. Além disso, no epitélio cúbico simples houve o aumento das células granulares e menor ocorrência de células mucíparas e órgãos de Kölliker. As paralarvas com 24 dias não apresentaram bactérias associadas aos seus tecidos lesionados.

Paralarvas com 30 dias de idade

As paralarvas de 30 dias de idade mantidas em tanques com corrente circular apresentaram os mesmos processos degenerativos descritos acima (Fig. 9). Na região oral dos braços foi observada a mesma estrutura nodular de coloração basofílica presente nos braços de paralarvas com 15 e 20 dias de idade (Fig. 9), no entanto, foi também observada a migração de células sanguíneas do seio hemal em sua direção. O

epitélio apresentou-se aparentemente mais danificado, pois não foram visualizados os órgãos de Kölliker.

Paralarvas com 50 dias de idade

As paralarvas de 50 dias mantidas em tanques com corrente ascendente apresentaram braços normais com 5 ventosas e braços lesionados com 4 (Fig. 10). No entanto, as mesmas estavam em processo degenerativo, onde foram observados núcleos picnóticos. O epitélio apresentou-se menos danificado que o de paralarvas de 30 dias mantidas em tanques com corrente circular, sendo observado ainda alguns órgãos de Kölliker. Nestas paralarvas também não foram evidenciados agentes etiológicos nos tecidos lesionados.

3.2 Hidrodinâmica dos tanques

O Tanque de hidrodinâmica I gerou uma corrente circular de baixa velocidade, a qual promoveu a distribuição das paralarvas junto às laterais e ao fundo do tanque. As paralarvas com 5 dias de idade já apresentavam as extremidades de todos os braços lesionados, com exceção do 1º par. Entretanto, nos 2º, 3º e 4º braços direito o grau da lesão foi mais acentuada que nos demais. As paralarvas com 15 dias de idade também estavam com todos os braços lesionados, com exceção do 1º par. Mas, o grau da lesão estava ainda mais acentuado, pois em algumas paralarvas restavam somente a base do 2º, 3º e 4º pares de braços. Não obstante, os cortes histológicos dos braços lesionados de paralarvas com 20 dias de idade demonstraram a perda de 1 a 3 ventosas, ou degeneração do tecido miopitelial das mesmas. O epitélio estava em estado avançado de degeneração, apresentando uma grande redução dos órgãos de Kölliker, os quais já estavam ausentes nas paralarvas com 30 dias de idade.

O Tanque de hidrodinâmica II gerou uma corrente ascendente que promoveu uma melhor distribuição do alimento e das paralarvas, quando comparado ao de corrente circular. Foi observado que neste sistema a corrente bastante suave foi apenas capaz de reduzir o contato das paralarvas com as paredes, pois as mesmas também já apresentavam lesões nos seus braços aos 5 dias de idade. Embora o início das lesões nos braços destas paralarvas tenha iniciado no mesmo dia em que foi observado para as mantidas em tanques com corrente circular, as mesmas foram menos acentuadas. Assim,

as paralarvas com 5 dias de idade e mantidas em tanques com corrente ascendente apresentaram somente as extremidades do 2º, 3º e 4º pares de braços lesionados, ou as dos 3º e 4º pares. As paralarvas com 15 e 20 dias de idade apresentavam todos os braços lesionados, com exceção do 1º par. Mas, somente as extremidades estavam lesionadas, e, portanto o grau de lesão estava menos acentuado que ao de paralarvas com a mesma idade e mantidas em tanques com corrente circular. Através dos cortes histológicos dos braços das paralarvas com idades de 15 dias foi possível observar a presença de todas as ventosas. Além disso, as paralarvas com idade de 50 dias e mantidas neste modelo de tanque ainda apresentaram alguns órgãos de Kölliker, evidenciando que as lesões foram menos acentuadas, quando comparadas à de paralarvas mantidas em tanques com corrente circular.

O Tanque de hidrodinâmica III gerou correntes convergentes verticais, as quais promoveram a redução do contato das paralarvas com a parede e fundo dos tanques. Esta foi a melhor hidrodinâmica testada, pois paralarvas com idade de 5 dias, quando apresentavam lesões, estas se localizavam apenas na extremidade de um dos braços (4º braço direito ou esquerdo). Nos dias subsequentes, o número de braços lesionados não aumentou, e as mesmas também não estavam mais acentuadas. Nestes tanques, a maioria das paralarvas com 24 dias de idade apresentavam braços normais. Isto foi confirmado através dos cortes histológico, nos quais não foram evidenciadas alterações celulares e o número de ventosas permaneceu o mesmo observado ao de paralarvas recém-eclodidas.

4. DISCUSSÃO

As lesões observadas nos braços de paralarvas de *Octopus vulgaris* foram causadas pelo seu contato excessivo com as paredes dos tanques de cultivo. As diversas configurações internas de tanques empregadas geraram uma hidrodinâmica diferente dentro dos mesmos, a qual foi determinante no grau das lesões teciduais. Desta forma, foi observado no presente estudo que a hidrodinâmica do tanque é uma das causas de mortalidade das paralarvas durante o cultivo, a qual ainda não havia sido identificada anteriormente. Entretanto, estas lesões provavelmente ainda não haviam sido observadas porque a maiorias dos estudos utilizam métodos de amostragem que

resultam em um menor contato visual com as paralarvas. Outra hipótese é que em diversos experimentos são utilizados tanques de maior volume, ou seja, em torno de 500 a 4000 L, visando sua futura aplicação na larvicultura do polvo comum em escala comercial (Iglesias *et al.* 2000, Iglesias *et al.* 2004, Okumura *et al.* 2005). Porém, provavelmente as paralarvas mantidas em tanques maiores terão uma menor chance de contato com as paredes e o fundo, o que pode tornar o grau de lesão praticamente insignificante.

Nos tanques com corrente circular as paralarvas nadavam junto às laterais e ao fundo dos tanques. Assim, os braços mais lesionados foram o 2º, 3º e o 4º pares, pois estavam em constante contato com o fundo, e além destes, os do lado direito, exceto o 1º par, pelo contato com a parede. Estes resultados são similares aos observados para a lula *Loligo opalescens* mantidas em tanques com a mesma hidrodinâmica, as quais apresentaram lesões no tentáculo direito, 3º par de braços e, além destes, abrasão ou perda da nadadeira direita (Vidal *et al.* 2002).

No presente estudo, as análises histológicas dos braços de paralarvas com idade de 24 dias e mantidas em tanques de hidrodinâmica III com correntes convergentes verticais não apresentaram danos epiteliais, representando a melhor hidrodinâmica testada. Por outro lado, as paralarvas mantidas em Tanques de hidrodinâmica I (corrente circular) apresentaram lesões teciduais mais acentuadas, quando comparadas as paralarvas mantidas em tanques de hidrodinâmica II (corrente ascendente). Desta forma, as paralarvas com idade de 20 e 24 dias mantidas neste tipo hidrodinâmica (corrente circular) apresentaram a perda de uma ou de todas as ventosas nos braços, além da degeneração parcial dos órgãos de Kölliker. Entretanto, diferentemente destas paralarvas, as mantidas em Tanques de hidrodinâmica II (corrente ascendente) aos 15 dias de idade ainda apresentavam todas as ventosas nos braços e presença dos órgãos de Kölliker, o que evidencia que as mesmas estavam menos lesionadas do que às mantidas em tanques com hidrodinâmica I. Além disso, os resultados indicam que os tanques de hidrodinâmica II (corrente ascendente) reduziram o grau das lesões, pois apesar das paralarvas com idade de 50 dias terem apresentado a perda de uma das ventosas, o epitélio dos braços se apresentou menos danificado, quando comparado ao de paralarvas com idade de 30 dias mantidas em tanques de hidrodinâmica I, pois ainda foram observados os órgãos de Kölliker.

Os órgãos de Kölliker são órgãos transitórios presentes no epitélio de embriões e paralarvas de polvos da ordem incirrata (Mangold 1983) com comprimento de manto de até 6 mm (Nixon & Young 2003). No embrião, o batimento dos feixes ciliares dos órgãos de Kölliker auxiliam no processo de eclosão (Boletzky 2003), porém, após a eclosão das paralarvas, sua função é desconhecida. Contudo, a análise da estrutura celular destes órgãos realizada no presente estudo sugere que os mesmos possam estar envolvidos em processos osmorregulatórios, devido à sua semelhança com as células flama presentes em alguns anelídios. Portanto, a ausência destes órgãos poderia comprometer a capacidade osmorregulatória das paralarvas, ou seja, a manutenção da homeostase de seus fluidos corpóreos, acentuando as taxas de mortalidade.

Para lulas adultas (*Ommastrephes pteropus*) foram observadas invasões de bactérias patogênicas oportunistas na derme e tecidos adjacentes 72 horas após a perda da epiderme (Hulet *et al.* 1979). Entretanto, as técnicas de coloração de agentes etiológicos utilizados no presente estudo não detectaram nenhum tipo de patógeno associado aos tecidos lesionados das paralarvas, indicando, portanto sua ausência. Uma possibilidade a ser considerada é que as técnicas utilizadas tenham sido ineficientes para detectar a presença de patógenos. Entretanto, cinco espécies de bactérias patogênicas foram identificadas em lesões teciduais de *Octopus joubini* e *Octopus briareus* cultivados em laboratório, através de técnicas de coloração Gram e Macchiavello (Hanlon *et al.* 1984). Além disso, o método de coloração Gram é amplamente empregado em microbiologia, sendo considerado uma técnica eficiente e confiável (Junqueira & Carneiro 1993). Segundo Oestmann *et al.* (1997), o tratamento da água de cultivo através de filtro ultravioleta (UV) é essencial para a redução de concentrações de bactérias patogênicas na água. Por esta razão, os resultados sugerem que a ação do filtro UV conectado ao sistema das paralarvas tenha sido altamente eficiente.

As paralarvas de *Octopus vulgaris* apresentam ao eclodir somente três ventosas em cada braço, as quais são grandes em relação ao tamanho dos mesmos (Schmidtberg 1997). Os braços e ventosas são utilizados na captura de presas, assim sendo, as lesões observadas certamente afetam o crescimento e aumentam as taxas de mortalidade das paralarvas. O número de ventosas em braços de paralarvas de *O. vulgaris* com idades de 30 e 50 dias é de 11 e 23 ventosas respectivamente (Villanueva 1995). Entretanto, no presente estudo, as paralarvas com idades entre 30 e 50 dias apresentaram no máximo 5

ventosas em cada braço, indicando que estas paralarvas não estavam se desenvolvendo normalmente, provavelmente devido ao grande desvio energético para o reparo de tecidos.

Muito embora a sobrevivência de lulas (*Loligo opalescens*) tenha sido elevada em tanques idênticos ao Tanque de hidrodinâmica I do presente estudo, porém com maior volume, a análise histológica realizada no presente estudo demonstrou ser este o modelo menos eficiente para a larvicultura do polvo comum. Através da utilização de tanques similares Tanque de hidrodinâmica II, porém com volume de 30L foram obtidos juvenis de *Octopus vulgaris* aos 60 dias de cultivo (Carrasco *et al.* 2003). Estes tanques possuíam fundo côncavo e proporcionaram uma corrente vertical e ascendente, dificultando o contato das paralarvas com o fundo. Entretanto, o fechamento do ciclo de vida do polvo comum em laboratório foi alcançado pela primeira vez por Iglesias *et al.* (2004) ao utilizarem tanques circulares de 1000 L em sistema de água verde, no qual uma mangueira de ar no centro do tanque garantiu uma circulação suave. O sistema de água verde é amplamente utilizado na larvicultura de organismos aquáticos e consiste na adição de fitoplâncton ao meio de cultivo. Os resultados do presente estudo indicam que independentemente do tamanho dos tanques, as paralarvas são muito frágeis e, portanto o seu contato com as paredes deve sempre que possível ser evitado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES e CNPq (Programa PROFIX). Agradecemos também à colaboração do Téc. Lab. Pedro Antônio Garcia e de Renato Zacarias da Silva, do Laboratório de Morfologia Funcional (DCMB – FURG), pelo auxílio prestado no processamento e análise do material histológico.

LITERATURA CITADA

- BOLETZK, SV & RT HANLON. 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Mem Natl Mus Vic.*, 44: 147-187.
- BOLETZKY, SV. 2003. Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv. Mar. Biol.*, 44: 143-203.
- BURLEY, R & A KLAPSIS. 1985. Flow distribution studies in fish rearing tanks: Part. 2. Analysis of the hydraulic performance of 1 square m tanks. *Aquacultural Engineering.*, 4: 113-134.
- CARRASCO, JF, C RODRIGUEZ & M RODRIGUEZ. 2003. Cultivo intensivo de paralarvas de pulpo (*Octopus vulgaris* Cuvier 1797), en tanques parabólicos de 30 L utilizando como base de la alimentación zoeas vivas de crustáceos. In: *IX Congreso Nacional de Acuicultura* (anais). Espanha. 191-194p.
- FORSYTHE, JW, RT HANLON & PG LEE. 1987. A synopsis of cephalopod pathology in captivity. *Cephalopod Patology.*, 130-135.
- FORSYTHE, JW, RT HANLON & PG LEE. 1988. A formulary for treating cephalopods mollusc diseases. In: *Patology in Marine Science*, 51-63p.
- HANLON, RT, JW FORSYTHE & KM COOPER. 1984. Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *Journal of invertebrate pathology.*, 44: 67-83.
- HANLON, RT. 1987. Mariculture. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life Cycles*, vol. 2. Academic Press, London, 15: 291-305.
- HANLON, RT, PE TURK & WT YANG. 1987. Laboratory rearing of the squid *Loligo pealei* to the juvenile stage: growth comparisons with fishery data. *Fish Bull (Wash DC).*, 85: 163-167.
- HANLON, RT, WT YANG, PE TURK, PG LEE & RF HIXON. 1989. Laboratory culture and estimated life span of the eastern Atlantic squid *Loligo forbesi* (Mollusca: Cephalopoda). *Aquacult Fish Manag.*, 20: 15-33.
- HULET, WH, MR VILLOCH, RF HIXON & RT HANLON. 1979. Fin damage in captured and reared squids. *Laboratory Animal Science.*, 29 (4): 528-533.
- IGLESIAS, J, FJ SÁNCHEZ, JJ OTERO & C MOXICA. 2000. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): presente knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean Aquaculture Finfish Species Diversification. *Cahiers Options Méditerranéennes.*, 47: 313-322.
- IGLESIAS, J, JJ OTERO, C MOXICA, L FUENTES & FJ SÁNCHEZ. 2004. "The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier) under culture

- conditions: paralarvae rearing using Artemia and Zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age". *Aquaculture International.*, 12: 481-487.
- JUNQUEIRA, LC, J CARNEIRO. 1993. Manual de Técnicas Histológicas. Editora Guanabara- Koogan, Rio de Janeiro. 403p.
- JUNQUEIRA, LC, J CARNEIRO. 1995. Histologia Básica. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 590p.
- LOSORDO, TM, AO HOBBS & DP DELONG. 2000. The design and operational characteristics of the CP & L/ EPRI fish barn: a demonstration of recirculating aquaculture technology. *Aquacultural Engineering.*, 22: 3-13.
- MANGOLD, K. 1983. *Octopus vulgaris*. In: Boyle PR (ed) *Cephalopod life cycles*, Academic Press, London, vol. I, 335-364p.
- NIXON, M & JZ YOUNG. 2003. The brains and lives of cephalopods. Oxford University Press, New York, USA. 392p.
- OESTMANN, DJ, JM SCIMECA, JW FORSYTHE, RT HANLON & PG LEE. 1997. Special Considerations for Keeping Cephalopods in Laboratory Facilities. *American Association for Laboratory Animal Science.*, 36: 89-93.
- OKUMURA, S, A KURIHARA, A IWAMOTO & T TAKEUCHI. 2005. Improved survival and growth in *Octopus vulgaris* paralarvae by feeding large type *Artemia* and Pacific Sandeel, *Ammodytes personatus*. *Aquaculture.*, 244 (1-4): 147-157.
- RASMUSSEM, MR & E MCLEAN. 2004. Comparison of two different methods for evaluating the hydrodynamic performance of an industrial-scale fish-rearing unit. *Aquaculture.*, 242: 397-416.
- ROSS, RM, BJ WATTEN, WF KRISE, MN DILAURO & RW SODERBERG. 1995. Influence of tank design a hydraulic loading on the behavior, growth, and metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacultural Engineering.*, 14: 29-47.
- ROSS, RM & BJ WATTEN. 1998. Importance of rearing-unit design and stocking density to the behaviour, growth and metabolism of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquacultural Engineering.*, 19: 41-56.
- SCHMIDTBERG, H. 1997. The structure of suckers of newly hatched *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* and *Octopus vulgaris*. *Vie Millieu.*, 47: 155-159.
- TIMMONS, MB, ST SUMMERFELT & BJ VINCI. 1998. Review of circular tank technology and management. *Aquacultural Engineering.*, 18: 51-69.

- VAZ-PIRES, P, P SEIXAS & A BARBOSA. 2004. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): A review. *Aquaculture*, 238: 221-238.
- VIDAL, EAG, FP DIMARCO, JH WORMUTH & PG LEE. 2002. Optimizing rearing conditions of hatchling lolignid squid. *Marine Biology*.,140: 117-127.
- VILLANUEVA, R. 1995. Experimental rearing and growth of planktonic *Octopus vulgaris* from hatching to settlement. *Can.J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2639-2650.
- VILLANUEVA, RN, N KOUETA & E BOUCAUD-CAMOU. 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia* nauplii and compound diets. *Aquaculture*., 205: 269-286.



Figura 1- Vista geral do sistema de recirculação de água fechado para cultivo de paralarvas do polvo comum (*Octopus vulgaris*).

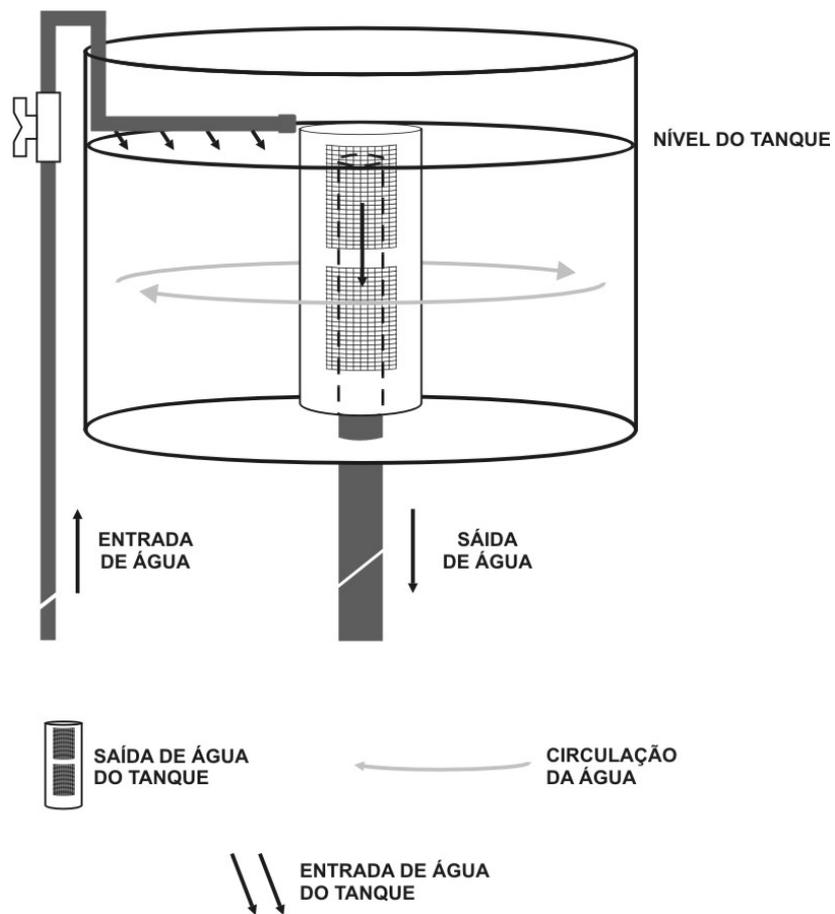


Figura 2- Design de tanque para cultivo de paralarvas do polvo comum (*Octopus vulgaris*) com corrente circular.

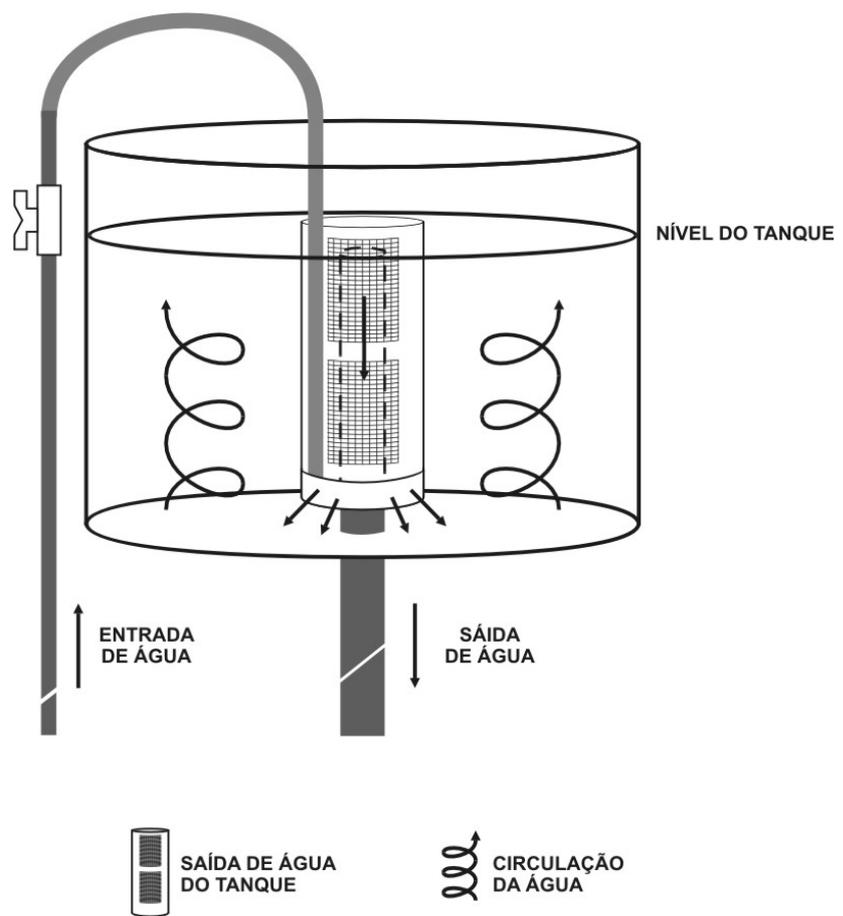


Figura 3- Design de tanque para cultivo de paralarvas do polvo comum (*Octopus vulgaris*) com corrente ascendente.

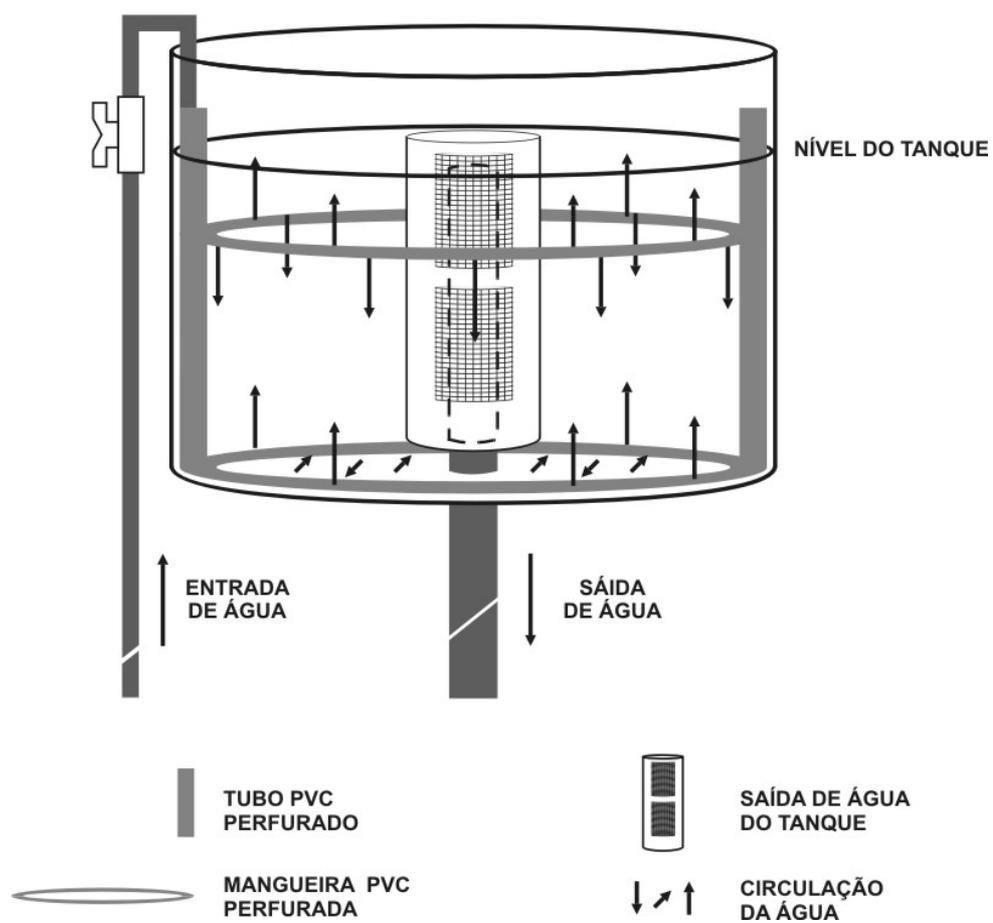


Figura 4- Design de tanque para cultivo de paralarvas do polvo comum (*Octopus vulgaris*) com corrente convergente vertical.

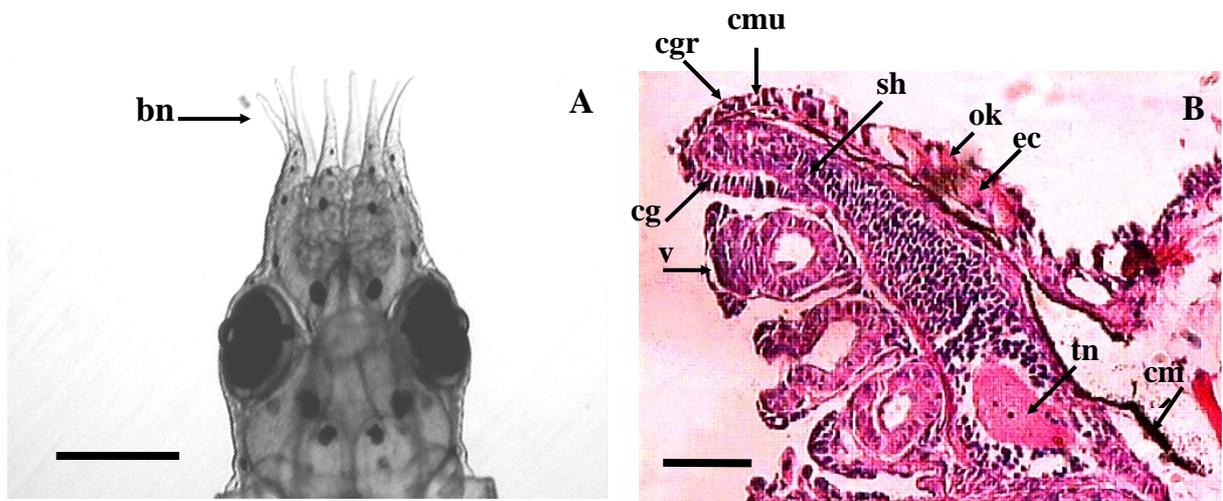


Figura 5- *Octopus vulgaris*. **A)** Paralarva recém eclodida com braços normais; bn, braços normais. Escala: 0,5 mm; **B)** Corte histológico longitudinal do braço normal; cg, célula germinativa; cgr, célula granular; cmu, célula mucípara; cm, camada melânica; ec, epitélio cúbico simples; ok, órgão de Kölliker; sh, seio hemal; tn, tecido nervoso; v, ventosa. Col. H. E. Escala: 100 µm.

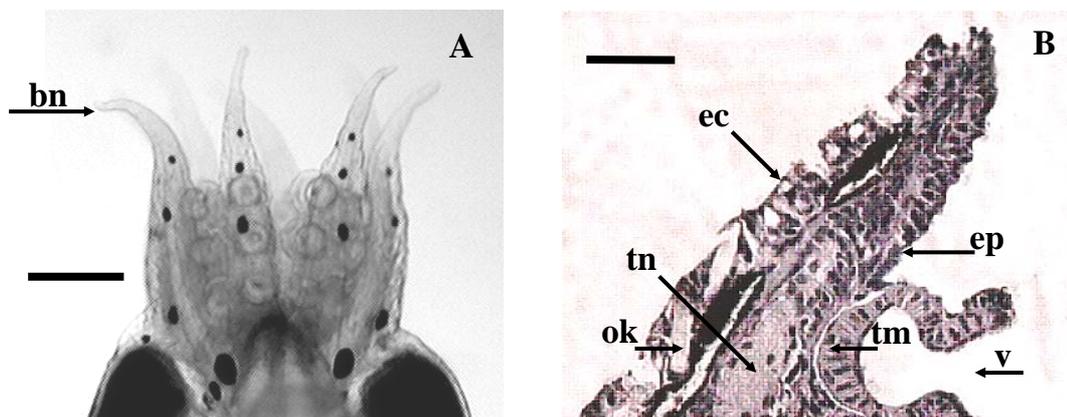


Figura 6- *Octopus vulgaris*. **A)** Paralarva com 24 dias de idade e com braços normais; bn, braços normais; Escala: 0,3 mm; **B)** Corte histológico longitudinal do braço normal; ec, epitélio cúbico simples; ep, epitélio pavimentoso simples; ok, órgão de Kölliker; tm, tecido miopitelial da ventosa; tn, tecido nervoso; v, ventosa. Col. H. E. Escala: 100 µm.

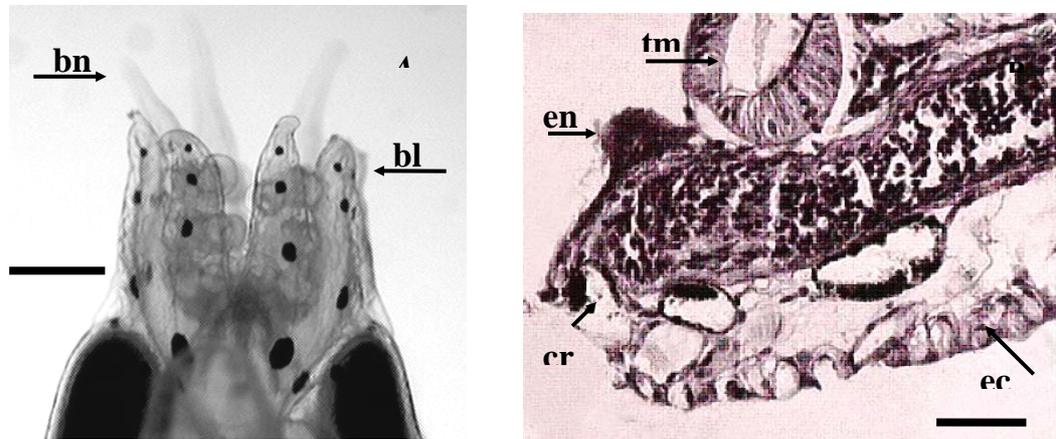


Figura 7- *Octopus vulgaris*. **A)** Paralarva com 15 dias de idade com braços normais e lesionados; bn, braços normais; bl, braços lesionados; Escala: 0,3 mm; **B)** Corte histológico longitudinal do braço lesionado; cr, cromatóforo; ec, epitélio cúbico simples; en, estrutura nodular; tm, tecido miopitelial da ventosa. Col. Gram. Escala: 50 μ m.

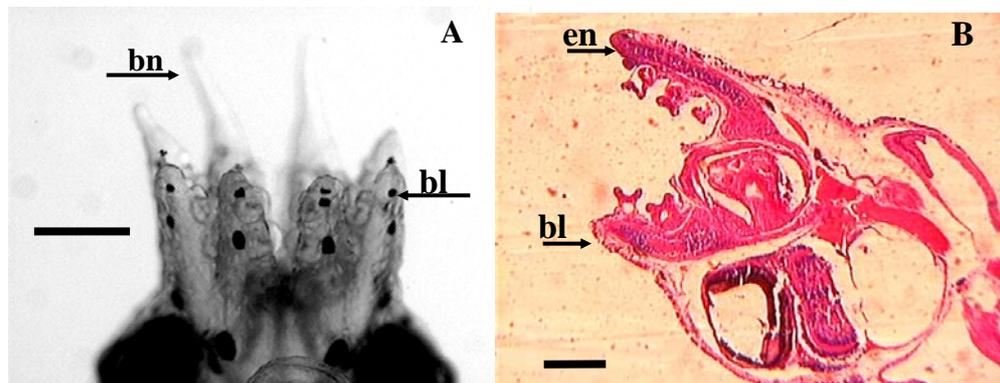


Figura 8- *Octopus vulgaris*. **A)** Paralarva com 20 dias de idade com braços normais e lesionados; bn, braço normal; bl, braço lesionado; Escala: 0,3 mm; **B)** Corte histológico longitudinal de uma paralarva com idade de 20 dias e lesão evidente nos braços, inclusive com notável perda de uma ventosa. bl, braço lesionado; en, estrutura nodular. Col. H. E. Escala: 200 μ m.

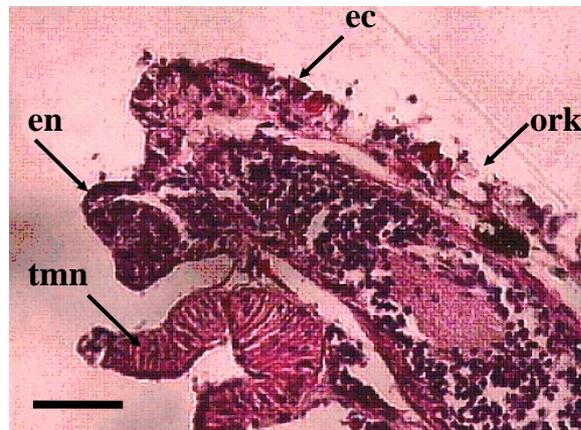


Figura 9- *Octopus vulgaris*. Braço lesionado de uma paralarva com 30 dias de idade, ilustrando a migração de células sanguíneas provenientes do seio hemal em direção à estrutura nodular. ec, epitélio cúbico simples; en, estrutura nodular; ork, orifício do órgão de Kölliker; tmn, tecido miopitelial normal da ventosa. Col. H. E. Escala: 50 μ m.

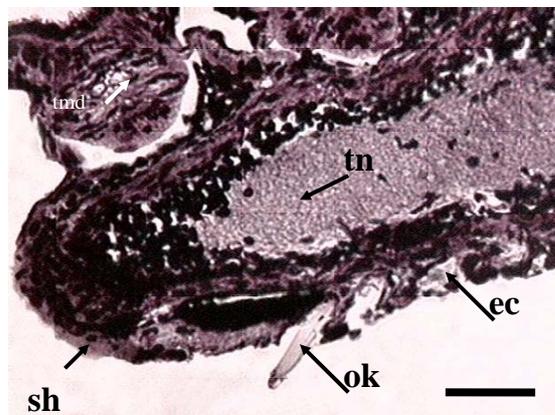


Figura 10- *Octopus vulgaris*. Corte histológico do braço lesionado de uma paralarva com 50 dias de idade, ilustrando a degeneração de uma das ventosas e a presença de um órgão de Kölliker. ec, epitélio cúbico simples; ok, órgão de Kölliker; sh, seio hemal; tmd, tecido miopitelial em degeneração; tn, tecido nervoso. Col. Macchiavello. Escala: 50 μ m.

Tabela 1: Número e idade de paralarvas de *Octopus vulgaris* com braços normais e lesionados coletadas de tanques com diferente hidrodinâmica e o respectivo processamento histológico. AM, Azul-de-Metileno; H.E, Hematoxilina-Eosina; L, braços lesionados; MAC, Macchiavelo; N, braços normais.

I (dias)	n	Braços	Hidrodinâmica	Coloração
0	6	N	II	H.E
15	1	L	II	Gram; AM.; MAC.
20	2	L	I	H.E
24	4	N	IV	H.E
24	3	L	I	Gram; AM.; MAC.
30	2	L	I	H.E
50	2	L	II	Gram; AM.; MAC.

Tabela 2: Hidrodinâmica e número de tanques testados na larvicultura do polvo comum.

Hidrodinâmica	n° de tanques testados
Circular	6
Ascendente	3
Convergente	2

Tabela 3: Protocolo para processamento de tecidos e técnicas de coloração de paralarvas de *Octopus vulgaris*.

Processo	Tempo
Fixação	
Formol 4%	Previamente fixadas
Desidratação	
Álcool 70°	30 min.
Álcool 80°	30 min.
Álcool 90°	30 min.
Álcool 100 I	30 min.
Diafanização	
Xilol	15 min.
Impregnação	
Parafina I	01h 15min.
Inclusão	
Parafina I	45 min.
Coloração de rotina	
Hematoxilina-Eosina (HE)	
Diafanização	15 min.
Hidratação	15 min.
Água corrente	5 min.
Hematoxilina	10 min.
Água corrente	15 min.
Eosina	1 min.
Desidratação (álcool absoluto)	rápida passagem
Diafanização	10 min.
Coloração para detecção de agentes etiológicos	
Azul-de-Metileno	
Formol 10% tamponado	48 h
Desparafinar	15 min.
Água destilada	5 min.
Azul-de-Metileno 1%	20 min.
Água destilada	5 min.
Desidratação	10 min.
Diafanização	10 min.

Tabela 3: Continuação.

Processo	Tempo
Coloração para detecção de agentes etiológicos	
Gram	
Formol 10% tamponado	48 h
Desparafinar	15 min.
Solução de violeta fenicada	1 min.
Lugol	1 min.
Diferenciar em álcool 95% ou Acetona	3 min.
Água corrente	5 min.
Fucsina diluída	1 min.
Água corrente	5 min.
Desidratação	10 min.
Macchiavello	
Desparafinar	15 min.
Água destilada	5 min.
Azul-de-Metileno 1%	02 h.
Diferenciar em álcool 95%	3 min.
Água destilada	1 min.
Fucsina diluída	30 min.
Ácido cítrico	2 seg.

Tabela 4: Composição dos reagentes e corantes utilizados durante o processamento histológico de paralarvas de *Octopus vulgaris*.

Reagentes	Composição	Tempo
Ácido cítrico 0,5% solução aquosa	Ácido cítrico	0,5 g
	Água destilada	100 ml
<hr/>		
Azul-de-Metileno 1% solução aquosa	Azul-de-Metileno	1 g
	Água destilada	100 ml
<hr/>		
Formol 10% tamponado	Formol	100 ml
	Água destilada	900 ml
	Fosfato de sódio monobásico (Na.H ₂ PO ₄ .H ₂ O)	4 g
	Fosfato de sódio dibásico (anidro) (Na ₂ HPO ₄)	6,5 g
<hr/>		
Fucsina básica fênica 0,5 % solução aquosa	Fucsina básica sol. alcoólica saturada	10 ml
	Ácido fênico sol. aquosa 5%	90 ml
<hr/>		
Solução de Lugol	Iodo sublimado	2 g
	Iodeto de potássio	4 g
	Água destilada	100 ml
<hr/>		
Violeta cristal-fenicada	Violeta cristal sol. Alcoólica 95% saturada (5%)	10 ml
	Fenol sol. Aquosa 1%	90 ml

DISCUSSÃO GERAL

De forma similar a outras espécies do mesmo gênero, o aumento no peso úmido dos ovos de *Octopus vulgaris* ocorre após o início da organogênese, e isto se deve à absorção de água e formação dos tecidos do embrião. Por outro lado, o peso seco se manteve praticamente constante durante todo o desenvolvimento, tendendo a se estabilizar próximo ao final da organogênese. No entanto, os resultados indicaram que a perda de biomassa foi relativamente baixa, pois houve uma redução de apenas 12 % no peso orgânico dos ovos devido ao gasto energético na manutenção do metabolismo dos embriões, sugerindo que o vitelo tenha sido convertido com eficiência em massa corpórea na temperatura de incubação escolhida ($24 \pm 1^\circ \text{C}$). Este resultado é bastante questionável, pois a eficiência da utilização do vitelo necessita ser avaliada em diferentes temperaturas, para se obter uma maior compreensão da temperatura ótima para a incubação dos ovos de *O. vulgaris*.

No presente estudo foi observado que em ovos incubados a $24 \pm 1^\circ \text{C}$, o vitelo representou de 20 a 32 % do peso úmido do corpo das paralarvas 4 dias antes da eclosão. Este resultado contrasta com o observado para a lula *Loligo opalescens* proveniente de ovos incubados em menores temperaturas (12°C e 16°C), nas quais o vitelo representou de 10 a 15% do seu peso úmido no momento da eclosão.

Através do tempo de sobrevivência das paralarvas em inanição e da temperatura foi possível avaliar a importância do conteúdo de vitelo na eclosão. A reserva de vitelo permitiu que as paralarvas sobrevivessem até 8 dias a 19°C e até 10 dias a 24°C . Entretanto, taxas de sobrevivência acima de 70 % foram verificadas no Dia 5 para as paralarvas mantidas a 19°C e no Dia 3 a 24°C . Como esperado, as maiores taxas de mortalidade foram registradas anteriormente para as paralarvas mantidas a 24°C , provavelmente devido à absorção de vitelo mais rápida a maiores temperaturas, como resultado das maiores taxas metabólicas.

A reserva de vitelo é de vital importância para a sobrevivência das paralarvas durante os primeiros dias após a eclosão que é o período crítico do cultivo, onde são observadas as maiores taxas de mortalidades. Entretanto, visando-se reduzir os custos metabólicos, os resultados deste estudo indicam que após a eclosão as paralarvas devem ser mantidas a menores temperaturas, o que pode refletir no seu maior potencial de

sobrevivência. Portanto, a energia contida no vitelo de *O. vulgaris* foi utilizada na formação dos tecidos embrionários, na respiração e como fonte endógena de alimento para as paralarvas após a eclosão.

Os resultados do presente estudo demonstraram que após a eclosão as paralarvas de *Octopus vulgaris* apresentam um padrão de cromatóforos bem definido, o qual é amplamente utilizado em estudos taxonômicos, pois são característicos para cada espécie. Foram observadas muitas diferenças tanto no número quanto no padrão de cromatóforos entre as paralarvas provenientes da costa sul do Brasil e as da Galícia (Vigo, Espanha), ambas incubadas e mantidas em temperaturas semelhantes ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). As diferenças observadas no número de cromatóforos entre paralarvas de *O. vulgaris* de ambas localidades poderiam estar relacionadas à latitude térmica. As paralarvas provenientes da Galícia que eclodem em maiores latitudes ($42^{\circ} 13' \text{ N}$) apresentaram maior CM na eclosão e menor ou igual número de cromatóforos em todas as regiões do corpo, exceto na região ventral da cabeça, quando comparadas às da costa sul do Brasil ($27^{\circ}07' \text{ S}$). Portanto, esta não parece ser a causa das diferenças observadas no número de cromatóforos destas paralarvas.

Alguns autores relatam que distribuição de *Octopus vulgaris* se restringe apenas ao Mediterrâneo e leste do Atlântico. Assim, as diferenças observadas no padrão de cromatóforos entre as paralarvas da costa sul do Brasil e da Galícia (leste do Atlântico) poderiam indicar uma complexidade de espécies. Contudo, semelhanças na seqüência de bandas de DNA entre *O. vulgaris* do Mediterrâneo e espécimes da costa do sul do Brasil, sugere que esta restrição de distribuição possa ser um tanto equivocada. Por outro lado, o número de cromatóforos na região ventral do manto de paralarvas da Galícia foi muito semelhante ao observado para paralarvas do Mediterrâneo com similar CM. Em contraste, as paralarvas da costa sul do Brasil apresentaram desde a eclosão um número consideravelmente maior de cromatóforos na região ventral do manto em relação às paralarvas galegas, representando a maior diferença observada entre as paralarvas das duas localidades. Desta forma, os resultados sugerem que para avaliar o quanto estas diferenças observadas no padrão de cromatóforos possam estar ligadas a uma complexidade da espécie seria necessário o suporte de genética molecular.

Os resultados do presente estudo indicam que configurações internas dos tanques de cultivo resultam em diferentes hidrodinâmicas, as quais levam ao menor ou maior contato das paralarvas com as paredes dos tanques. Desta forma, a hidrodinâmica representa uma das causas de mortalidade das paralarvas, a qual não havia sido observada em nenhum estudo anterior. Os tanques de hidrodinâmica I geraram uma corrente circular de baixa velocidade, favorecendo o contato das paralarvas com as paredes e o fundo dos tanques. Assim, as paralarvas mantidas nestes tanques apresentaram aos 5 dias de idade braços com um grau de lesões bem pronunciado, principalmente no 2º braço direito, provavelmente pelo contato com a parede, e no 3º e 4º pares devido o contato com o fundo. Com base nas análises histológicas dos braços lesionados foi observado que este modelo de tanque foi o que causou maiores danos celulares. As paralarvas com 20 dias apresentaram perda de uma ou todas as ventosas dos braços e diminuição dos órgãos de Kölliker, os quais já estavam ausentes nas de 30 dias de idade.

Entretanto, os tanques de hidrodinâmica II geraram uma corrente ascendente que diminuiu o contato das paralarvas com o fundo e as paredes. As paralarvas mantidas nestes tanques apresentaram aos 5 dias de idade braços com um leve grau de lesões, pois foram observadas lesões apenas nas extremidades do 3º e 4º pares de braços. As análises histológicas demonstraram que este modelo de tanque causou menores danos celulares nos tecidos lesionados. Assim, paralarvas com 15 dias não apresentaram perda de ventosas, porém uma estrutura nodular indicou o início do processo abrasivo. No entanto, as paralarvas com idades de 50 dias apresentaram o epitélio menos danificado que o de paralarvas com idade de 30 dias mantidas em tanques com corrente circular, pois ainda foram observados órgãos de Kölliker nestas paralarvas.

Contudo, cabe salientar que os tanques de hidrodinâmica III geraram correntes convergentes verticais, reduzindo o contato das paralarvas com as paredes. Não obstante, paralarvas com 24 dias de idade e mantidas neste sistema não apresentaram danos epiteliais, sendo, portanto esta a melhor hidrodinâmica testada. Porém, independente do tamanho do tanque, o contato das paralarvas com as paredes deve ser evitado, tendo em vista que as mesmas são bastante frágeis.