



**POLITÉCNICO  
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR  
DE TURISMO E  
TECNOLOGIA DO MAR

***Análise da performance de crescimento de juvenis de corvina-legítima (*Argyrosomus regius* (Asso, 1801)) a duas temperaturas alimentadas com diferentes fontes e teores proteicos***

Sara Joana da Silva de Sousa e Brito

2020



***Análise da performance de crescimento de juvenis de corvina-legítima (*Argyrosomus regius* (Asso, 1801)) a duas temperaturas alimentadas com diferentes fontes e teores proteicos***

Sara Joana da Silva de Sousa e Brito

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Pedro Pousão Ferreira (IPMA) e coorientação da Professora Especialista Teresa Baptista (IPL)

**Título:** Análise de performance de crescimento de juvenis de corvina-legítima (*Argyrosomus regius* (Asso, 1801)) a duas temperaturas alimentadas com diferentes fontes e teores proteicos.

O conteúdo do trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor, Sara Joana da Silva de Sousa e Brito.

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“One of the greatest fictions of all is to deny the complexity of the world and think in absolute terms.”

- Yuval Noah Harari

***Dedico esta dissertação aos meus avós (in memoriam).***

Porque a vossa existência na minha vida foi tão importante para aquilo em que me tornei hoje.

Obrigada por todo o amor e por tudo aquilo que me proporcionaram.





Vista aérea da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do IPMA onde foi realizado este trabalho.

Este trabalho foi financiado e realizado na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) do IPMA utilizando corvinas nascidas nesta Estação e as infraestruturas e meios disponíveis para o cultivo, amostragens biológicas e análises laboratoriais. Ao IPMA reserva-se o direito de utilizar toda a informação nela contida para efeitos de publicações, relatórios da entidade financiadora e divulgação ao público em geral.



## Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a participação direta ou indireta de um conjunto de pessoas que considero imprescindíveis, aos quais gostaria de agradecer:

Ao Doutor Pedro Pousão Ferreira por ter aceite a orientação desta tese, por me ter introduzido nesta família que é a EPPO, por me ter transmitido a sua paixão pela investigação em aquacultura e por me ter sempre ajudado e acreditado. Sem o seu apoio e dedicação nada teria sido possível.

À Professora Especialista Teresa Baptista por ter aceite coorientar-me e por tudo ter feito para a possibilidade de realizar este ensaio na EPPO ser possível.

À Marisa Barata por me ter acompanhado ao longo de todo o meu ensaio, por me ter dado sempre os seus melhores conselhos, por ter acreditado em mim, e ter sido sempre uma grande amiga.

À SPAROS em especial ao Doutor Jorge Dias pela disponibilidade e formulação das rações para a realização deste ensaio.

À Doutora Catarina Matias, Doutora Florbela Soares e Doutora Laura Ribeiro pela constante disponibilidade, tempo despendido e transmissão de conhecimento.

À Margarida Gambôa que mesmo longe sempre teve tempo para me aconselhar e ensinar.

À Vanessa Morgado pelo carinho e tempo despendido naquele laboratório de histologia.

Ao André Soares pela tão preciosa ajuda durante o decorrer do ensaio.

À Letícia Luján pela constante disponibilidade e entreaajuda, mas principalmente pela amizade.

À Tetyana Urshulyak por ser incansável, por estar sempre disponível para me ensinar tudo aquilo que sabe e, acima de tudo, por ser a pessoa que é, guerreira, destemida, divertida, amiga, conselheira e a melhor companhia para tardes de desespero.

Ao Ângelo Viegas que é um dos melhores colegas que alguém pode ter. Pela paciência, pelo apoio, pela boa disposição e sentido de humor.

À Catarina e à Inês pelo companheirismo e amizade, foram um pilar fundamental ao longo deste ano tão caricato, juntas superámos este desafio.

Ao Victor porque a minha vinda para o Algarve não foi tarefa fácil.

À Patrícia por sempre me ter apoiado e acompanhado neste percurso, pela paciência e tão preciosa ajuda. Aturar uma bióloga não é tarefa fácil.

Ao Gonçalo e à Elisabete pela tão boa disposição e por serem parte fundamental da minha vida.

À minha avó Isilda por estar presente em todos os momentos da minha vida.

E em especial aos meus pais que sempre me proporcionaram tudo. À minha mãe. Ao meu pai. Por todos os vossos esforços, agradeço do fundo do coração!

Este trabalho foi financiado pelo projeto DIVERSIAQUA II – Diversificação, Inovação e Desenvolvimento da Aquacultura em Portugal (Mar2020 01/02/16 FMP-0066), liderado pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera I.P. (IPMA).

## Resumo

A corvina-legítima (*Argyrosomus regius*) é uma espécie que apresenta um elevado valor comercial e que, sob condições de temperatura adequadas, apresenta características interessantes para a prática de uma aquacultura mais sustentável e diversificada na área do mediterrâneo.

Uma vez que é uma espécie carnívora com altos requisitos proteicos, e que nos últimos anos se destaca como candidata de excelência para a diversificação da aquacultura, inúmeros estudos têm sido efetuados para determinar quais realmente são os seus níveis ideais de proteína dietética e de que maneira os ingredientes são capazes de impulsionar o seu crescimento, de forma a tornar esta espécie cada vez mais apelativa para a indústria, de um ponto de vista económico e ambiental.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito combinado da temperatura da água e da fonte e teor proteicos da dieta no crescimento, por parte de juvenis de corvina-legítima. Para tal, os peixes (peso corporal inicial:  $30,17 \pm 5,58\text{g}$ ) foram sujeitos a quatro tratamentos distintos (LT CP55, HTCP50, HTCP55 e HT CP55 ALT), realizados a duas temperaturas (22 e 26 °C) e alimentados com três dietas isolipídicas (16,2%), constituídas por 50% de proteína bruta (CP) (dos quais 24,5% eram farinhas de peixe (FP)) e 25,5% eram proteínas de origem vegetal (PV)) (CP50); 55% de CP (dos quais 28% eram FP e 27% eram PV) (CP55); e a dieta alternativa também com 55% de CP (dos quais 7% eram FP, 21% PV e 27% farinhas de aves (FA)) (CP55 ALT), durante um período de 56 dias.

Quando comparados os tratamentos com diferentes temperaturas de água (LT CP55 e HT CP55), constatou-se que, os indivíduos sujeitos a 26 °C, obtiveram uma *performance* notoriamente superior, demonstrando um peso final de  $134,53 \pm 23,03\text{g}$  e valores de taxa de crescimento específico (TCE), taxa de conversão alimentar (TCA), taxa de eficiência proteica (TEP) e retenção proteica (RP), significativamente superiores, com exceção do índice de consumo diário (ICD) e do índice hepatossomático (IHS), que não diferiram entre indivíduos tratados a diferentes temperaturas.

Quando os juvenis foram alimentados com diferentes fontes e teores proteicos (HT CP50, HT CP55 e HT CP55 ALT), apenas se verificaram diferenças nos valores TCA e IHS, demonstrando que, apesar de os peixes alimentados com 55% de CP fazerem uma melhor

utilização dos alimentos a temperaturas de 26 °C, a fonte e teor proteicos não influenciam a sua *performance* de crescimento.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a temperatura é um fator de extrema importância no cultivo de juvenis de corvina-legítima, e que os indivíduos desta espécie podem ser alimentados com dietas que substituem em grande parte as farinhas de peixe por farinhas de aves.

**Palavras-chave:** *Argyrosomus regius*, corvina-legítima, proteína, temperatura, crescimento, farinhas de aves.

## **Abstract**

Meagre (*Argyrosomus regius*) is a species with high commercial value which, under appropriate temperature conditions, presents interesting attributes for a more sustainable and diversified aquaculture practice in the Mediterranean area.

Since it is a carnivorous species with high protein requirements, that in recent years stands out as an excellent candidate for the diversification of aquaculture, numerous studies have been carried out to determine what are its ideal dietary protein levels and how ingredients can boost its growth, in order to turn this species increasingly appealing to the industry, from an economic and environmental point of view.

This study aimed to evaluate the combined effect of water temperature and the diet protein source and content on the growth of meagre juveniles. For that purpose, fish (initial body weight:  $30.17 \pm 5.58\text{g}$ ) were subjected to four different treatments (LT CP55, HTCP50, HTCP55, and HT CP55 ALT), performed at two temperatures (22 and 26 °C), and fed with three isolyptic diets (16.2%), consisting of 50% crude protein (CP) (of which 24.5% were fish meal (FP) and 25.5% were plant proteins (PV)) (CP50), 55% CP (of which 28% were FP and 27% were PV) and the alternative diet also with 55% CP (of which CP (of which 7% were FP, 21% PV and were 27% poultry meal (FA)) (CP55 ALT), during a period of 56 days.

When comparing treatments with different water temperatures (LT CP55 and HT CP55), it was found that individuals under 26 °C obtained a notoriously superior performance, demonstrating a final weight of  $134.53 \pm 23.03\text{g}$  and values of specific growth ratio (TCE), feed conversion ratio (TCA), protein efficiency ratio (TEP) and protein retention (RP) significantly higher, except for the daily feed intake (ICD) and hepatosomatic index (IHS), which did not differ between individuals treated at different temperatures.

When the juveniles were fed with different sources and protein contents (HT CP50, HT CP55, and HT CP55 ALT), the only difference was in the TCA and IHS values, demonstrating that, although fish fed 55% CP made better use of food, at temperatures of 26 °C, the source and protein contents did not influence their growth performance.

The results of this work demonstrated that temperature is an extremely important factor in the cultivation of meagre juveniles and the juveniles of this species can be fed with diets that largely replace fish meal with poultry meal.

**Keywords:** *Argyrosomus regius*, meagre, protein, temperature, growth, poultry meal.

# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Índice de quadros</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1.O Crescimento da população mundial, o aumento da demanda global por alimentos e a procura do pescado como fonte de proteína .....	2
1.2.Panorama mundial da aquacultura .....	5
1.3.Produção em aquacultura em Portugal .....	7
1.4. Corvina-legítima, <i>Argyrosomus regius</i> (Asso, 1801).....	10
1.4.1. A espécie.....	10
1.4.2. Produção em aquacultura.....	12
1.5.Alimentação e nutrição em aquacultura.....	15
1.5.1. Proteínas .....	17
1.5.2. A economia circular como alternativa às farinhas de peixe .....	19
1.5.2.1. Fontes alternativas .....	20
1.5.2.1.1. Proteínas vegetais.....	20
1.5.2.1.2. Subprodutos da produção animal.....	21
1.5.2.1.3. Outras alternativas proteicas.....	22
1.5.3. O Fator Temperatura .....	24
1.6.Objetivos. ....	25
<b>2. Materiais e métodos</b> .....	<b>27</b>
2.1.Dietas experimentais .....	27
2.2.Desenho Experimental .....	28
2.3.Amostragem .....	30
2.4.Alimentação .....	31
2.5.Procedimentos bioquímicos.....	32
2.5.1. Preparação das amostras para posterior análise bioquímica .....	32
2.5.2. Análise bioquímica.....	32

2.6. Procedimentos histológicos .....	33
2.6.1. Preparação das amostras para posterior análise histológica.....	33
2.6.2. Observação, fotografia e medição microscópica .....	33
2.7. Métodos analíticos.....	34
2.7.1. Fórmulas utilizadas para cálculo dos parâmetros relativos ao crescimento e retenção de nutrientes .....	34
2.8. Análise estatística .....	37
<b>3. Resultados... ..</b>	<b>39</b>
3.1. Composição bioquímica das dietas experimentais.....	39
3.2. Performance de crescimento e eficiência na utilização das dietas .....	39
3.3. Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima.....	43
3.3.1. Tratamentos alimentados com o mesmo nível de proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C) .....	43
3.3.2. Tratamentos alimentados com diferentes dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT) .....	43
3.4. Análise do fígado dos juvenis de corvina-legítima .....	44
<b>4. Discussão ....</b>	<b>49</b>
<b>5. Conclusão....</b>	<b>59</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Anexos .....</b>	<b>.....</b>
7.1. Anexo I: Protocolo de Histologia.....	.....

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1:</b> Louis-Joseph Yperman: La pêche au vivier, 1910.....	2
<b>Figura 1.2:</b> Modelo de projeção do crescimento da população mundial, por regiões, até 2100 .....	3
<b>Figura 1.3:</b> Contribuição do pescado como fonte de proteína animal para a população mundial, valores médios 2015 – 2017.. .....	4
<b>Figura 1.4:</b> Tendência dos stocks pesqueiros marinhos a nível global desde o ano 1974 até 2017.. .....	5
<b>Figura 1.5:</b> Evolução da produção da pesca e da aquacultura desde 1950 até 2018.... .....	6
<b>Figura 1.6:</b> Consumo per capita aparente de produtos da pesca e da aquacultura por estado-membro referentes aos anos 2017 e % de variação entre os anos 2016 e 2017.. .....	8
<b>Figura 1.7:</b> Corvina-legítima ( <i>Argyrosomus regius</i> (Asso, 1801)) .....	10
<b>Figura 1.8:</b> Distribuição geográfica de corvina-legítima com base no cenário de emissões do IPCC RCP 8.5.....	11
<b>Figura 1.9:</b> Ciclo de produção de corvina-legítima ( <i>A. regius</i> ), contemplando a dieta utilizada em cada fase, na EPPO.....	14
<b>Figura 1.10:</b> Exemplo de curva dose-resposta para definir o requisito proteico de um determinado organismo.. .....	18
<b>Figura 1.11:</b> Ilustração do metabolismo energético de um peixe.....	18
<b>Figura 2.1:</b> Representação esquemática da distribuição dos diferentes tratamentos pelos tanques da EPPO.....	30
<b>Figura 3.1:</b> - Microfotografias de luz, obtidas a partir de microscópio ótico, de preparações histológicas definitivas de fígado de juvenis de corvina-legítima ( <i>Argyrosomus regius</i> ) alimentadas com a mesma dieta (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C).....	45
<b>Figura 3.2:</b> - Diâmetro dos hepatócitos de juvenis de corvina-legítima sujeitos aos diferentes tratamentos .....	46

<b>Figura 3.3:</b> Microfotografias de luz, obtidas a partir de microscópio ótico, de preparações histológicas definitivas de fígado de juvenis de corvina-legítima ( <i>Argyrosomus regius</i> ) alimentadas com diferentes fontes e teores de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) a uma temperatura de 26 °C, com claros sinais de esteatose celular.....	47
<b>Figura 4.1:</b> Evolução do peso dos peixes e da temperatura de cultivo nos diferentes tratamentos, ao longo dos 56 dias de ensaio.....	52

## Índice de quadros

<b>Quadro 2.1:</b> Composição ponderal e proximal das dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT). .....	28
<b>Quadro 2.2:</b> Fator de hidratação das diferentes dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT). .....	32
<b>Quadro 3.1:</b> Composição bioquímica das dietas experimentais CP50, CP55 e CP55 ALT (MS: matéria seca; CP: proteína bruta; LipT: lípidos totais; EB: energia bruta).....	39
<b>Quadro 3.2:</b> <i>Performance</i> de crescimento e utilização das dietas dos juvenis de corvina-legítima tratados com o mesmo teor de proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C).....	41
<b>Quadro 3.3:</b> <i>Performance</i> de crescimento e utilização das dietas dos juvenis de corvina-legítima tratados com diferentes teores e fontes de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) à mesma temperatura (26 °C) .....	42
<b>Quadro 3.4:</b> Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima (56º dia) tratados com o mesmo teor de proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C).....	43
<b>Quadro 3.5:</b> Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima (56º dia) tratados com diferentes teores e fontes de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) à mesma temperatura (26 °C).....	44



## Lista de Siglas e Abreviaturas

**EB:** Energia bruta

**CEE:** Comunidade Económica Europeia

**CP:** Proteína bruta

**CP50:** Dieta contendo 50% proteína bruta

**CP55 ALT:** Dieta contendo 55% proteína bruta alternativa

**CP55:** Dieta contendo 55% proteína bruta

**DGRM:** Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

**DPX:** Distreno Plastificante Xileno

**EPPO:** Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

**FA:** Farinhas de aves

**FAO:** *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

**FP:** Farinhas de peixe

**HE:** Hematoxilina Eosina

**HT:** Alta temperatura (26 °C)

**ICD:** Índice de consumo diário

**IHS:** Índice hepatossomático

**INE:** Instituto Nacional de Estatística

**IPMA:** Instituto Português do Mar e da Atmosfera

**IUCN:** *International Union for Conservation of Nature*

**LipT:** Lípidos totais

**LT:** Baixa temperatura (22°C)

**MS:** Matéria seca

**ONU:** Organização das Nações Unidas

**PCF:** Peso corporal final

**PCI:** Peso corporal inicial

**PS:** Peso seco

**PV:** Proteínas de origem vegetal

**RP:** Retenção de proteína

**Séc.:** Século

**TCA:** Taxa de conversão alimentar

**TCE:** Taxa de crescimento específico

**TEP:** Taxa de eficiência proteica

**UE:** União Europeia



## 1. Introdução

Uma das características mais notáveis das populações é a sua admirável adaptabilidade. Os organismos, sendo estes humanos ou não, respondem a características estruturais e funcionais do ambiente que os rodeia, podendo também responder a alterações no seu ambiente por meio de alterações morfológicas e funcionais. A adaptabilidade humana, diz, portanto, respeito ao êxito ecológico, avaliado por meio de critérios demográficos, energéticos ou nutricionais (Morgan, 1994).

Desde muito cedo na história do *Homo sapiens*, os recursos provenientes do meio aquático eram vistos como um recurso acessível, representando uma fonte nutritiva, rica em proteína (Nash, 2011).

Estudos arqueológicos indicam que foi durante o período paleolítico, aquando a revolução cognitiva (70.000-50.000 anos atrás), que começaram a haver os primeiros vestígios de existência da prática pesqueira, sendo esta, em conjunção com a caça e a recolção, uma das principais funções humanas, para a obtenção de alimento (Sainsbury, 1986; Harari, 2014). O início do período neolítico (12.000-10.000 anos atrás) dá-se com a revolução agrícola e origem do sedentarismo. Nesta altura as populações humanas tendem a acomodar-se num território, sendo os territórios mais próximos de zonas litorais e fluviais, tendencialmente mais populosos, devido à grande concentração de recursos proteicos provenientes do meio aquático (Morgan, 1994; Harari, 2014). A transição para a agricultura levou o Homem a domesticar espécies animais e vegetais, de modo a produzir o seu próprio alimento, e é na China (há cerca de 4.000 anos atrás) que se começa a produzir organismos aquáticos. Sendo então a prática da aquacultura originária da China, com recurso a "*Roman Vivariae Piscines*", conhecidas mais tarde como viveiros (figura 1.1), e desde aí, através de avanços técnicos e científicos, a aquacultura chegou ao crescimento expansivo e à globalização dos dias de hoje (séc. XXI) (Nash, 2011; Jancsary, 2017).



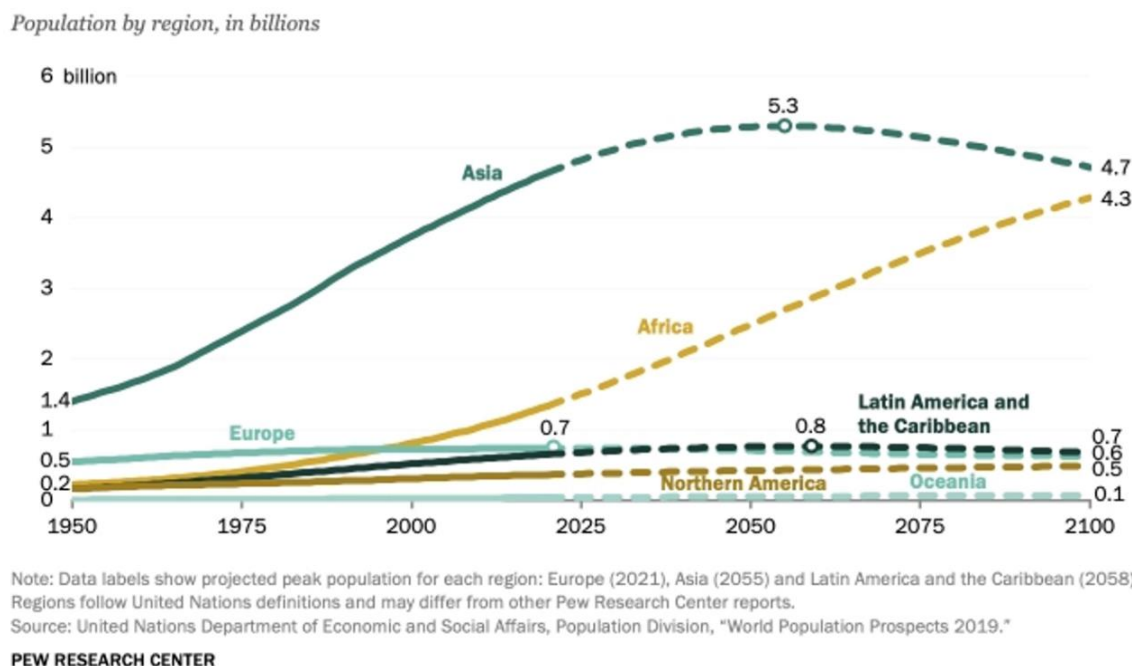
**Figura 1.1:** Louis-Joseph Yperman: La pêche au vivier, 1910, baseada numa obra original de 1343 - 1344. Câmara do Cervo, Palácio dos Papas de Avinhão. Crédito: © RMN-Grand Palais/Martine Beck-Coppola. Fonte: <https://www.photo.rmn.fr/archive/92-005160-2C6NU0>

Ao longo dos anos tem havido várias definições para o termo aquacultura. Segundo a FAO (1997; 2011), a aquacultura define-se como sendo o cultivo de organismos aquáticos incluindo peixes, moluscos, crustáceos, plantas aquáticas, entre outros organismos aquáticos. Implicando esta prática, intervenções que visam um aumento e melhoria da produção, para além das suas capacidades naturais, como um repovoamento regular, contínua disponibilidade de alimento, proteção contra predadores, etc.

### ***1.1. O Crescimento da população mundial, o aumento da demanda global por alimentos e a procura de pescado como fonte de proteína***

No decorrer do último século a população mundial sofreu um crescimento bastante significativo. Em 1915, existiam cerca de 1,8 biliões de habitantes em todo o globo. Hoje, de acordo com o último relatório *World Population Prospects*, publicado pela Organização das Nações Unidas (ONU), em 2019, o número de habitantes é de aproximadamente 7,7 biliões. Este facto levanta, nos dias de hoje, sérios desafios para o futuro no que diz respeito ao fornecimento de alimentos de alta qualidade e alimentação rica em nutrientes, altura em que será necessário alimentar uma população que, segundo os últimos dados

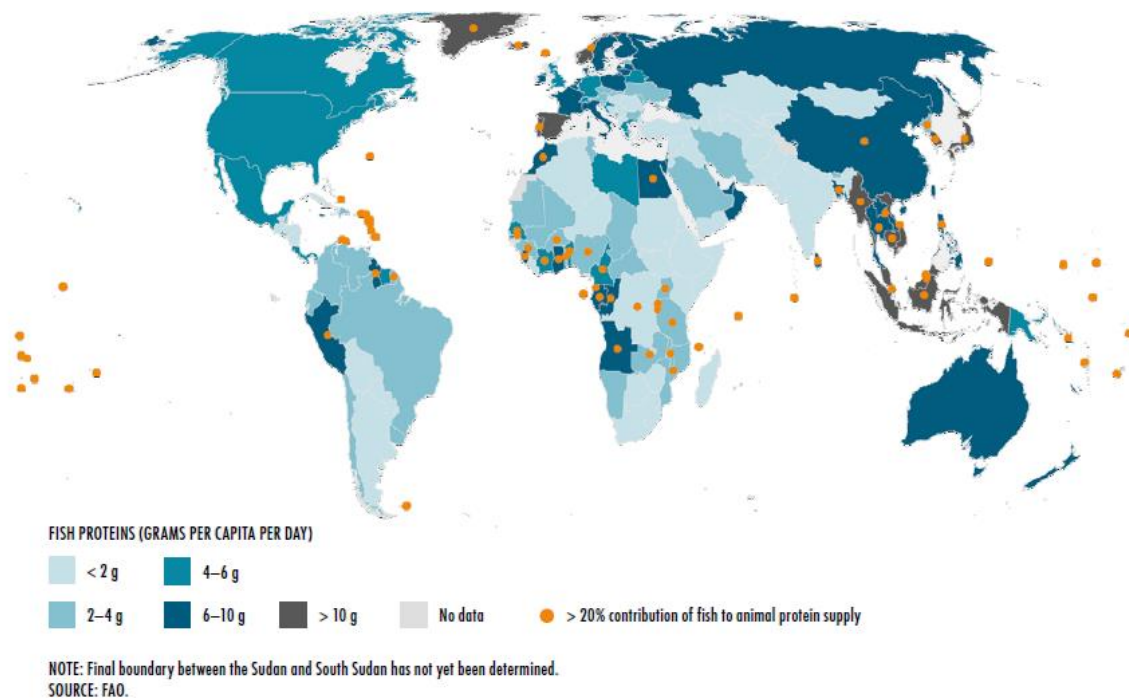
das projeções de variante média, poderá chegar aos 8,5 bilhões em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e, até ao final do decorrente século, 10,9 bilhões de pessoas (figura 1.2).



**Figura 1.2:** Modelo de projeção do crescimento da população mundial, por regiões (América Latina e Caraíbas, América do Norte, África, Ásia, Europa e Oceânia) até 2100. Fonte: <https://www.pewresearch.org>.

Este crescimento, adjacente ao aumento da esperança média de vida e crescente tendência do aumento dos rendimentos em países em desenvolvimento, provocam o aumento da demanda global por alimentos, que se espera aumentar entre 59 a 98% até 2050, e, por conseguinte, a crescente procura por nutrientes de qualidade (ONU, 2019).

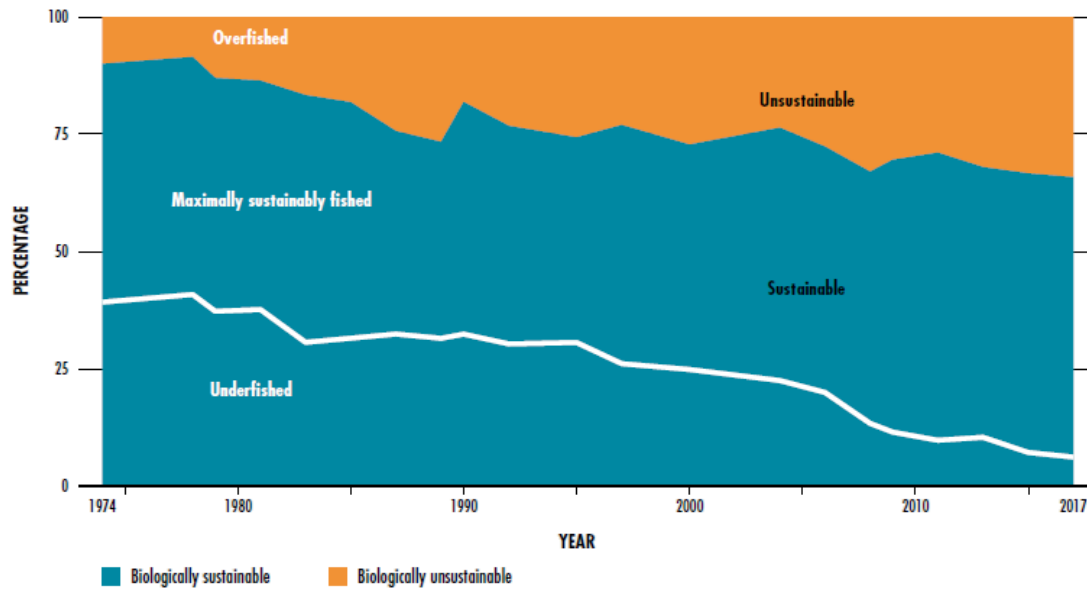
Acompanhando esta tendência, o consumo global de pescado para alimentação humana aumentou em média 3,1% por ano, desde 1961 até 2017, representando aproximadamente o dobro da taxa anual de crescimento populacional para o mesmo período de tempo. Este ultrapassa, inclusivamente, o consumo de todas as outras fontes de proteína animal (carne, laticínios, leite, etc.), que contaram com um aumento médio anual de 2,1%. Este aumento traduz-se num incremento no consumo *per capita* de pescado de 9,0 kg (equivalente a peso vivo), em 1961, para 20,5 kg, em 2018, um crescimento aproximado de 1,5% ao ano. Em 2017, o consumo de pescado representou 17% da ingestão de proteína de origem animal e 7% de todas as proteínas consumidas. Globalmente, o pescado é responsável por 20% da ingestão *per capita* de proteínas de origem animal (figura 1.3) (FAO, 2020).



**Figura 1.3:** Contribuição do pescado como fonte de proteína animal para a população mundial, valores médios 2015 – 2017. Fonte: FAO - *The State of World Fisheries and Aquaculture* (2020).

Segundo estudos da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), publicados em 2017, o consumo de pescado irá continuar a aumentar, fazendo face à produção de animais terrestres para consumo humano. É expectável que, no início da corrente década (2020), se atinjam os 25 kg *per capita*. Esta tendência deve-se a práticas alimentares mais saudáveis e sustentáveis, nomeadamente, à compreensão por parte das populações mais desenvolvidas e com maior poder de compra, de que a inclusão do pescado na dieta do dia-a-dia é saudável e acarreta tanto benefícios para a saúde, como também está associada a práticas de produção mais sustentáveis face à produção de proteína proveniente de animais terrestres (Lund, 2013).

Com os *stocks* pesqueiros considerados biologicamente sustentáveis a sofrer uma diminuição de 26,9%, desde 1974 até 2017, a exploração dos *stocks* biologicamente insustentáveis a aumentar 34,2% até então (figura 1.4) e a população em constante crescimento para ser alimentada, torna-se cada vez mais importante a implementação de regulamentos e medidas de conservação dos recursos da pesca (DGRM, 2020; FAO, 2020), havendo como solução a produção destes recursos em aquacultura.



SOURCE: FAO.

**Figura 1.4:** Tendência dos stocks pesqueiros marinhos a nível global desde o ano 1974 até 2017. Fonte: FAO - *The State of World Fisheries and Aquaculture (2020)*.

Com as capturas a variar entre 86 e 93 milhões de toneladas por ano, desde o final da década de 80 (devido à sua sobre-exploração), e a aquacultura a sofrer um crescimento exponencial desde o início da mesma década, a aquacultura passou a ser vista como um meio sustentável de garantir o abastecimento de pescado e proteína animal à crescente população. A partir de 2014, começou, inclusivamente, a contribuir mais para esse efeito, do que a própria pesca (FAO, 2020; Lem *et al*, 2014).

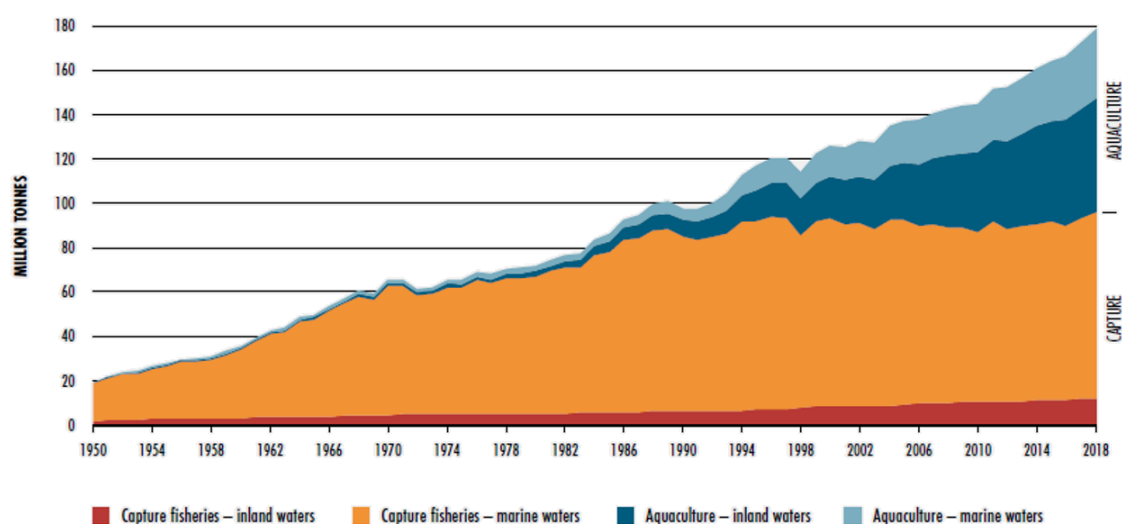
## 1.2. Panorama mundial da aquacultura

A aquacultura é o setor de produção alimentar com maior rapidez de crescimento no mundo, estando a desenvolver-se, a expandir-se ou a intensificar-se em quase todas as regiões do planeta (FAO, 2018a; Subasinghe *et al.*, 2009).

Na sua maioria, as produções originárias de países em desenvolvimento são realizadas em regime extensivo ou semi-intensivo, muitas vezes utilizando técnicas de policultura. Em contraste estão as produções da maioria dos países desenvolvidos, que se baseiam numa produção intensiva de organismos com maior valor de mercado (Eurostat, 2020; Hasan, 2001).

A produção global de pescado proveniente de aquacultura cresceu exponencialmente durante as últimas décadas, chegando aos 46% (com a China a contribuir com 16,3% da produção) em 2018, face aos 25,7% (com a China a contribuir com 13% da produção) no início do novo milénio (FAO, 2020)

De acordo com a mais recente edição do *The State of World Fisheries and Aquaculture*, publicado pela FAO em 2020, a produção mundial em aquacultura atingiu, em 2018, o recorde das 114,5 milhões de toneladas (equivalente a peso vivo) (Figura 1.5), o correspondente a 263,6 biliões de USD, sendo 82,1 milhões de toneladas (250,1 biliões de USD) referentes a animais aquáticos, 32,4 milhões de toneladas de algas (13,3 biliões de USD) e 26 mil toneladas de matérias ornamentais, como conchas e pérolas (179 mil USD). Nesse mesmo ano, 39 países representantes de todas as regiões do globo, com exceção do conjunto que forma a Oceânia, produziram mais pescado do que capturaram.



NOTE: Excludes aquatic mammals, crocodiles, alligators and caimans, seaweeds and other aquatic plants.  
SOURCE: FAO.

**Figura 1.5:** Evolução da produção da pesca e da aquacultura desde 1950 até 2018. Fonte: FAO - *The State of World Fisheries and Aquaculture* (2020).

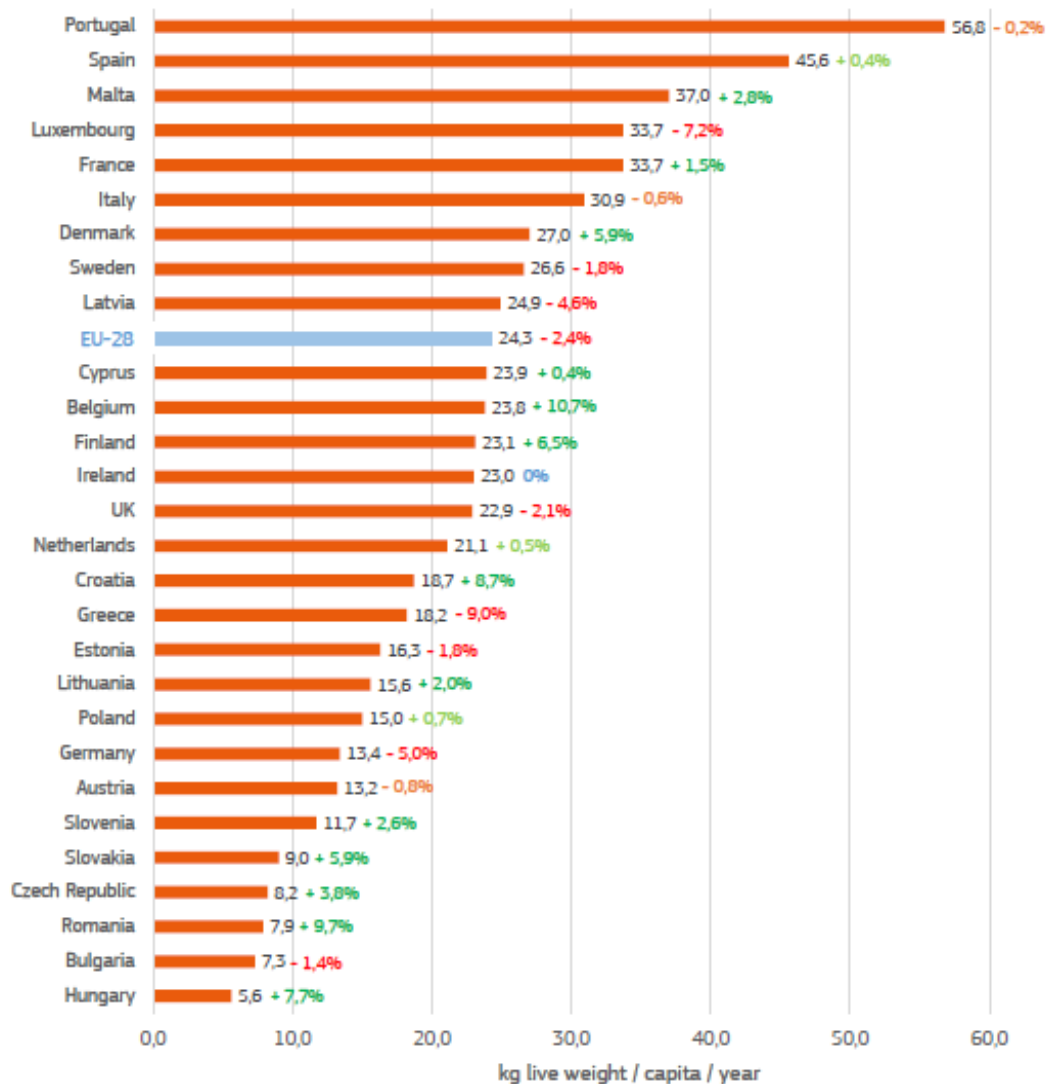
A produção mundial de animais aquáticos é dominada pela Ásia, com um contributo de 89% referente às duas últimas décadas. Estes números devem-se, maioritariamente, à República Popular da China, que desde 1991 contribui com uma produção superior ao resto do mundo, tornando-se, desde então, o maior país produtor em aquacultura. Acompanhando o crescimento da produção asiática, também os continentes africano e americano demonstraram um crescimento significativo para o mesmo período de tempo,

contrariamente à Europa (excluindo a Noruega) e Oceânia, que tenderam a baixar a sua produção.

É esperado que a procura por alimentos provenientes da aquacultura não pare de aumentar (FAO, 2018a), impulsionando, desta forma, o crescimento da produção mundial de pescado para consumo humano. Estima-se que em 2030 a produção de pescado possa rondar os 190 milhões de toneladas (World Bank, 2013), com o continente asiático em constante expansão económica, e a consumir cerca de 70% da produção. Este valor será manifestamente insuficiente para fazer face às conseqüentes necessidades causadas pelo aumento da procura, originando uma lacuna no fornecimento de pescado, sendo, desta forma, imprescindível criar estratégias económicas e políticas eficazes, que equilibrem a oferta e a procura deste tipo de produtos. Algumas destas estratégias passam pela expansão e diversificação das produções, sendo previsível que haja um acréscimo do seu valor nos próximos anos (Cai & Leung, 2017).

### **1.3. Produção em aquacultura em Portugal**

A história e a localização geográfica de Portugal, liga a sua população ao mar e ao que dele provém, tornando-o num país com uma grande tradição no consumo de pescado. Portugal é, de longe, o país mais relevante da União Europeia (UE) no que diz respeito ao consumo *per capita* de pescado. Segundo a mais recente edição do *The EU Fish Market*, em 2017, tinha um consumo aparente de 56,8kg *per capita* por ano, valor significativamente superior ao do consumo médio na UE (24,3kg/*capita*/ano) (Figura 1.6).



**Figura 1.6:** Consumo per capita aparente de produtos da pesca e da aquacultura por estado-membro referentes aos ano 2017 e % de variação entre os anos 2016 e 2017. Fonte: EUMOFA - *The EU Fish Market* (2019).

No entanto, Portugal, tal como a restante UE, importa grande parte do pescado que consome (cerca de 75% do pescado consumido em Portugal é importado, perfazendo um total de 421 934 toneladas de pescado importado em 2019), não sendo, portanto, a sua produção interna suficiente para satisfazer as necessidades existentes. As exportações (214 928 toneladas de pescado exportado em 2019), a procura interna por parte da população (aproximadamente 600 000 toneladas de pescado foi consumido pela população portuguesa em 2019) e o crescente preço (INE, 2020), justificam provavelmente a diminuição de 0,2% no consumo *per capita* apresentado na figura 1.6.

Esta realidade torna a economia portuguesa do pescado instável para a balança comercial do produto que, de acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), referentes a 2019, acumula um défice superior a 1100 milhões de euros.

A aquacultura é uma atividade relativamente recente no país, quando comparada com a produção de animais terrestres e com as pescas.

Antes da entrada de Portugal para a então designada Comunidade Económica Europeia (CEE), a produção aquática nacional era baseada em produções extensivas, com maior incidência na produção de bivalves. Após a sua entrada na CEE e com a atribuição de fundos para a incrementação da produção, o setor, não só se tornou mais diversificado em espécies produzidas, como também expandiu os métodos de produção um pouco por todo o território, reaproveitando muitas vezes antigas salinas para produções aquáticas em regime semi-intensivo, o que levou a um aumento acentuado da produção nacional. Este aumento promoveu um recorde de produção de 14,5 mil toneladas em 1986 face às 203 toneladas registadas em 1974 (Eurostat, 2020). No entanto, o setor não evoluiu o que era esperado, não ultrapassando uma produção anual de 12 mil toneladas desde 1986, até 2017, sofrendo um aumento significativo de 11,5% apenas em 2018, que gerou uma receita de 96,8 milhões de euros, aumentando assim 18,7% face ao ano anterior. Estes valores demonstram que, com as restrições da pesca extrativa a aumentarem, o setor cada vez mais é visto como uma atividade estratégica para a economia nacional, devido à sua posição de excelência no que diz respeito à sua localização geográfica (Eurostat, 2020), sendo cada vez mais importante a implementação de medidas para a sua expansão.

Apesar da sua baixa produção, Portugal, face aos restantes países da UE, apresenta uma aquacultura bastante diversificada, dispondo o consumidor final de um leque abrangente de espécies que chegam ao seu prato (INE, 2020).

Ainda que seja um país versátil no que diz respeito ao número de espécies produzidas, a produção portuguesa é liderada pela produção de moluscos e crustáceos, que representou 67,2% da produção aquática total em 2018, seguindo-se a produção de peixes em águas de transição e marinhas com apenas 27,6% da produção total, dentro da qual 90% foi constituída pela produção de pregado (*Scophthalmus maximus*) e dourada (*Sparus aurata*), deixando apenas 5,2% para outras espécies (INE, 2020).

Segundo as últimas prospeções do INE para as vendas da aquacultura portuguesa nos o mercados nacional e internacional, as espécies com maior valor económico são o linguado (*Solea senegalensis* e *Solea solea*) e as amêijoas (*Ruditapes decussates*, entre outras) (12,80 e 12,84 €/kg respetivamente), seguindo-se a corvina-legítima (*Argyrosomus regius*) (11,12 €/kg), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (8,80 €/kg), o pregado (*Scophthalmus maximus*) (8,05 €/kg), e a dourada (*Sparus aurata*) (5,86 €/kg). No entanto, nem todas estas espécies têm uma grande contribuição para a totalidade da produção nacional, estando, por exemplo, a corvina-legítima englobada nos 5,2% da maioria das espécies produzidas, contando com um contributo de apenas 0,14% para a produção total.

## **1.4. Corvina-legítima, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801)**

### **1.4.1. A espécie**

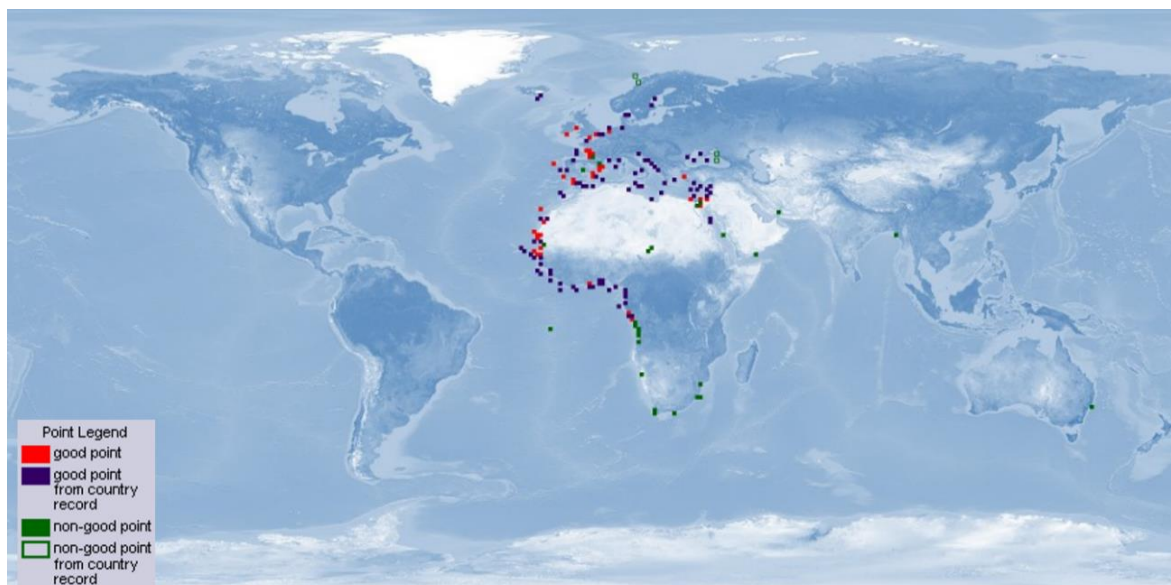
Euritérmico, anádromo, semi-pelágico e de tendência demersal, que habita o sublitoral dos 15 aos 200 metros em fundos arenosos ou rochosos, podendo por vezes ser encontrado em pradarias marinhas de posidónia (Cárdenas, 2010; Griffiths & Heemstra, 1995; Quero & Vayne, 1987), a corvina-legítima (*Argyrosomus regius* (Asso, 1801)) (figura 1.7), é um dos maiores teleósteos marinhos do mundo e umas das cinco espécies da família Sciaenidae que estão presentes em águas europeias (González-Quirós *et al.*, 2011; Griffiths & Heemstra, 1995; Whitehead *et al.*, 1986).



**Figura 1.7:** Corvina-legítima (*Argyrosomus regius* (Asso, 1801)). Fonte: FAO - *Cultured aquatic species fact sheets*.

Atualmente este ceniídeo costeiro distribui-se por toda a costa oeste do oceano atlântico norte, ocorrendo desde o Canal da Mancha até ao Senegal, incluindo a parte oriental do mar mediterrâneo e o mar negro (Figura 1.8) (Griffiths & Heemstra, 1995; Poli *et al.*, 2003;

Whitehead *et al.*, 1986). Apesar de ser considerada uma espécie inserida na categoria de risco mais baixa (pouco preocupante) da lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) (Pollard & Bizsel, 2020), no passado, a sua distribuição estendia-se mais a norte, abrangendo todo o mar do norte e, mais a ocidente do mar mediterrâneo (Quéméner, 2002; Wolff, 2000).



**Figura 1.8:** Distribuição geográfica de corvina-legítima com base no cenário de emissões do IPCC RCP 8.5. Fonte: <https://www.aquamaps.org>.

Durante a migração no período reprodutivo, que ocorre em meados de abril durante a primavera, os indivíduos já maduros deslocam-se em pequenos grupos em direção às zonas costeiras. No final do mês de maio inicia-se a época de desova, que ocorre já dentro das zonas estuarinas, onde permanecem até ao final da mesma (Cárdenas, 2010). Esta transição só é possível graças à elevada tolerância por parte desta espécie no que diz respeito a variâncias de temperatura (2-38 °C) e salinidade (5-39) (Duncan, 2013). Após a desova a meados de junho, os indivíduos adultos abandonam os estuários e permanecem até ao fim de julho ao longo da costa para se alimentarem, permanecendo em águas mais baixas até ao início do outono (Abou Shabana *et al.*, 2012). Durante o inverno os adultos regressam a águas mais profundas para a zona de alimentação (Quéméner *et al.*, 2002).

Os novos juvenis, ao abandonarem as zonas de maternidade dos estuários no final do verão, migram para as zonas costeiras, onde permanecem durante o inverno, regressando para as zonas de alimentação estuarinas em meados de maio, processo que realizam até atingirem uma idade compreendida entre os 2 e os 3 anos, antes de migrarem para zonas de alimentação *offshore* (Stipa & Angelini, 2005).

A temperatura da água é o fator mais importante no que diz respeito à determinação das migrações tróficas e da reprodução desta espécie (Kir *et al.*, 2017; Monfort, 2010). A chegada dos indivíduos adultos e a partida dos juvenis dos estuários dos rios ocorre em maio e outubro, quando a temperatura está compreendida entre os 13 e os 14 °C. O seu crescimento ótimo em meio selvagem ocorre quando a temperatura da água se encontra entre os 17 e 23 °C, sendo que a desova também ocorre entre este leque de temperaturas (Stipa & Angelini, 2005).

Em meio selvagem a maturação sexual acontece entre os 4 e os 5 anos, podendo uma fêmea com 120 cm colocar cerca de 800 000 ovos (Haffray *et al.*, 2012; Monfort, 2010; Prista *et al.*, 2007). A vida pelágica das larvas é extremamente reduzida, uma vez que juvenis com 3,7 cm já são encontrados em fase bentónica (Stipa & Angelini, 2005).

É uma espécie carnívora e de extrema voracidade (Jiménez *et al.*, 2005). As larvas, após a abertura da boca, praticam uma alimentação à base de zooplâncton e necessitam de temperaturas acima dos 20 °C para se desenvolverem. Os juvenis alimentam-se de pequenos peixes demersais e crustáceos e, quando atingem os 30-40 cm, começam a praticar uma alimentação à base de organismos pelágicos, como peixes e cefalópodes, à semelhança dos indivíduos adultos (Stipa & Angelini, 2005).

De entre as cinco espécies de cienídeos existentes na Europa e em Portugal, a corvina-legítima é a que atinge maiores dimensões, podendo atingir máximos de 230cm de comprimento total e chegar aos 100kg (Quéméner, 2002). É uma espécie de crescimento rápido e apresenta uma taxa de fecundidade alta. Estas características, agregadas ao seu valor comercial e à sua alta adaptabilidade a diferentes condições e ecossistemas, tornam a espécie particularmente valiosa para pescadores e caçadores recreativos em pequena escala, tornando-a também uma ótima candidata para produção em aquacultura (Quéméner *et al.*, 2002; Quéro *et al.*, 1987; Prista *et al.*, 2008).

#### **1.4.2. Produção em aquacultura**

Devido à sua ótima adaptabilidade a variações de temperatura e salinidade, rápida taxa de crescimento, fecundidade e de conversão alimentar, alta qualidade do músculo no que diz respeito à sua textura e sabor e elevado valor nutricional, agregados ao seu elevado valor comercial (Cárdenas, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 2013; Estévez *et al.*, 2011; Monfort, 2010; Parisi *et al.*, 2014; Suquet *et al.*, 2009), a corvina-legítima tem sido

proposta como uma excelente candidata para a diversificação da aquicultura do mediterrâneo (Chatzifotis *et al.*, 2012; Duncan *et al.*, 2013; El-Shebly *et al.*, 2007; Monfort, 2010; Quéméner *et al.*, 2002; Saavedra *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015).

A sua produção em sistemas de aquicultura teve o seu ponto de partida na Europa, na segunda metade da década de 90, após um acordo entre produtores franceses e italianos, tendo sido a França a dar início à primeira produção comercial desta espécie (Monfort, 2010; Quéméner, 2002).

Nos dias de hoje, a produção de corvina-legítima é levada a cabo por vários países ao longo de toda a área do mediterrâneo, nomeadamente a França, Itália, Espanha, Portugal, Grécia, Turquia, Egito, Malta e Croácia (Ribeiro *et al.*, 2013).

Esta espécie começou a ser estudada e reproduzida na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) em 2006. E desde então têm sido realizados inúmeros trabalhos sobre reprodução, cultivo larvar, cultivo de juvenis em diferentes sistemas, nutrição para as diferentes fases de cultivo, patologia, bem-estar, processos bioquímicos e metabólicos, entre outros (Barata *et al.*, 2016; Matias *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2015).

As unidades de reprodução produzem ovos provenientes de *stocks* de reprodutores, rigorosamente selecionados para o efeito, sob condições estritamente controladas, de modo a garantir a qualidade da descendência. Uma fêmea, pertencente a um *stock* de reprodutores, com 1 metro de comprimento, pode produzir mais de 1 milhão de ovos, com um diâmetro inferior a 1mm, num ano.

À semelhança dos procedimentos realizados na EPPO (Figura 1.9), nas unidades de maternidade, onde os ovos são postos a eclodir, faz-se um acompanhamento diário das larvas que, durante o seu primeiro mês de vida, após a abertura da boca, se alimentam de organismos vivos como rotíferos (*Brachionus plicatilis*) e artémia (*Artemia sp.*), até iniciarem uma alimentação exclusivamente inerte, que é formulada a partir de matérias-primas naturais, como óleos e farinhas de peixe.

Quando atingem as 15g, os animais são transferidos para unidades de engorda, onde recebem alimentação várias vezes por dia, de modo a prevenir o canibalismo entre indivíduos. A frequência de alimentações diminui à medida que os animais vão crescendo,

chegando a uma única alimentação por dia, que corresponde a 1-2% do seu peso corporal (Cárdenas, 2010; Duncan *et al.*, 2013).

Apesar de ser uma espécie que cresce substancialmente mais rápido, podendo atingir 1 kg em 12 meses, as técnicas de produção de corvina-legítima são efetuadas à semelhança das técnicas utilizadas para a produção de dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*), tanto em estabelecimentos terrestres, como em produções *offshore*, um pouco por falta de informação específica para esta espécie.



**Figura 1.9:** Ciclo de produção de corvina-legítima (*A. regius*), contemplando a dieta utilizada em cada fase, na EPPO. 1 – Dieta composta por ração, pequenos pelágicos ou cefalópodes; 2- Reservas vitelinas (sem necessidade de fornecimento de alimento); 3 – Dieta composta por rotíferos; 4 – Dieta composta por rotíferos, artémia e microdieta; 5 – Dieta composta por artémia e microdieta; 6 – Dieta composta por microdieta; 7 – Dieta composta por ração. Fonte: IPMA/EPPO.

Segundo o último relatório da APROMAR, a produção de corvina-legítima na área do mediterrâneo foi estimada em 41 295 toneladas em 2019, representando um crescimento de 10,5%, comparativamente com 2018. Os países que mais contribuíram para estes valores foram o Egito, com uma produção de 32 000 toneladas, Espanha, com 3 650 toneladas, Turquia, com 2 600 toneladas e a Grécia, com 1 800 toneladas. É espetável que em 2020 a produção de corvina-legítima ultrapasse as 42 000 toneladas, somando um acréscimo de mais de 2,8% face a 2019.

Nas regiões onde é tradicionalmente consumida, esta espécie tem um alto valor comercial e, por norma, é vendida inteira com 1 a 4 kg, sendo também uma ótima candidata para a indústria de filetagem, devido às suas dimensões (Monfort, 2010).

Tal como tantas outras espécies, a corvina-legítima também apresenta desvantagens na sua produção. Para além do défice de estudos científicos, comparativamente com espécies como a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*), esta espécie apresenta taxas de crescimento muito variáveis (que resultam numa diminuição do rendimento da produção) (Duncan, 2013), todas as doenças que estão associadas à sua produção (Merella *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2018; Ternengo *et al.*, 2010), a baixa variabilidade genética por parte dos *stocks* de reprodutores selvagens (devido à limitação dos locais de desova em meio selvagem) (Haffray *et al.*, 2012) e a expansão do mercado de produtos de aquacultura derivado da diversificação do setor nas últimas décadas (Froehlich *et al.*, 2017).

### **1.5. Alimentação e nutrição em aquacultura**

A nutrição desempenha um papel fundamental em aquacultura, uma vez que tem influência no crescimento, saúde e qualidade dos peixes (Lovell, 1998a).

Para que seja possível a produção de pescado de qualidade, numa altura em que metade da produção mundial se baseia na administração de dietas artificiais, é crucial ter um conhecimento aprofundado dos requisitos nutricionais de cada espécie, garantindo que os animais têm acesso a nutrientes de qualidade e que melhor se adequam às suas necessidades. Por isso, é de extrema importância o crescente investimento que tem sido aplicado nos últimos anos em investigação na área da nutrição em aquacultura, que é considerada um pilar para o setor.

A produção em aquacultura pode ser classificada, quanto ao fornecimento de alimento aos animais, como uma produção “não-alimentada” ou “alimentada”. A produção “não-alimentada” consiste naquela em que os organismos conseguem obter alimento no próprio meio de produção. Por norma, este método é utilizado em regime extensivo, desde que o meio consiga suportar este tipo de produção.

Já a produção “alimentada” é geralmente realizada nos regimes semi-intensivo e intensivo, sendo, dentro do setor, a aquacultura intensiva a que atinge as melhores taxas de

crescimento que, de um modo geral, envolve alimentar os animais com formulações de dietas artificiais nutricionalmente completas e especializadas (Tacon & Metian, 2015).

As dietas em aquacultura têm, desde sempre, contado com concentrações bastante elevadas de óleos e farinhas de peixe, que são fontes eficientes na suplementação de lípidos (especialmente rica em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa do tipo ómega-3) e proteína, respetivamente. No entanto, a obtenção destas matérias-primas depende muito da captura de pequenos peixes pelágicos, de onde são extraídas (Hua *et al.*, 2019).

Como referido anteriormente, durante as últimas décadas, assistiu-se a um crescimento exponencial do setor da aquacultura e, infelizmente, a uma procura intensiva por este tipo de produtos, que contribuiu bastante para a pressão dos *stocks* pesqueiros (Froehlich *et al.*, 2018), levantando cada vez mais questões sobre a sustentabilidade deste setor e preocupações futuras, no que diz respeito à preservação das teias alimentares nos mares e oceanos, uma vez que 10% das capturas têm como fim a produção de dietas para aquacultura (FAO, 2018b).

Face a este problema, a utilização de farinhas e óleos de peixe para a aquacultura tem diminuído mesmo com o setor em grande expansão. No entanto, estes elementos ainda são componentes indispensáveis para muitas espécies (Auchterlonie, 2018; Shepherd & Jackson, 2013), e, num futuro próximo, não serão capazes de acompanhar o crescimento da indústria. Por isso, é de extrema importância encontrar alternativas que reduzam o impacto ambiental, social e económico, tornando a aquacultura numa indústria cada vez mais sustentável (Cai & Leung, 2017; World Bank, 2013).

A nutrição em aquacultura, nos dias de hoje, já desempenha uma contribuição vital no desenvolvimento sustentável do setor. O principal objetivo da nutrição neste setor é garantir que as dietas são compostas por porções de diferentes ingredientes, minimizando a inclusão dos óleos e farinhas de peixes, até um limite considerado saudável e que não reduza o crescimento dos animais.

### **1.5.1. Proteínas**

As proteínas estão no centro da maioria dos processos biológicos (Senior *et al.*, 2020). São das moléculas orgânicas mais abundantes em sistemas vivos e, com a mais diversificada forma estrutural e funcional dentro da classe das macromoléculas (Raven *et al.*, 2011). Detêm, na sua composição, C (50 - 55%), O (20 - 23%), N (15 - 18%), H (6 - 8%), S (0 - 4%) e P (0 - 4%), e, apesar de serem muito similares na sua composição molecular, a percentagem nestes átomos é bastante variável, formando ligações diferentes entre si (Jobling, 1994; Jobling, 2011).

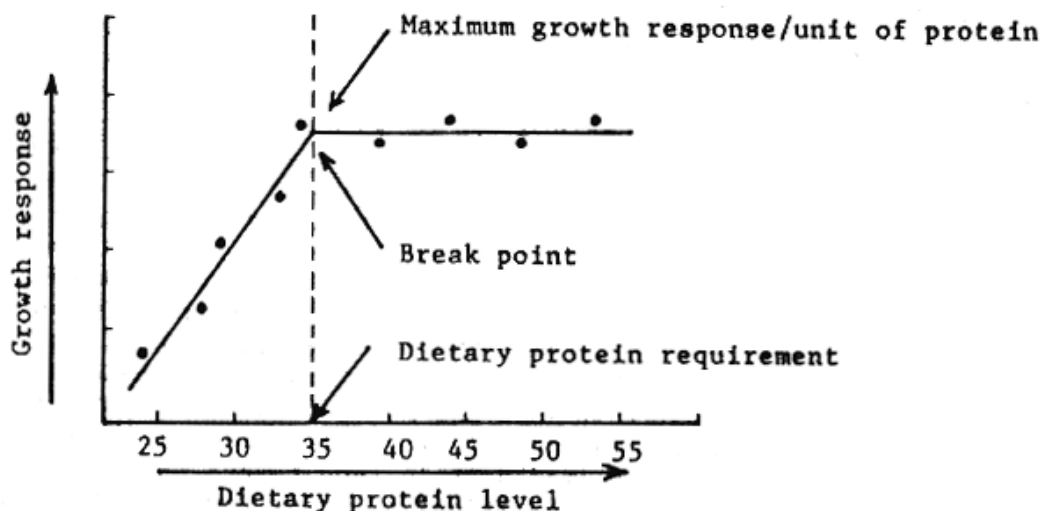
São constituídas por 20  $\alpha$ -aminoácidos que se interligam entre si pela ação de ligações peptídicas, formando sequências de aminoácidos que se cruzam através de pontes dissulfeto, pontes de hidrogénio e interações de *Van der Waals*, ditando a função e estrutura de cada proteína (NRC, 2012).

É a presença e o teor dos diferentes aminoácidos, em especial dos que formam proteínas alimentares, que determinam a qualidade da proteína (Becker, 2007). As proteínas que compõem as farinhas de peixe apresentam um equilíbrio de aminoácidos que melhor se adaptam às necessidades dos peixes em cativeiro. No entanto, dependendo da sua qualidade, conteúdo, proporção, disponibilidade e origem, este equilíbrio pode variar consideravelmente (NRC, 1993).

Quanto à sua função, as proteínas alimentares, podem ser catabolizadas como fonte de energia, ou podem servir de substrato para a formação de tecidos, hidratos de carbono ou lípidos. Estas também estão envolvidas no processo de formação de hormonas, enzimas, anticorpos, hemoglobina, entre outras substâncias biologicamente importantes (Tacon, 1987).

Na sua grande maioria, os estudos efetuados para avaliar os requisitos proteicos de espécies produzidas em aquacultura são derivados de ensaios laboratoriais em pequena escala, onde os animais são mantidos em ambientes altamente controlados (Tacon, 1987).

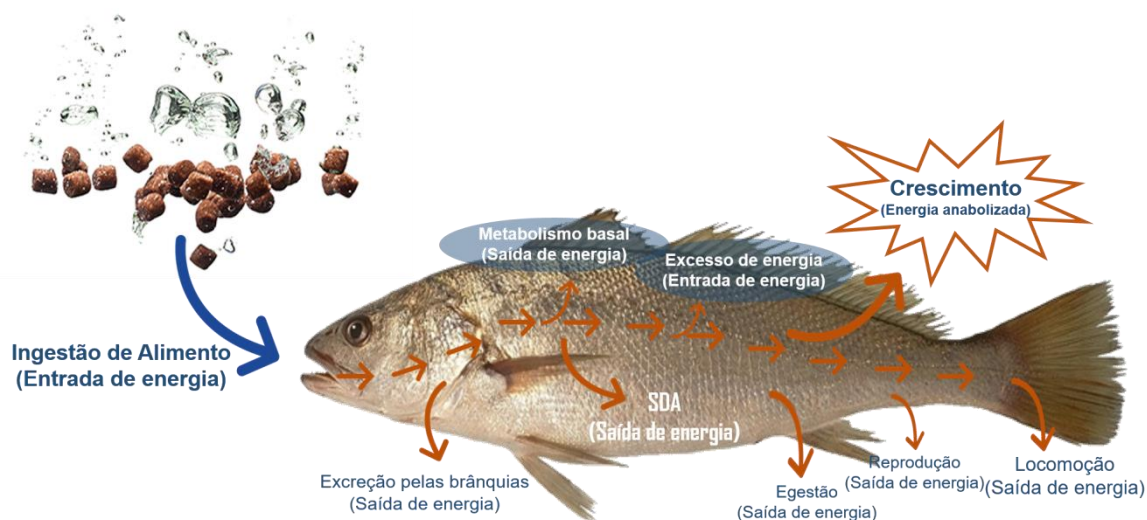
Segundo o *National Research Council* (NRC) (1993), os requisitos de proteína necessários para que se atinga o crescimento máximo em peixes, são representados pela quantidade mínima da mesma, de modo a satisfazer as necessidades em aminoácidos por parte do organismo (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Exemplo de curva dose-resposta para definir o requisito proteico de um determinado organismo. Fonte: FAO - *The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp*

Normalmente, estes requisitos são obtidos através do fornecimento gradual de vários níveis proteicos e a resposta é geralmente medida em termos de crescimento, medição de tecidos ou acumulação do nutriente na composição bioquímica do corpo (Jobling, 2016).

Um déficit na inclusão de proteína na dieta leva ao abrandamento do crescimento dos peixes. Por outro lado, o seu excesso faz com que esta seja sintetizada como fonte de energia (Watanabe, 2002), não sendo esse excesso utilizado para o crescimento. A proteína também representa a fonte inicial de N e P, que em demasia se traduz numa maior excreção dos mesmos (Figura 1.11).



**Figura 1.11:** Ilustração do metabolismo energético de um peixe. Fonte: IPMA/EPPO.

Por isso, considerando que a proteína é o elemento mais caro das formulações dietéticas e que representa um dos principais custos de produção, é crucial estabelecer o equilíbrio entre os teores de proteína e energia. Este pode ser feito através da otimização dos valores de proteína bruta (CP) nas dietas (NRC, 2012), o que irá proporcionar um melhor desenvolvimento dos animais e maximizar o lucro da produção, reduzindo gastos na compra de rações e promovendo uma melhor qualidade de água (Mohanta *et al.*, 2007; Thoman *et al.*, 1999).

Em contexto de indústria animal e segundo o regulamento (UE) 2017/1017 da comissão europeia, a proteína é tratada como CP, e pode vir representada como a percentagem que está incluída na totalidade da formulação ou em  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , que corresponde às gramas em CP para cada quilograma de ração.

### **1.5.2. A economia circular como alternativa às farinhas de peixe**

Com o constante crescimento populacional, a aquacultura estabeleceu-se no mundo, para além de uma forma eficiente de fornecimento para os mercados globais, como uma solução para o fornecimento de alimento, desempenhando um papel cada vez mais importante nas dietas das populações (WWF, 2012). Nas últimas décadas, os impactos ambientais provocados por esta prática têm sido alvo de grande discussão, uma vez que o setor que promete uma alternativa aos problemas impostos pela pesca, na realidade depende da mesma.

A grande parte da indústria de produção aquática está totalmente dependente do fornecimento de rações (Tacon & Metian, 2008). Estima-se que a produção de peixes, no final da próxima década seja de aproximadamente 190 milhões de toneladas, um valor 25 vezes superior ao apresentado no início do corrente século. Com este aumento, aumenta também a pressão sobre as alternativas às farinhas de peixe (FP), uma vez que estes ingredientes, para além de preços bastante altos, são cada vez mais escassos (Tacon *et al.*, 2011)

A cultura de espécies carnívoras e omnívoras necessita de grandes quantidades de derivados de peixe selvagem na sua alimentação (Naylor *et al.*, 2000). No entanto, perspetivas recentes apontam para uma redução significativa do recurso à pesca por parte do setor a longo prazo (Oliva-Teles *et al.*, 2015; Tacon & Metian, 2008), tornando-se crucial a continuidade da redução na dependência das FP para a produção de rações,

promovendo um desenvolvimento sustentável das dietas para aquacultura (Oliva-Teles *et al.*, 2015) e abrindo portas à economia circular.

Segundo Homrich *et al.* (2018), a economia circular é vista como um ideal para fazer face às crescentes limitações dos recursos naturais do planeta, caminhando em direção à produção e consumo sustentáveis.

A classificação das características da economia circular, segundo a Agência Ambiental Europeia é categorizada em 5 pontos (Manninen *et al.*, 2018):

1. Menor utilização de recursos naturais;
2. Aumento da utilização de recursos e energias renováveis e recicláveis;
3. Redução de emissões;
4. Menos perdas materiais;
5. Valorização dos produtos, componentes e materiais na economia.

Uma das formas de aplicar a economia circular em aquacultura é transformar os resíduos da produção animal, agrícola e da pesca, em matérias-primas que podem ser aplicadas na formulação de rações (Couto *et al.*, 2016; Moura *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2015; Zaman, 2015).

### **1.5.2.1. Fontes alternativas**

As potenciais fontes alternativas às farinhas de peixe incluem fontes de proteína vegetal, proteínas unicelulares, proteínas de insetos ou proteínas derivadas de subprodutos de animais terrestres (NRC, 2012).

#### **1.5.2.1.1. Proteínas vegetais**

Os ingredientes de origem vegetal são as fontes de proteína alternativas mais utilizadas na formulação de rações para aquacultura (Couto *et al.*, 2016; Estévez *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2015; Tacon *et al.*, 2011).

Apesar de ser possível uma substituição parcial das FP por estes ingredientes, a sua completa substituição não tem demonstrado resultados positivos no crescimento dos peixes, facto que se deve à carência de aminoácidos essenciais e excesso de fatores anti

nutricionais por parte destas fontes. Assim, pode ser feita uma substituição parcial com valores acima do 50%, agregada a uma suplementação dietética em aminoácidos essenciais, sem que isso prejudique o crescimento dos indivíduos de inúmeras espécies (Ribeiro *et al.*, 2015).

Como fontes de proteína vegetal podem ser encontradas, como por exemplo, as farinhas de soja, que são consideradas as mais eficientes quanto ao fornecimento de proteína, sendo constituídas por moléculas mais estáveis e resistentes, com um preço bastante apelativo, comparativamente às FP (Hernández *et al.*, 2007); as farinhas de colza, que fornecem quantidades consideráveis de proteína, aproximando-se bastante das obtidas pelas FP (Gatlin *et al.*, 2007); As ervilhas, que detêm um ótimo perfil nutritivo, embora pertençam à classe das leguminosas, o que acarreta um conteúdo mais elevado de fatores anti nutricionais (Gatlin *et al.*, 2007); o trigo, cujo subproduto da sua moagem (glúten de trigo) é comumente utilizado em dietas animais, apesar de apresentar um conteúdo em proteína aparentemente limitado, relativamente ao composto acima referido (Gatlin *et al.*, 2007), o que faz com que seja utilizado, por norma, como complemento adjacente a outras fontes de proteína vegetais (Tusche *et al.*, 2012); a farinha de glúten de milho, que contém um elevado teor em proteína bruta e é extremamente digerível, mas tem de ser obrigatoriamente suplementada com lisina, uma vez que o seu conteúdo neste aminoácido é praticamente inexistente (Gatlin *et al.*, 2007).

#### 1.5.2.1.2. *Subprodutos da produção animal*

Para além do aproveitamento de subprodutos de pescado para fazer farinhas, outras fontes como fontes de proteína derivadas de subprodutos de animais terrestres (exceto ruminantes), em especial os subprodutos da avicultura, apresentam inúmeras vantagens, como o seu perfil em aminoácidos (semelhante ao das FP), alta disponibilidade (derivada da grande prevalência desta indústria no mundo) e custo relativamente baixo (uma vez que se tratam de desperdícios da indústria) (Fontinha *et al.*, 2020; Nogueira *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2006)

Existem dois tipos de formulação de subprodutos da avicultura englobadas nas farinhas de aves (FA). Estas podem ser constituídas por carne limpa e pele, com ou sem a inclusão de ossos, onde se exclui a cabeça, as penas, as patas e as vísceras, ou pela inclusão de desperdícios mais abrangentes, que englobam todos os restos das carcaças, excluindo apenas os intestinos (Tacon *et al.*, 2006).

Estas farinhas, para além de não incluírem fatores anti nutricionais (Nogueira *et al.*, 2012), detêm na sua constituição um alto teor proteico. Contudo, carecem de certos aminoácidos essenciais, como lisina, isoleucina e metionina (El-Sayed, 1998), sendo necessária a sua suplementação.

O aproveitamento das partes não comestíveis dos animais para a alimentação de outros animais de produção é uma prática que reverte do século XX. No entanto, em 2001, devido a problemas associados à encefalopatia espongiforme bovina, foi proibida em toda a UE, tendo sido reintroduzida em 2013, pelo regulamento n.º 56/2013 da comissão europeia, onde foram declaradas como sendo seguras para inclusão em dietas destinadas à aquacultura.

Desde então vários estudos que foram feitos quanto à sua eficácia na substituição das FP obtiveram resultados positivos, quando efetuados a diversas espécies como dourada (*Sparus aurata*) (Fontinha *et al.*, 2020; Karapanagiotidis *et al.*, 2019), ou serrano-estriado (*Centropristis striata*) (Dawson *et al.*, 2018). No entanto, alguns deles obtiveram decréscimo no crescimento com níveis de FA elevados (Karapanagiotidis *et al.*, 2019).

Assim sendo, a substituição em parte das farinhas de peixe por farinhas de aves é apontada como uma das abordagens mais viáveis para reduzir a utilização das farinhas de peixe em aquacultura.

#### 1.5.2.1.3. *Outras alternativas proteicas*

Existem inúmeras alternativas proteicas a serem estudadas para dar origem a formulações dietéticas mais sustentáveis. As mais recentes abordagens testam o uso das algas e o uso das farinhas de insetos

O uso de macro e microalgas marinhas em dietas para aquacultura tem vindo a ser estudado nos últimos anos, como forma de encontrar fontes de proteína alternativas, que preencham os défices em aminoácidos deixados pelas proteínas vegetais terrestres.

Estas são compostas por aminoácidos essenciais, hidratos de carbono, lípidos (incluindo ácidos gordos polinsaturados essenciais que não são produzidos por outras fontes vegetais), carotenoides, antioxidantes, imunoestimulantes e compostos antimicrobianos

(Yarnold *et al.*, 2019). Também apresentam altos níveis proteicos, baixo teor lipídico e uma riqueza considerável em vitaminas e minerais (Silva *et al.*, 2015).

Através de uma revisão bibliográfica realizada por Wan *et al.* (2019), foram encontrados mais de 50 estudos com diversas espécies de teleósteos em que o uso de algas, para além de ter aumentado as tendências de crescimento, também melhorou a composição bioquímica, o sistema imunitário e a resistência ao *stress*.

Nos últimos anos, também as farinhas à base de insetos começaram a ser vistas como um potencial substituto às farinhas de peixe, no que toca à alimentação de animais de produção aquática.

Os insetos fazem parte da alimentação de inúmeras espécies de peixes em meio selvagem e são ricos em aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais (Henry *et al.*, 2015).

No entanto, só a partir de 2017 é que foi aprovado pela UE, através do regulamento 2017/893 da comissão europeia, a utilização de insetos como ingrediente para alimentação em aquacultura, onde restringe as espécies a uso à mosca-soldado-negro (*Hermetia illucens*), mosca-doméstica (*Musca domestica*), larva-da-farinha (*Tenebrio molitor*), cascudinho (*Alphitobius diaperinus*), grilo-doméstico (*Acheta domesticus*), grilo-doméstico-tropical (*Gryllobates sigillatus*) e grilo-preto (*Gryllus assimilis*). Contudo, os estudos tendem a focar-se maioritariamente no uso de mosca-soldado-negro (*Hermetia illucens*).

Resultados obtidos recentemente em estudos com esta espécie indicam que uma substituição de até 19% das FP por farinhas deste inseto podem ser feitas e que, uma vez excedidas, provocam uma redução no crescimento dos indivíduos (Guerreiro *et al.*, 2020; Moutinho *et al.*, 2020).

Porém, ainda muito poucas espécies de algas e insetos foram alvo de investigação, sendo os resultados obtidos, até agora, bastantes discrepantes, o que permite concluir que este tema necessita de uma maior atenção para o futuro.

### **1.5.3. O Fator Temperatura**

A temperatura é o fator ambiental que mais influencia os organismos aquáticos (Jobling, 1994).

Por serem organismos poiquilotérmicos, os peixes não são capazes de manter a sua temperatura corporal, através de meios fisiológicos. Por isso, são diretamente afetados pela temperatura do ambiente que os rodeia (Brill *et al.*, 1994), o que interfere diretamente na sua atividade metabólica, taxa de ingestão alimentar e taxa de crescimento (Debnath *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2010).

A resposta por parte dos peixes ao aumento da temperatura é o aumento da ingestão de alimento até ao seu valor ótimo, havendo um decréscimo de ingestão quando este é ultrapassado (Halver & Hardy, 2003), o que promove um conseqüente decréscimo na taxa de crescimento.

Por norma, o aumento da ingestão é sempre associado a um aumento no crescimento dos indivíduos. No entanto, Jobling (1994) reportou que a temperatura à qual os peixes tendem a ingerir mais alimento é superior à temperatura que considerou ótima para a conversão alimentar, demonstrando que a temperatura, para além de ditar a taxa de ingestão de alimento, também delinea o momento em que os peixes o convertem melhor.

Como tal, o fator temperatura é de extrema importância no setor da aquacultura, uma vez que compromete a eficácia das produções (Kir *et al.*, 2017). Tal como temperaturas demasiado baixas, temperaturas demasiado elevadas poderão ter um efeito negativo no desempenho das espécies.

Por norma, todas as espécies de peixes são caracterizadas quanto à sua gama ótima de temperatura, ou seja, quanto ao leque de temperaturas que toleram e a temperatura para a qual demonstram o seu crescimento máximo (Brett & Groves, 1979; Person-Le Ruyet *et al.*, 2006).

Sabe-se que a corvina-legítima, devido à sua distribuição geográfica é encontrada em águas cuja temperatura varia entre os 16 e os 25 °C (Duncan *et al.*, 2013).

No entanto, o conhecimento dos requisitos de temperatura para a cultura da espécie em estudo (*Argyrosomus regius*), ainda são muito limitados. Na EPPO, como referência na produção de corvina-legítima, estudos levados a cabo nas suas instalações apontam para bons crescimentos da espécie entre os 22 e os 25 °C (Matias *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2018; Sousa, 2016), já Kir *et al.* (2017), recentemente, apontou a temperatura ótima de crescimento desta espécie para os 26 °C.

Considerando as alterações climáticas pelas quais o planeta está a passar, o conhecimento dos requisitos térmicos por parte das espécies também é fundamental para uma melhor gestão dos sistemas de aquacultura no futuro (FAO, 2016; Lionello *et al.*, 2014; Kir *et al.*, 2017).

## **1.6. Objetivos**

Atualmente, esta espécie é alimentada com rações comerciais desenvolvidas para dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) que não são adequadas às suas necessidades, tornando crucial o desenvolvimento de estudos científicos que averiguem a fundo as necessidades desta espécie.

Em dissertações anteriormente efetuadas na EPPO, Amoedo (2012) e Sousa (2016) obtiveram bons resultados de crescimento para as temperaturas de 18, 20 e 24 °C. Assim, para a presente dissertação, foram escolhidas as temperaturas de 22 e 26 °C.

A escolha da temperatura de 22 °C deve-se ao facto de ter sido uma temperatura que já tinha apresentado resultados bastante satisfatórios, enquanto a escolha da temperatura de 26 °C teve o intuito de entender se esta poderia apresentar melhores resultados, do que as utilizadas até então.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito combinado da temperatura da água e da fonte e teor proteicos da dieta no crescimento, por parte de juvenis de corvina-legítima. Estabelecido o objetivo principal para o final do ensaio, e, sob as condições impostas, foram colocados os seguintes objetivos preliminares:

1. Verificar de que forma as duas temperaturas (22 e 26 °C) poderiam afetar o crescimento de juvenis de corvina-legítima.

2. Verificar de que forma a utilização das dietas experimentais (dieta contendo 50% proteína bruta (CP50); dieta contendo 55% proteína bruta (CP55); e dieta contendo 55% proteína bruta alternativa (CP55 ALT)), com diferentes fontes e teores proteicos, em condições térmicas de 26 °C, poderia afetar no crescimento dos indivíduos.
3. Avaliar de que forma a substituição parcial de farinhas de peixe por farinhas de aves poderia afetar o crescimento dos peixes, comparativamente a uma dieta com os melhores requisitos de farinhas de peixe.
4. Estabelecer qual a primazia das três variáveis em estudo ( $T^a$ , % proteica e qualidade da proteína), no sentido de avaliar a sua eficiência no crescimento dos peixes.

Ao avaliar os pontos propostos e a literatura analisada, sob opinião pessoal, constatou-se que ainda existe muita investigação que tem de ser feita por parte comunidade científica, relativamente às necessidades nutricionais desta espécie, de modo a atingir uma otimização da sua produção.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Dietas experimentais**

Para este estudo foram formuladas três dietas isolipídicas (16,2% lípidos, em percentagem de alimento) extrudidas, cujos ingredientes e composição proximal se encontram representadas no quadro 2.1.

As dietas formuladas pela SPAROS, Lda. (Olhão, Portugal) foram concebidas especialmente para a espécie em estudo, com o intuito de fornecer diferentes fontes e teores proteicos ao ensaio.

De acordo com a sua composição em CP, obtiveram diferentes denominações (CP50, CP55 e CP55 ALT), em que a dieta CP50 continha 50% de CP (dos quais 24,5% eram farinhas de peixe (FP) e 25,5% eram proteínas de origem vegetal (PV)), a dieta CP55 que continha 55% de CP (dos quais 28% eram FP e 27% eram PV) e a dieta alternativa CP55 ALT que também continha 50% de CP (dos quais 7% eram FP, 21% farinhas de aves (FA) e 27% PV).

Para assegurar os teores pretendidos em proteína, o nível de inclusão do concentrado de proteína de soja, glúten de trigo, farinha de trigo, óleo de peixe e óleo de colza foram ajustados entre dietas.

**Quadro 2.1:** Composição ponderal e proximal das dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT).

	Dietas		
	CP50	CP55	CP55 ALT
<b>Ingredientes (%)</b>			
Farinha de peixe LT70	35,0	40,0	10,0
Farinha de aves (baixo teor em cinzas)	0,0	0,0	31,5
Concentrado de proteína de soja	18,0	20,0	20,0
Glúten de trigo	10,1	11,0	11,0
Glúten de milho	4,5	5,0	5,0
Farinha de feijão-soja 48	4,5	5,0	5,0
Farinha de trigo	14,0	6,0	6,8
Óleo de peixe	4,0	3,7	5,3
Óleo de colza	8,3	8,2	4,3
Premix de vitaminas e minerais	1,0	1,0	1,0
Vitamina C 35%	0,1	0,1	0,1
Fosfato monocálcico	0,5	0,0	0,0
<b>Composição ponderal (em % de alimento)</b>			
Cinza	9,2	9,7	7,2
Proteína bruta	50,1	55,1	55,1
Lípidos totais	16,2	16,2	16,2
Fibra bruta	1,3	1,2	1,2
Fósforo total	1,2	1,2	1,2
Energia bruta (MJ·kg <sup>-1</sup> )	21,0	21,2	21,8

## **2.2. Desenho Experimental**

O ensaio decorreu durante um período de 56 dias, entre o dia 16 de setembro de 2019 e o dia 11 de novembro de 2019, nas instalações da EPPO (37°01'59.9" N; 7°49'12.9" W), pertencente ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Para o início do ensaio foram triados 1 440 juvenis pertencentes ao mesmo lote, com um peso médio inicial de 30,17 ± 5,58g, originários da EPPO.

Foram testados quatro tipos de tratamento, HT CP50, LT CP55, HT CP55 e HT CP55 ALT em que a denominação LT (baixa temperatura) corresponde a uma temperatura da água de 22 °C; e a denominação HT (alta temperatura) corresponde a uma temperatura da água de 26 °C; CP50 corresponde à dieta com 50% de CP; CP55 corresponde à dieta com 55% de CP; e CP55ALT corresponde à dieta alternativa com 55% de CP.

Cada um dos quatro tratamentos foi testado em triplicado. Para isso houve uma distribuição aleatória dos indivíduos, onde três grupos homogêneos de juvenis de corvina-legítima, foram distribuídos por três tanques em fibra de vidro com um volume de 1500L, cuja densidade não ultrapassou os  $2,50 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  (120 indivíduos por tanque) (figura 2.1).

O sistema utilizado foi do tipo aberto e a água previamente filtrada era originária da ria formosa.

A temperatura da água foi mantida a 22 e 26 °C através da utilização de duas linhas de água aquecidas com recurso a bombas de calor. A água bombeada a partir do reservatório da EPPO, até ao sistema de bombas de calor, onde era aquecida, foi distribuída por duas linhas de água distintas para os respetivos tanques do sistema, consoante a temperatura pretendida em cada um deles.

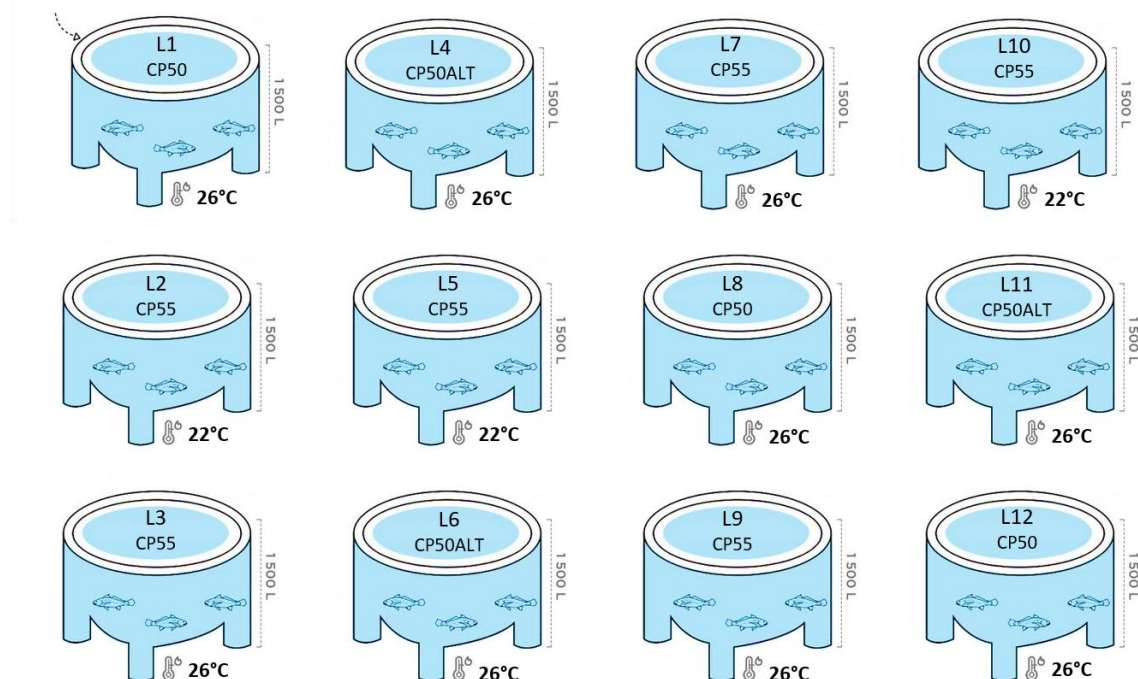
Durante o decorrer do ensaio, o fotoperíodo utilizado foi de 14/10, ou seja, 14 horas de luz e 10 horas de escuridão, a salinidade de  $36 \pm 1$  e o oxigénio dissolvido mantido entre 5 e  $7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . De forma a assegurar os parâmetros hídricos pretendidos, foram utilizadas sondas multiparamétricas que mediam, 24 horas por dia, a temperatura e níveis de  $\text{O}_2$  dissolvido, de modo a existir uma automatização do controlo dos mesmos, através do envio de alertas e da injeção de  $\text{O}_2$ , quando os valores máximos e mínimos fossem atingidos. Os caudais das torneiras de aporte de água eram medidos diariamente, para garantir que a renovação da água dos tanques nunca ultrapassasse o limite mínimo dos 50% por hora. A limpeza dos tanques também era feita diariamente.

Para evitar mortalidade por parte de indivíduos que saltavam do tanque, todos os tanques foram cobertos com rede.

Após a distribuição dos peixes pelos respetivos tanques de tratamento, iniciou-se o fornecimento das dietas experimentais.

Juvenis

n=120



**Figura 2.1** – Representação esquemática da distribuição dos diferentes tratamentos pelos tanques da EPPO.

### 2.3. Amostragem

Durante o ensaio foram realizadas 3 amostragens, uma amostragem inicial (dia 0 - 16/09/2019), uma amostragem intermédia (dia 31 - 17/10/2019) e uma amostragem final (dia 56 - 11/11/2019).

Nas amostragens inicial e final, todos os peixes foram individualmente pesados (g), com o auxílio de uma balança (Ken & Sohn GmbH, modelo ITB 35K1IP), com sensibilidade de 1g.

Antes de se iniciar a primeira amostragem foram recolhidos aleatoriamente 10 peixes, que foram colocados num banho de 2-fenoxietanol, a uma concentração de 700 mg·L<sup>-1</sup> até perda completa do equilíbrio, seguindo-se o seu imediato sacrifício com um golpe na cervical, utilizando o método apresentado por Barata *et al.* (2016). Por fim, procedeu-se à sua congelação imediata, a - 20 °C, para posterior análise da composição bioquímica das carcaças.

Na primeira amostragem, os peixes em jejum desde o dia anterior, foram retirados do tanque de origem com o auxílio de xalavares e baldes de 20L e transportados para uma

tina de 300L que continha 50 mg·L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol e, condições térmicas iguais às do futuro tanque de tratamento. À medida que os peixes iam ficando sob o efeito do anestésico, eram retirados da tina para serem pesados, sendo posteriormente transferidos para o respetivo tanque, onde ia ser realizado o ensaio, novamente com o auxílio de baldes de 20L.

Na amostragem intermédia, 20 peixes aleatoriamente retirados de cada tanque, foram individualmente pesados, com o objetivo de averiguar se os peixes estavam a crescer nos diferentes tratamentos.

A terceira e última amostragem foi efetuada à semelhança da primeira.

Para a análise final da composição bioquímica dos peixes foram recolhidos, aleatoriamente, 6 peixes de cada tanque, seguindo o mesmo método acima descrito.

Todas as amostragens foram feitas conforme as recomendações de bem-estar animal reguladas pela Direção Geral de Veterinária para a utilização de animais para fins científicos, descritas na directiva 2010/63/UE do parlamento europeu.

## **2.4. Alimentação**

O alimento foi distribuído manualmente e oferecido *ad libitum* cinco vezes ao dia (9, 11, 12, 14 e 16 horas), até à saciedade (dentro do que seria expectável ser consumo).

A alimentação atribuída a cada tanque foi contabilizada diariamente, descontando ao alimento fornecido o alimento rejeitado, corrigido pelo fator de hidratação (quadro 2.2), com o objetivo de se retirar o valor (em peso seco (PS)) do alimento que não foi ingerido.

O alimento rejeitado foi contabilizado diariamente, durante o decorrer do ensaio. A recolha deste alimento foi feita três vezes por dia, sempre na hora das purgas, colocando um filtro na saída de água e abrindo a purga para que todos os restos presentes no tanque e nas tubagens ficassem retidos no mesmo. O alimento sobranete foi pesado, de modo a ser posteriormente feito o cálculo real do alimento ingerido.

O fator de hidratação foi determinado individualmente para cada tratamento, utilizando 10g das diferentes rações mergulhadas num gobelé de 5L com água retirada de cada tanque. Este procedimento foi efetuado com arejamento contínuo, durante um período de 4 horas, de modo a simular as condições do tanque.

**Quadro 2.2:** Fator de hidratação das diferentes dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT).

<b>Fator de Hidratação por Tratamento</b>			
<b>HT CP50</b>	<b>LT CP55</b>	<b>HT CP55</b>	<b>HT CP55ALT</b>
2,6	2,8	3,1	2,6

## **2.5. Procedimentos bioquímicos**

### **2.5.1. Preparação das amostras para posterior análise bioquímica**

A preparação das amostras foi realizada no final do ensaio, nas instalações da SPAROS, Lda.

Para tal, os peixes inteiros, previamente congelados a -20 °C, foram partidos e moídos numa picadora elétrica, de modo a obter-se uma mistura homogénea de todos os peixes retirados por tratamento.

Após a moagem de cada tratamento, foram preparadas duas amostras da mistura correspondentes a cada um, para posterior análise, nas mesmas instalações.

### **2.5.2. Análise bioquímica**

Todas as análises foram efetuadas em duplicado, seguindo a metodologia descrita na AOAC (2006) e conforme o método apresentado por Matias *et al.* (2020).

O teor em matéria seca (MS) foi determinado após secagem a 105 °C, por 24 horas, em estufa de circulação, pela diferença do peso das amostras antes e após a liofilização. O teor em cinzas totais foi determinado por combustão, a 550 °C, durante 6 horas, em mufla (*Nabertherm L9/11/B170*, Alemanha). A proteína bruta, calculada segundo a fórmula N-6,25, foi determinada por *flash combustion technique*, seguida de uma separação cromatográfica a gás e condutividade termal com um *Leco N Analyzer (Model FP-528, Leco*

Corporation, USA). O teor em lípidos totais (LipT) foi determinado pela extração de éter de petróleo a 40-60 °C, a partir do método *Soxhlet*, utilizando um *Soxtec™ 2055 Fat Extraction System* (Foss, Denmark), com uma prévia hidrólise ácida com HCl 8,3 M. A energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (*Werke C2000, IKA*, Alemanha).

## **2.6. Procedimentos histológicos**

### **2.6.1. Preparação das amostras para posterior análise histológica**

Para a análise histológica do fígado, realizada no final do ensaio com base nos métodos descritos por Martoja, R. & Martoja-Pierson (1970), seis amostras de cada réplica (n=18, por tratamento), foram separadas em cassetes histológicas e fixadas imediatamente após a remoção, com uma solução de formol tamponado a 10% (pH 7,2), durante 48 horas.

Após a fixação, as amostras foram armazenadas em etanol a 70%, minimizando as alterações que pudessem ocorrer nos tecidos, durante o período de armazenamento.

De modo a obter os blocos para a realização dos cortes histológicos, os tecidos foram processados conforme o protocolo apresentado em anexo I.

### **2.6.2. Observação, fotografia e medição microscópica**

Para cada bloco foram realizados 3 cortes histológicos, somando um total de 18 cortes por tanque e 54 por tratamento.

Durante a observação microscópica, cinco fotografias foram aleatoriamente tiradas a cada preparação, com uma ampliação de 100x. Para cada fotografia foi delineada uma área de análise com dimensão de 0,45x0,45 mm, perfazendo um total de 90 análises por tratamento. Foram contabilizados e medidos os diâmetros de cada hepatócito presente na área selecionada, calculando posteriormente, uma média destes valores por tratamento.

A observação das preparações histológicas foi realizada em microscópio ótico *NIKON Eclipse Ci* e fotografadas com câmara *NIKON Ds Fi 2*. As medições e processamento de imagem foram feitas utilizando o *software ImageJ* (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), adaptando o método descrito por (Catarino, 2017), às

necessidades desta análise, com o auxílio do guia publicado por (Ferreira & Rasband, 2012).

## **2.7. Métodos analíticos**

### **2.7.1. Fórmulas utilizadas para cálculo dos parâmetros relativos ao crescimento e retenção de nutrientes**

Os valores de peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF) e ração consumida foram utilizados para calcular a taxa de crescimento específico (TCE), o índice de consumo diário (ICD), taxa de conversão alimentar (TCA), a taxa de eficiência proteica (TEP), o índice hepatossomático (IHS) e, a retenção de proteína (RP).

- Peso corporal inicial (PCI):

$$PCI = \frac{\text{biomassa inicial (g)}}{n^{\circ} \text{ inicial de peixes}}$$

- Peso corporal final (PCF):

$$PCF = \frac{\text{biomassa final (g)}}{n^{\circ} \text{ final de peixes}}$$

- Taxa de crescimento específico (TCE)

A taxa TCE é definida pela variação do logaritmo do peso pelo tempo e é dada pela fórmula:

$$TCE = \left( \frac{\ln(\text{peso corporal final}) - \ln(\text{peso corporal inicial})}{N^{\circ} \text{ dias}} \right) \times 100$$

Uma vez que os peixes não apresentam um crescimento linear ao longo da vida, a taxa TCE pode depender de diversos fatores como espécie, tamanho, idade, alimentação, temperatura da água, etc. O crescimento estima-se através de um modelo que permite estimar a percentagem de crescimento num determinado momento no tempo.

- Índice de consumo diário (ICD)

O índice ICD permite calcular a percentagem de alimento consumida com base no peso corporal, por cada dia e é dada pela seguinte fórmula:

$$ICD = \left( \frac{\text{total ração consumida (g)}}{\text{tempo (dias)} \times \left( \frac{\text{biomassa final (g)} + \text{biomassa inicial (g)}}{2} \right)} \right) \times 100$$

- Taxa de conversão alimentar (TCA)

A taxa TCA é calculada tendo por base a quantidade de ração (g ou kg) que foram utilizados para produzir um kg de peixe e é dada pela seguinte fórmula:

$$TCA = \frac{\text{total ração consumida (g)}}{\text{peso ganho (g)}} \times 100$$

O princípio básico de nutrição em aquacultura é que os organismos devem ser alimentados apenas até ao seu ponto de saciedade, uma vez que saciados, os níveis de *stress* fisiológico serão bastante reduzidos, permitindo um produto final de maior qualidade. Ao otimizar os regimes de alimentação em cada situação, a indústria também será capaz de reduzir os seus custos na alimentação.

Em termos industriais esta pode ser referida como TCA económica. Desta forma é contabilizada a alimentação na sua totalidade, incluindo, por exemplo, todas as perdas de ração e mortalidade ao longo do tempo, traduzindo-se os excessos de alimentação numa TCA mais elevada.

- Taxa de eficiência proteica (TEP)

A taxa TEP baseia-se no ganho de peso dividido pela ingestão de proteína bruta presente no alimento e é dada sob a fórmula:

$$TEP = \frac{\text{peso ganho (g)}}{\text{ingestão proteína bruta (g)}} \times 100$$

O cálculo desta taxa dita o desempenho da proteína bruta presente nas dietas quanto à necessidade de aminoácidos por parte dos organismos.

- Índice hepatossomático (IHS)

O índice IHS permite estimar a percentagem de peso corporal ocupado pelo fígado e é dado pela seguinte fórmula:

$$IHS = \frac{\text{peso húmido fígado}(g)}{\text{peso corporal final}(g)} \times 100$$

Valores de IHS elevados podem indicar excesso de deposição lipídica no fígado tal como diversas patologias associadas a este órgão.

- Retenção de proteína (RP)

A retenção de proteína foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$RP = \left( \frac{\text{biomassa final}(g) \times \%MS \text{ f. peixes} \times \%MS \text{ f. proteína peixes} - (\text{biomassa inicial}(g) \times \%MS \text{ i. peixes} \times \%MS \text{ i. proteína peixes})}{(\text{total ração consumida}(g) \times \%MS \text{ da dieta} \times \%MS \text{ proteína dieta})} \right) \times 100$$

Esta indica-nos a percentagem de proteína que foi retida pelos peixes em função do seu crescimento, não tendo sido desperdiçada, nem armazenada como fonte de energia.

## **2.8. Análise estatística**

Toda a análise estatística efetuada para esta dissertação foi realizada através do *software IBM SPSS Statistics 21.0* para o *Windows* (Armonk, NY: IBM Corp.), seguindo os métodos delineados por (Zar, 1999). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Os dados referentes aos diferentes tratamentos foram submetidos a uma análise de variância unidirecional (*one-way ANOVA*), de forma a testar: a existência de diferenças significativas entre as várias dietas experimentais, testadas à mesma temperatura, considerando os diferentes níveis de proteína como variável dependente; e a existência de diferenças significativas entre tratamentos testados com o mesmo nível de proteína, a diferentes temperaturas, considerando a temperatura como variável dependente.

Os pressupostos para a realização deste tipo de análise foram avaliados através do teste de *Shapiro-Wilk*, para testar a normalidade dos dados e, através do teste de *Levene's*, para testar a homogeneidade dos mesmos. Quando os resultados mostraram significância, as médias entre tratamentos foram comparadas, utilizando o teste *post hoc* de *Tukey*.

O efeito das diferentes dietas e temperaturas na estrutura do fígado dos juvenis foi analisado estatisticamente através da análise de variância de *Kruskal-Wallis* (*ANOVA on ranks*), uma vez que os dados não atendiam aos pressupostos de distribuição normal (*Shapiro-Wilk*), nem de homogeneidade (*Levene's*), mesmo após uma normalização por transformação logarítmica e raiz quadrada.

A significância estatística foi testada com um nível de confiança de 95%.



### 3. Resultados

#### 3.1. Composição bioquímica das dietas experimentais

O quadro 3.1 expõe a composição bioquímica das diferentes dietas experimentais. A composição proximal das dietas difere ligeiramente da composição ponderal que foi feita, aquando da formulação das dietas. No entanto, estas diferenças não contradizem os resultados, uma vez que não mostraram ser relevantes.

Assim sendo, o teor de CP para a dieta CP50 foi de 51,52%, 57,99% para a dieta CP55 e 56,59% para dieta CP55 ALT. Os restantes parâmetros analisados, contrariamente ao teor em CP, obtiveram valores similares entre dietas, tendo sido obtida uma média de  $16,23 \pm 0,18\%$ , para o teor em lípidos totais (LipT) e uma média de  $21,21 \pm 0,21 \text{ kJ}\cdot\text{g}^{-1}$  para o teor em EB.

**Quadro 3.1:** Composição bioquímica das dietas experimentais CP50, CP55 e CP55 ALT (MS: matéria seca; CP: proteína bruta; LipT: lípidos totais; EB: energia bruta).

Dieta	MS	Cinza	CP	LipT	EB
	(em % de alimento)		(em % de alimento)		( $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ )
CP50	93,30	8,75	51,52	16,03	20,98
CP55	94,80	8,39	57,99	16,38	21,39
CP55 ALT	94,40	9,65	56,59	16,26	21,26

Os valores são apresentados por média de duas réplicas ( $n = 2$ ).

#### 3.2. Performance de crescimento e eficiência na utilização das dietas

No início do ensaio, todos os grupos experimentais seguiram o mesmo padrão de peso corporal (LT CP55 -  $30,21 \pm 5,52$ ; HT CP50 -  $30,64 \pm 5,37$ ; HT CP55 -  $29,81 \pm 5,83$ , HT CP55 ALT -  $30,02 \pm 5,56$ ), não tendo havido diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ( $F(3,8) = 0,442$ ;  $p = 0,729$ ), demonstrando assim a homogeneidade do lote utilizado (quadros 3.2 e 3.3).

Durante o período experimental, todas as dietas foram bem aceites pelos indivíduos e nenhuma alteração na saúde dos animais foi observada. A mortalidade reportada ao longo

do ensaio aconteceu devido a eventuais fugas dos tanques, não tendo sido considerada significativa ( $F(3,8) = 0,228$ ;  $p = 0,874$ ), uma vez que a taxa de sobrevivência variou entre os 97,5 e 99%, entre tratamentos (quadros 3.2 e 3.3).

As *performances* dos distintos tratamentos testados com diferentes temperaturas estão representadas no quadro 3.2.

O crescimento dos juvenis de corvina-legítima expresso pelo peso corporal final (PCF) e pela taxa de crescimento específico (TCE), foi afetado de forma significativa pelo aumento da temperatura, tal como indicado pelos valores de PCF ( $F(1,4) = 93,864$ ;  $p = 0,001$ ) dos peixes sujeitos ao tratamento HT CP55 ( $134,53g \pm 23,03$ ), que apresentava uma temperatura da água mais elevada ( $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e, pelos valores de TCE ( $2,69 \pm 0,06$ ), que demonstraram uma relação significativa ( $F(1,4) = 73,096$ ;  $p = 0,001$ ) para a mesma temperatura, quando comparados com o tratamento LT CP55, testado a uma temperatura de água mais baixa ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ( $109,16 \pm 20,48$  e  $2,29 \pm 0,06$ , respetivamente), demonstrando assim a influência da temperatura da água no crescimento final e específico dos indivíduos.

Quanto à utilização dos nutrientes por parte dos indivíduos, observou-se, tendo em conta os dados da taxa de conversão alimentar (TCA), que os peixes fizeram uma melhor utilização de alimento, quando sujeitos a temperaturas de água mais elevadas ( $0,80 \pm 0,01$ ) ( $F(1,4) = 49,000$ ;  $p = 0,002$ ). Observou-se também, a partir dos valores obtidos pelo cálculo do índice de consumo diário (ICD), que, com o aumento da temperatura, os animais tendiam a ingerir mais alimento diariamente, ainda que não de uma forma considerada significativa ( $1,82 \pm 0,06$ ) ( $F(1,4) = 7,615$ ;  $p = 0,051$ ), o que pode sugerir que o crescimento dos juvenis de corvina-legítima pode não estar relacionado com a quantidade de alimento que consomem.

Resultados significativos foram obtidos para a taxa de eficiência proteica (TEP) ( $2,23 \pm 0,07$ ) ( $F(1,4) = 48,893$ ;  $p = 0,002$ ), quando os peixes foram submetidos a temperaturas de  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O mesmo aconteceu quanto à retenção de proteína (RP) ( $40,19 \pm 0,99$ ) ( $F(1,4) = 21,589$ ;  $p = 0,010$ ), quando comparados com as réplicas submetidas a temperatura mais baixa.

O IHS não mostrou ser afetado pela temperatura, uma vez que não apresentou diferenças significativas ( $F(1,4) = 2,585$ ;  $p = 0,183$ ) entre os tratamentos HT CP55 e LT CP55.

**Quadro 3.2:** Performance de crescimento e utilização das dietas dos juvenis de corvina-legítima tratados com o mesmo teor em proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C) (PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; TCE: taxa de crescimento específico; ICD: índice de consumo diário; TCA: taxa de conversão alimentar; TEP: taxa de eficiência proteica; IHS: índice hepatossomático; RP: retenção de proteína).

	Tratamentos		ANOVA
	LT CP55	HT CP55	( <i>p-value</i> ) <sup>1</sup>
			T <sup>a</sup>
<b>Crescimento</b>			
Sobrevivência (%)	98,61 ± 0,96 <sup>a</sup>	97,78 ± 2,10 <sup>a</sup>	0,564
PCI (g)	30,21 ± 5,52 <sup>a</sup>	29,81 ± 5,83 <sup>a</sup>	0,702
PCF (g)	109,16 ± 20,48 <sup>a</sup>	134,53 ± 23,03 <sup>b</sup>	0,001
TCE (%·dia <sup>-1</sup> )	2,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,001
ICD (%·dia <sup>-1</sup> )	1,71 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,051
TCA (%)	0,85 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,002
TEP (%)	2,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,002
HIS (%)	1,90 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,183
RP (% ingestão)	36,57 ± 0,91 <sup>a</sup>	40,19 ± 0,99 <sup>b</sup>	0,010

Os valores são apresentados por média ± SD de três réplicas (n = 3). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (one-way ANOVA, p < 0,05).  
<sup>1</sup>Valores de *p-value* para diferenças entre as diferentes temperaturas.

Os tratamentos testados a uma temperatura de 26 °C, submetidos a diferentes teores e fontes de proteína (quadro 3.3), demonstraram que, apesar de ter sido observado um crescimento relevante para todos os tratamentos no final dos 56 dias de ensaio, a esta temperatura, o nível proteico não teve influência no peso dos indivíduos (PCF: 138,83 ± 25,10 - HT CP50; 134,53 ± 23,03 - HT CP55; 142,81 ± 23,37 - HT CP55 ALT) (F (2,6) = 3,464; p = 0,100), assim como no seu crescimento específico (TCE: 2,70 ± 0,03 – HT CP50; 2,69 ± 0,06 – HT CP55; 2,78 ± 0,05 – HT CP55 ALT) (F (2,6) = 3,316; p = 0,089). Embora sem significância, o valor de PCF do tratamento HT CP55 ALT foi o que apresentou maiores resultados, comparativamente aos demais, seguindo-se, surpreendentemente, pelo tratamento HT CP50, que continha o menor teor em CP, ficando o tratamento HT CP55 com o menor valor de PCF.

No que diz respeito à utilização dos nutrientes, tendo em conta os dados de TCA, observou-se que os peixes alimentados com dietas que continham 55% de proteína (CP55 e CP55 ALT) fizeram uma melhor utilização das mesmas (TCA: 0,80 ± 0,01 e 0,79 ± 0,02, respetivamente), diferindo significativamente (F (2,6) = 7,184; p = 0,026) dos peixes que foram alimentados com a dieta CP50, que continha apenas 50%. Relativamente à ingestão de alimento, não se observou qualquer diferença significativa (F (2,6) = 3,960; p = 0,080), quando feita uma comparação entre todas as dietas.

Nenhuma relação considerada significativa foi observada entre os valores de TEP ( $F(2,6) = 3,361$ ;  $p = 0,105$ ) e os valores de RP ( $F(2,6) = 4,715$ ;  $p = 0,059$ ), para os diferentes níveis de proteína, sugerindo que o teor e fonte proteicos não parecem influenciar o crescimento e utilização das dietas pelos peixes.

O IHS mostrou ter sido afetado pelos diferentes níveis de proteína, tendo apresentado diferenças estatisticamente significativas ( $F(2,6) = 8,981$ ;  $p = 0,016$ ) entre aqueles que foram alimentados por CP50 e CP55, não se tendo verificado diferenças entre as dietas CP50 e CP55ALT e entre as dietas CP55 e CP55ALT.

**Quadro 3.3:** *Performance* de crescimento e utilização das dietas dos juvenis de corvina-legítima tratados com diferentes teores e fontes de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) à mesma temperatura (26 °C) (PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; TCE: taxa de crescimento específico; ICD: índice de consumo diário; TCA: taxa de conversão alimentar; TEP: taxa de eficiência proteica; IHS: índice hepatossomático; RP: retenção de proteína).

	Tratamentos			ANOVA ( <i>p-value</i> ) <sup>1</sup>
	HT CP50	HT CP55	HT CP55 ALT	P
<b>Crescimento</b>				
Sobrevivência (%)	97,50 ± 3,00 <sup>a</sup>	97,78 ± 2,10 <sup>a</sup>	98,61 ± 1,73 <sup>a</sup>	0,836
PCI (g)	30,64 ± 5,37 <sup>a</sup>	29,81 ± 5,83 <sup>a</sup>	30,02 ± 5,56 <sup>a</sup>	0,630
PCF (g)	138,83 ± 25,10 <sup>a</sup>	134,53 ± 23,03 <sup>a</sup>	142,81 ± 23,37 <sup>a</sup>	0,100
TCE (%·dia <sup>-1</sup> )	2,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,089
ICD (%·dia <sup>-1</sup> )	1,94 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,080
TCA (%)	0,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,026
TEP (%)	2,27 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,105
HIS (%)	1,97 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,74 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,87 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,016
RP (% ingestão)	44,16 ± 0,24 <sup>a</sup>	40,19 ± 0,99 <sup>a</sup>	43,07 ± 2,64 <sup>a</sup>	0,059

Os valores são apresentados por média ± SD de três réplicas (n = 3). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (one-way ANOVA,  $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Valores de *p-value* para diferenças entre os diferentes níveis de proteína.

### 3.3. Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima

#### 3.3.1. Tratamentos alimentados com o mesmo teor de proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C)

No quadro 3.4 estão representadas as composições corporais, relativas ao 56° dia de ensaio, para os tratamentos testados com diferentes temperaturas.

Como tal, é possível observar-se que o teor MS foi claramente superior quando os peixes alimentados com CP55 ( $28,79 \pm 0,46$ ) foram submetidos a temperaturas de água mais elevadas ( $F(1,4) = 24,185$ ;  $p = 0,008$ ), demonstrando que a temperatura teve influência no desenvolvimento dos indivíduos. Contrariamente ao teor em MS, os teores em proteína bruta (CP) ( $F(1,4) = 2,172$ ;  $p = 0,215$ ), lípidos totais (LipT) ( $F(1,4) = 0,504$ ;  $p = 0,517$ ) e energia bruta (EB) ( $F(1,4) = 1,051$ ;  $p = 0,363$ ) não diferiram de forma significativa entre as diferentes temperaturas.

**Quadro 3.4:** Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima (56° dia) tratados com o mesmo teor de proteína (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C) (MS: matéria seca; CP: proteína bruta; LipT: lípidos totais; EB: energia bruta).

	Tratamentos		ANOVA
	LT CP55	HT CP55	( <i>p-value</i> ) <sup>1</sup>
Composição corporal (%)			T <sup>a</sup>
MS	$27,00 \pm 0,32^a$	$28,79 \pm 0,46^b$	0,008
Cinza	$11,92 \pm 0,58^a$	$12,40 \pm 1,1^a$	0,553
CP	$64,33 \pm 1,36^a$	$62,76 \pm 1,24^a$	0,215
LipT	$24,25 \pm 2,36^a$	$25,29 \pm 0,94^a$	0,517
EB (kJ·g <sup>-1</sup> )	$22,41 \pm 0,13^a$	$22,31 \pm 0,61^a$	0,363

Os valores são apresentados por média  $\pm$  SD de três réplicas ( $n = 3$ ). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (*one-way ANOVA*,  $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup>Valores de *p-value* para diferenças entre as diferentes temperaturas.

#### 3.3.2. Tratamentos alimentados com diferentes dietas experimentais (CP50, CP55 e CP55 ALT)

O conteúdo em CP nas carcaças dos indivíduos amostrados não mostrou ter sido afetado pelas diferentes dietas ( $F(2,6) = 3,036$ ;  $p = 0,123$ ), tal como demonstrado pelo quadro 3.5. Contudo, verificou-se uma ligeira diminuição do conteúdo proteico nos peixes submetidos

ao tratamento HT CP55 ALT ( $61,12 \pm 2,10$ ), alimentados com fontes proteicas alternativas, face aos restantes tratamentos.

A análise estatística efetuada (*one-way* ANOVA) mostrou que todos os restantes parâmetros relativos à composição bioquímica das carcaças não diferiram de forma significativa entre si, quando os peixes foram submetidos a diferentes teores e fontes de proteína (MS (F (2,6) = 0,151; p = 0,863), cinza (F (2,6) = 480,881; p = 0,462), LipT (F (2,6) = 0,708; p = 0,529) e EB (F (2,6) = 1,224; p = 0,358) (quadro 3.5).

**Quadro 3.5:** Composição bioquímica dos juvenis de corvina-legítima (56º dia) tratados com diferentes teores e fontes de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) à mesma temperatura (26 °C) (MS: matéria seca; CP: proteína bruta; LipT: lípidos totais; EB: energia bruta).

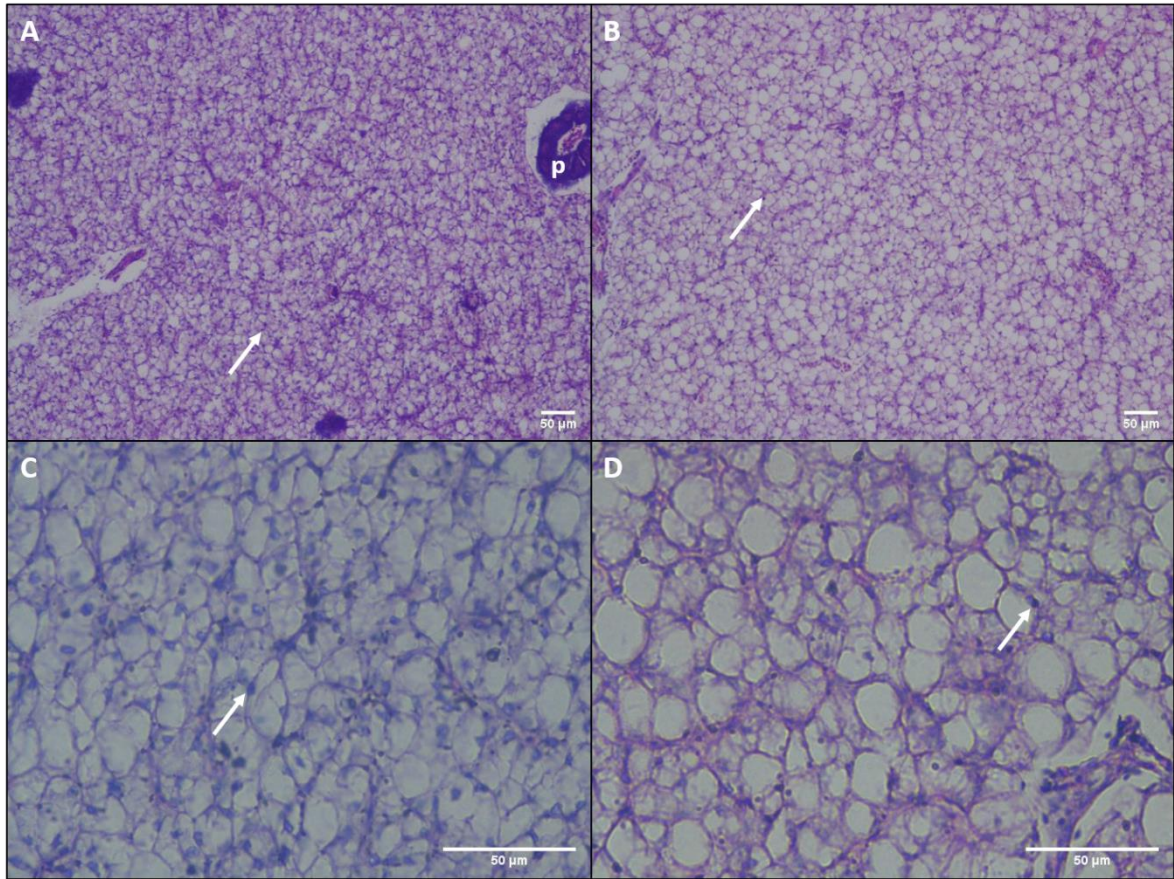
	Tratamentos			ANOVA
	HT CP50	HT CP55	HT CP55ALT	(p-value) <sup>1</sup>
				P
Composição corporal (%)				
MS	$29,04 \pm 2,20^a$	$28,79 \pm 0,46^a$	$28,91 \pm 0,39^a$	0,863
Cinza	$12,37 \pm 0,31^a$	$12,40 \pm 1,13^a$	$11,92 \pm 0,58^a$	0,462
CP	$64,21 \pm 1,07^a$	$62,76 \pm 1,24^a$	$61,12 \pm 2,10^a$	0,123
LipT	$25,42 \pm 0,63^a$	$25,29 \pm 0,94^a$	$26,28 \pm 1,53^a$	0,529
EB (kJ·g <sup>-1</sup> )	$22,66 \pm 0,23^a$	$22,31 \pm 0,61^a$	$22,71 \pm 0,13^a$	0,358

Os valores são apresentados por média  $\pm$  SD de três réplicas (n = 3). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas (*one-way* ANOVA, p < 0,05).

<sup>1</sup>Valores de *p-value* para diferenças entre os diferentes níveis de proteína.

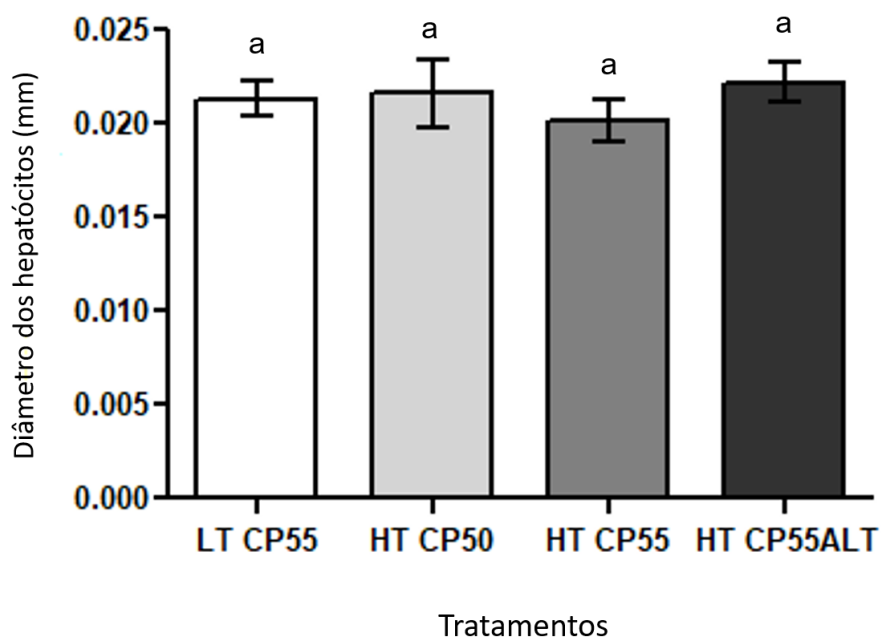
### 3.4. Análise do fígado dos juvenis de corvina-legítima

Com base nas observações efetuadas através de microscópio ótico dos cortes histológicos de fígado corados com Hematoxilina Eosina (HE), verificou-se que os juvenis de corvina-legítima, alimentados com CP55, a diferentes temperaturas (22 e 26°C), demonstraram alterações à normal estrutura histológica do fígado (figura 3.1), nomeadamente, distensão celular e citoplasma completamente vacuolizado, apresentando esteatose celular. Contudo, estas alterações não demonstraram diferenças significativas entre si, tanto ao nível de esteatose, como de diâmetro médio dos hepatócitos ( $X^2$  (1) = 4,560; p = 0,102) (figura 3.2).

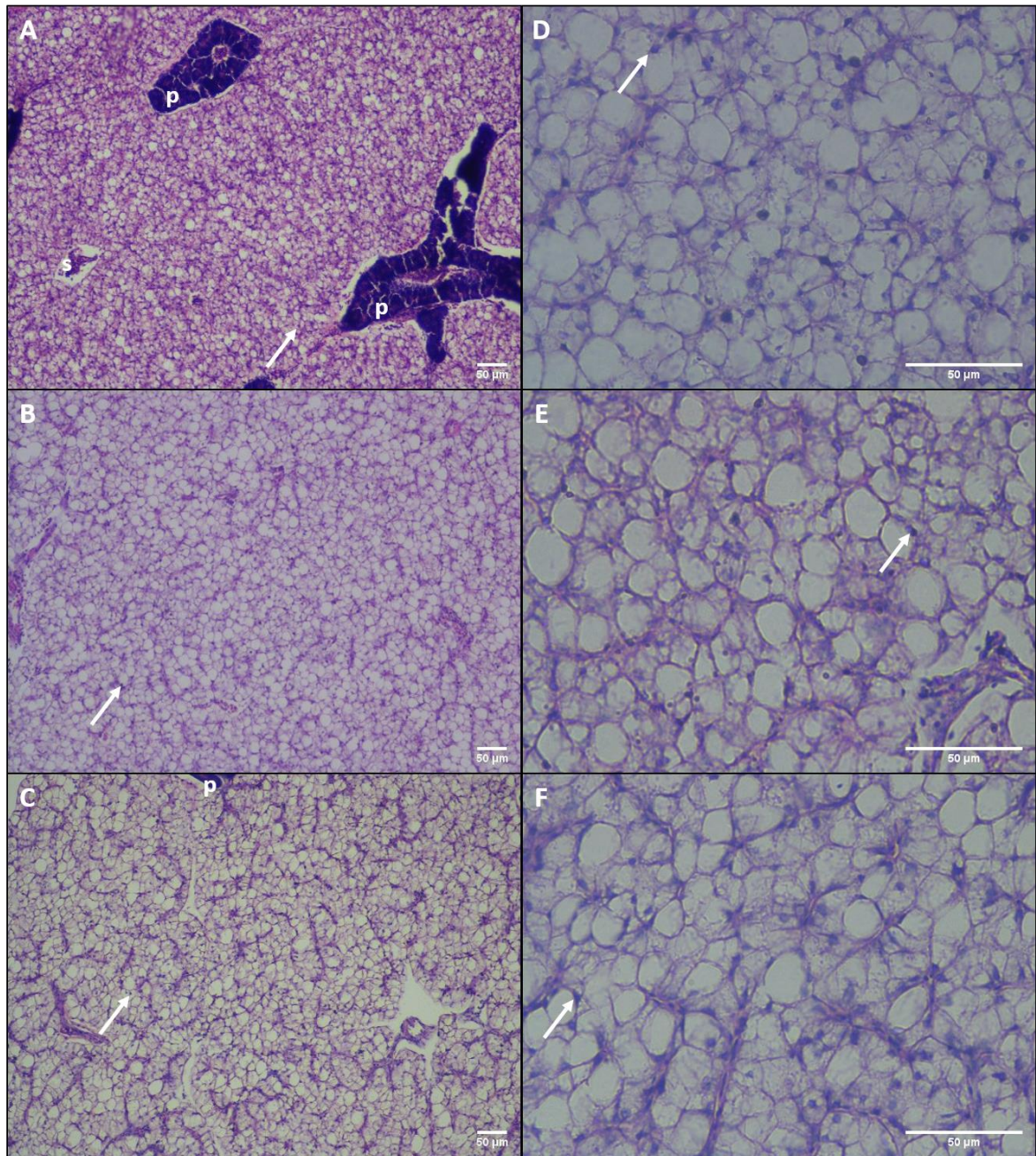


**Figura 3.1** - Microfotografias de luz, obtidas a partir de microscópio ótico, de preparações histológicas definitivas de fígado de juvenis de corvina-legítima (*Argyrosomus regius*) alimentadas com a mesma dieta (CP55) a diferentes temperaturas (22 e 26 °C). Cortes histológicos corados com HE. A seta branca indica núcleo deslocado lateralmente; p - pâncreas; s – sinusoides; a barra branca corresponde a uma escala de 50 μm. (A) imagem correspondente ao tratamento LT CP55, ampliação 100x; (B) imagem correspondente ao tratamento HT CP55, ampliação 100x; (C) imagem correspondente ao tratamento LT CP55, ampliação 400x; (D) imagem correspondente ao tratamento HT CP55, ampliação 400x

Também em indivíduos alimentados com as dietas CP50, CP55 e CP55 ALT, a 26° C (figura 3.3), não foram encontradas diferenças com significado estatístico ( $X^2(2) = 4,500$ ;  $p = 0,340$ ), no diâmetro médio dos hepatócitos (figura 3.2).



**Figura 3.2:** Diâmetro dos hepatócitos de juvenis de corvina-legítima sujeitos aos diferentes tratamentos.



**Figura 3.3** - Microfotografias de luz, obtidas a partir de microscópio ótico, de preparações histológicas definitivas de fígado de juvenis de corvina-legitima (*Argyrosomus regius*) alimentadas com diferentes fontes e teores de proteína (CP50, CP55 e CP55 ALT) a uma temperatura de 26 °C, com claros sinais de esteatose celular. Cortes histológicos corados com HE. A seta branca indica núcleo deslocado lateralmente; p - pâncreas; s – sinusoides; a barra branca corresponde a uma escala de 50 µm. (A) imagem correspondente ao tratamento HT CP50, ampliação 100x; (B) imagem correspondente ao tratamento HT CP55, ampliação 100x; (C) imagem correspondente ao tratamento HT CP55 ALT, ampliação 100x; (D) imagem correspondente ao tratamento HT CP50, ampliação 400x; (E) imagem correspondente ao tratamento HT CP55, ampliação 400x; (F) imagem correspondente ao tratamento HT CP55 ALT, ampliação 400x.

Todos os cortes histológicos analisados mostraram que as células hepáticas exibiam uma estrutura poligonal, disposta ao longo dos canais sinusoides, preenchidas por vacúolo e núcleo deslocado para a parede celular (figuras 3.1 e 3.3).

Com a observação das preparações histológicas foram ainda observados vestígios de tecido pancreático rodeado por células hepáticas, o que indica que esta espécie contém hepatopâncreas (figuras 3.1 A e 3.3 A e C).

## **4. Discussão**

O presente estudo demonstra a importância da temperatura da água de cultivo, do teor proteico e da fonte da proteína das dietas experimentais no crescimento de juvenis de corvina-legítima.

Foi demonstrado que, num curto período de tempo (56 dias), o crescimento dos juvenis alimentados com a mesma dieta diferiu significativamente, quando sujeitos a diferentes temperaturas. Por outro lado, juvenis tratados com a mesma temperatura e alimentados com diferentes teores proteicos, não apresentaram diferenças no seu crescimento. Após uma extensa pesquisa bibliográfica, apenas um estudo oficial, efetuado por Sousa (2016), avalia o efeito da interação entre a temperatura da água e o teor de proteína da dieta, no crescimento por parte de juvenis de corvina-legítima.

A corvina-legítima tem recebido, nos últimos anos, uma atenção especial no que diz respeito aos seus requisitos nutricionais, devido à necessidade de otimização desta espécie e diversificação da aquacultura na área do mediterrâneo (Angelini, 2002; Duncan, *et al.*, 2013; Monfort, 2010; Parisi *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2013). No entanto, o conhecimento existente acerca desses requisitos, ainda é muito limitado.

Segundo Lovell, (1998b), a proteína, para além de ser o principal macronutriente que constitui as dietas dos peixes que afeta diretamente o seu crescimento e a sua taxa de conversão alimentar, é um dos principais custos associados à formulação das rações. Um défice na incorporação de proteína nas dietas prejudica diretamente o crescimento desta espécie, e, por outro lado, o excesso deste macronutriente presente nas dietas, para além de as tornar mais caras, torna menos eficiente a utilização de N. Esta utilização deficiente tem como consequência um aumento da deposição de compostos azotados na água, uma vez que os aminoácidos são utilizados como fonte de energia (Cowey, 1995; NRC, 2012), comprometendo a qualidade da água do cultivo e promovendo efluentes com maior carga orgânica.

Por isso, nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados, de modo a avaliar quais, efetivamente, serão os requisitos alimentares e as alternativas sustentáveis mais viáveis para esta espécie, com o sentido de otimizar a sua produção (Monfort, 2010; NRC, 2012).

Estudos anteriores já demonstraram que até 60% de substituição de farinhas de peixe (FP) por proteínas de origem vegetal (PV), não compromete a *performance* de crescimento em juvenis de corvina-legítima, apresentando crescimentos similares a indivíduos alimentados com concentrações idênticas em FP (Estévez *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015; Velazco-Vargas, 2013). Os valores de PV utilizados nestes estudos foram superiores aos presentes nas dietas CP50 e CP55 (quadro 2.1), utilizadas neste ensaio, onde a substituição rondou os 50%, podendo afirmar-se que a incorporação de PV nas dietas experimentais não prejudicou o crescimento dos indivíduos e não se aproximou de possíveis limites percentuais máximos em que a espécie começa a retardar o seu crescimento.

Embora nenhum estudo oficial tenha sido realizado com o objetivo de avaliar o efeito das farinhas de aves (FA) na *performance* de crescimento de juvenis de corvina-legítima, inúmeros autores têm estudado o seu potencial como possível substituto parcial às FP, com valores superiores a 30% de FA, em inúmeras espécies como robalo-japonês (*Lateolabrax japonicus*) (Wang *et al.*, 2015), dourada-do-Japão (*Pagrus major*) (Takagi *et al.*, 2000), truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Parés-Sierra *et al.*, 2014; Steffens, 1994), fogueteiro-galego (*Rachycentron canadum*) (Watson *et al.*, 2014), sereia-da-florida (*Trachinotus carolinus*) (Riche, 2015), corvino-de-pintas (*Sciaenops ocellatus*) (Kureshy *et al.*, 2000), ou dourada (*Sparus aurata*) (Fontinha *et al.*, 2020). Neste ensaio a dieta CP55 ALT obteve uma incorporação de 31,5% de FA (quadro 2.1), substituindo em 75% as FP, face à dieta CP55, que continha a mesma percentagem de proteína.

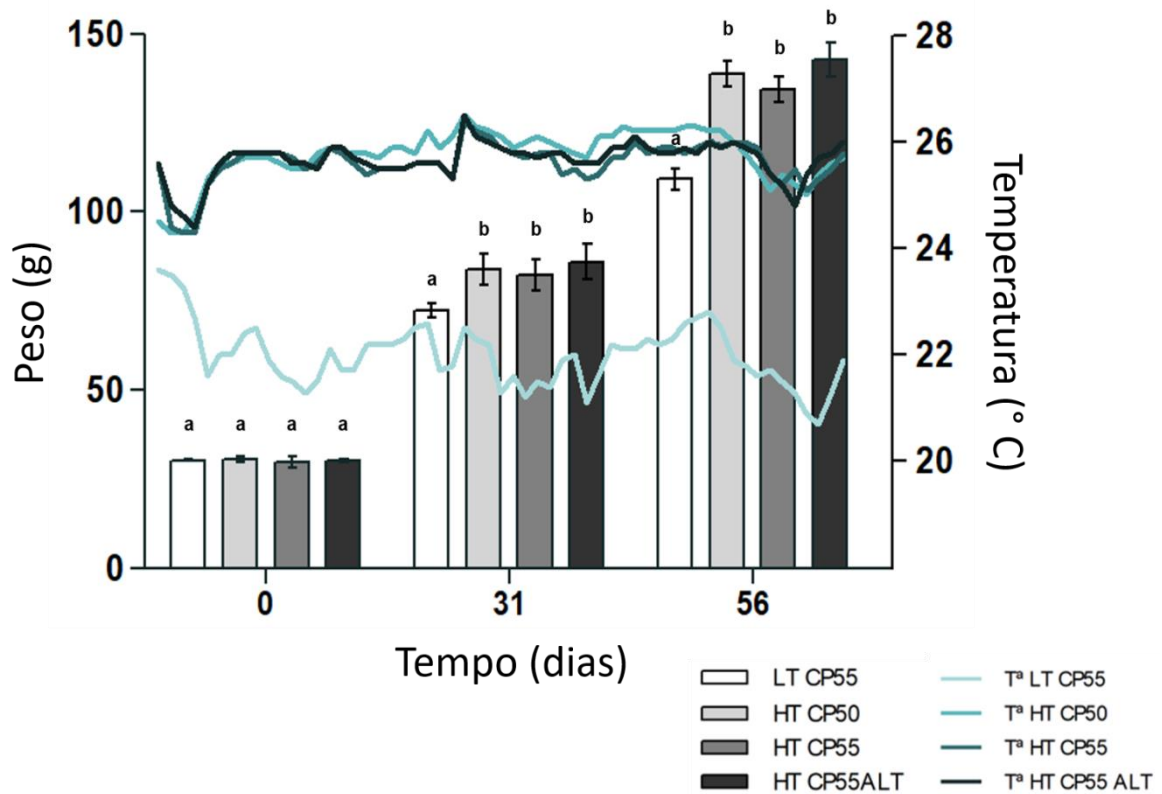
Tal como pretendido, as dietas experimentais apresentaram um caráter isolipídico, em que o teor de lípidos foi idêntico entre tratamentos (16,2 de lípidos, em % de alimento). Este nível lipídico aproximou-se bastante dos parâmetros considerados ótimos para o crescimento de juvenis desta espécie, apresentados por Chatzifotis *et al.* (2010; 2012), que, nos seus estudos, demonstrou um crescimento máximo fazendo utilização de uma dieta composta por 17% de lípidos e 43% de proteína (CP) (em % de alimento) e outra de 17,5% de conteúdo lipídico com 50% de CP (em % de alimento).

No entanto, o teor em CP mostrou-se ligeiramente díspar do que foi apresentado pelas matrizes de formulação das dietas (CP50: 50 vs. 51,52; CP55: 55 vs. 57,99; CP55 ALT: 55 vs. 56,59, em % de alimento), sugerindo que os valores de CP das matrizes de formulação de alguns dos ingredientes, ainda que de uma forma pouco significativa, fossem apresentados por defeito. Uma vez que as diferenças apresentadas foram mínimas, todos os valores estavam contemplados no intervalo de valores (45-60, em % de alimento),

atualmente considerado aceite por inúmeros autores para a maximização do crescimento de juvenis desta espécie (Amoedo, 2012; Chatzifotis *et al.*, 2012; El-Dahhar *et al.*, 2016; Fountoulaki *et al.*, 2017; Martinez-Llorens *et al.*, 2011; Saavedra *et al.*, 2018; Sousa, 2016).

A temperatura determinada para os diferentes tratamentos (LT CP55: 22 vs. 22,03 ± 0,90 °C; HT CP55: 26 vs. 25,62 ± 0,64 °C; HT CP50: 26 vs. 25,82 ± 0,70 °C; HT CP55 ALT: 26 vs. 25,65 ± 0,64 °C) manteve-se dentro dos parâmetros pretendidos para este ensaio (figura 4.1). É sabido que o aumento da temperatura desempenha um papel importante no crescimento de juvenis de diversas espécies de produção aquática, através dos seus efeitos na alimentação e metabolismo dos indivíduos, existindo para cada espécie um intervalo de temperaturas consideradas ótimas para o efeito (Brett & Groves, 1979; Fry, 1971; Gadomski & Caddell, 1991; Jobling, 1995; Mccauley & Huggins, 1979). Muitos autores encontraram esta tendência quando estudaram o seu efeito em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Besson *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2008; Person-Le Ruyet *et al.*, 2004), salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) (Handeland *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2001), peixe-gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Suja *et al.*, 2009), halibute-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Gadomski & Caddell, 1991), pregado (*Scophthalmus maximus*) (Imslund *et al.*, 2001; 1996), truta-marisca (*Salmo trutta*) (Elliott, 1975), achigã (*Micropterus salmoides*) (Díaz *et al.*, 2007) ou corvina-legítima (*Argyrosomus regius*) (Cárdenas, 2009; Kir *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2013; Saavedra *et al.*, 2018). No entanto, para a espécie em estudo na presente dissertação, muito pouco se sabe sobre a sua temperatura ótima de crescimento (Kir *et al.*, 2017).

O efeito da temperatura no crescimento foi notório logo ao 31º dia, sendo bastante mais evidente no final do ensaio (56º dia) (figura 4.1). No estudo levado a cabo por Kir *et al.*, (2017), que pretendeu determinar qual a tolerância e preferência térmica por juvenis de corvina-legítima, utilizando temperaturas de 18, 22, 26 e 30 °C, os peixes alimentados *ad libitum* com uma dieta comercial que continha 45% de CP, durante 30 dias, obtiveram o seu crescimento máximo a uma temperatura de 26 °C. Estes valores corroboram os resultados obtidos no presente estudo, onde se verificou que o aumento da temperatura de 22 para 26 °C, influenciou significativamente o crescimento dos indivíduos (PCF e TCE), quando os peixes de ambos os tratamentos foram alimentados com CP55. Considerando os 26 °C o valor ótimo para o crescimento de juvenis de corvina-legítima, constatou-se que o mesmo está acima dos valores considerados favoráveis (22 – 25 °C) utilizados em vários ensaios na EPPO ou em parceria com esta (Guardiola *et al.*, 2018; Matias *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2018; Sousa, 2016).



**Figura 4.1:** Evolução do peso dos peixes e da temperatura de cultivo nos diferentes tratamentos, ao longo dos 56 dias de ensaio.

É sabido que, por norma, o crescimento e a ingestão de alimento nos peixes, aumenta com o aumento da temperatura até ao valor ótimo de cada espécie (Meeuwig *et al.*, 2004), sendo a temperatura um fator limitante tanto na ingestão de alimento, como na taxa metabólica dos organismos (Peres & Oliva-Teles, 1999).

No presente estudo, enquanto que a temperatura mais alta em estudo influenciou positivamente a taxa de conversão alimentar (TCA), o índice de consumo diário (ICD) entre os tratamentos com diferentes temperaturas, apesar de ter mostrado uma tendência por parte dos peixes sujeitos a condições térmicas mais baixas em consumir menos alimento (quadro 3.2) não apresentou uma relação considerada significativa, podendo sugerir que o crescimento dos peixes possa não estar relacionado com altas taxas de consumo, mas sim com uma melhor utilização das dietas (Matias *et al.*, 2020). Outro estudo, desenvolvido por Moreira *et al.* (2008), demonstrou que robalos tratados a diferentes temperaturas (18 e 25 °C) e alimentados com diferentes níveis proteicos, apresentaram a mesma tendência quanto à ingestão de alimento.

A eficiência e retenção (em % de ingestão) proteicas (TEP e RP) foram superiores em peixes tratados a uma temperatura mais elevada, indicando que temperaturas próximas dos 26 °C promovem uma melhor utilização da proteína presente na dieta, por parte dos juvenis de corvina-legítima. Tais resultados também podem ser observados para juvenis desta espécie no estudo feito para a dissertação de Sousa (2016), quando peixes alimentados com uma dieta que continha 57% de CP foram testados a diferentes temperaturas (20 e 24 °C). Moreira *et al.* (2008) também descreveu esta tendência, quanto à eficiência proteica, em robalo (*Dicentrarchus labrax*).

Quando testados diferentes fontes e teores proteicos em HT, o presente estudo demonstrou que os peixes alimentados *ad libitum* não apresentaram diferenças quanto ao seu crescimento (PCF e TCE), nem quanto ao ICD. Saavedra *et al.* (2018), com condições térmicas de cultivo médias de aproximadamente 25 °C, corrobora os resultados obtidos neste estudo, uma vez que também não verificou diferenças no crescimento e ingestão de alimento por parte dos juvenis desta espécie, quando alimentados com teores proteicos de 50 e 60%.

No entanto, a maioria dos autores contradizem os resultados obtidos no presente estudo, quando obtiveram diferenças significativas no crescimento de juvenis de corvina-legítima, em ensaios de nutrição realizados para avaliar o efeito do aumento do teor de CP nas dietas, quando os peixes foram cultivados a temperaturas médias inferiores a 25 °C (Chatzifotis *et al.*, 2012; El-Dahhar *et al.*, 2016; Güroy *et al.*, 2017; Martinez-Llorens *et al.*, 2011; Velazco-Vargas *et al.*, 2014), indicando que a temperatura tem um papel de predominância no crescimento desta espécie.

Os valores de crescimento específicos (TCE) entre tratamentos que utilizaram diferentes teores de CP, vincularam, mais uma vez, a prevalência da temperatura sobre os níveis de proteína, uma vez que apresentaram valores superiores aos comumente encontrados na literatura (Amoedo, 2012; Chatzifotis *et al.*, 2012; 2010; Fernandes, 2013; Martinez-Llorens *et al.*, 2011), quando os autores efetuaram os seus ensaios a temperaturas inferiores a 22 °C. Valores que vão de encontro aos valores obtidos no presente estudo foram encontrados por El-Dahhar *et al.* (2016), quando alimentou juvenis de corvina-legítima com 50 e 55% de CP, a uma temperatura constante de aproximadamente 24,5 °C.

Os valores TCE obtidos neste estudo também mostraram ser superiores aos valores apresentados por juvenis de outras espécies marinhas, tal como a roncadeira-preta

(*Sciaena umbra*), que apresentou valores de TCE máximos de 0,95% no estudo de Chatzifotis *et al.* (2006), ou robalo (*Dicentrarchus labrax*) que, segundo Person-Le Ruyet *et al.* (2004), obteve valores de TCE de 1,21%, quando cultivados sob condições parecidas com às deste ensaio, demonstrando, assim, as ótimas taxas de crescimento por parte da espécie em estudo.

À temperatura de 26 °C, os juvenis de corvina-legítima tendem a ingerir mais alimento, independentemente do seu conteúdo proteico, como indicam os valores de ICD. Neste estudo, contrariamente a estes valores, o aumento do nível CP mostrou diferir significativamente quanto à TCA, sugerindo, mais uma vez, que o crescimento dos peixes poderá ser mais influenciado pela utilização do alimento, do que pela taxa de ingestão do mesmo. Denota-se que os peixes que se alimentaram de CP50 consumiram mais alimento, do que os peixes alimentados com as restantes rações que continham 55% de CP. No entanto, esta diferença não mostrou ser significativa, o que pode indicar que o incremento de CP de 50 para 55% à temperatura de 26 °C, em conjunto com a falta de diferenças no peso corporal final (PCF) dos diferentes tratamentos, não se justifica, uma vez que é utilizada uma temperatura ótima para o crescimento dos animais. Valores idênticos de TCA foram obtidos por Matias *et al.* (2020) e Ribeiro *et al.* (2015) em ensaios efetuados com juvenis da mesma espécie.

Altos valores de TEP estão normalmente associados a boas taxas de conversão alimentar e a altas taxas de crescimento (Thoman *et al.*, 1999). Tal como demonstrado pela figura 4.1, o crescimento dos indivíduos foi gradual ao longo do ensaio, tendo os três tratamentos HT quase quintuplicado de peso médio ao 56º dia (quadro 3.3). No corrente estudo, os valores de TEP não mostraram diferenças entre os diferentes níveis de proteína, tendo compreendido valores entre 2,15 (CP55) e 2,27 (CP50). Estes valores vão de encontro aos valores obtidos nos estudos de Couto *et al.* (2016) e Matias *et al.* (2020). No entanto, são superiores à maioria dos autores que realizaram estudos de nutrição com juvenis de corvina-legítima (Amoedo, 2012; Chatzifotis *et al.*, 2012, 2010; Güroy *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2018; Sousa, 2016).

Os resultados obtidos para RP seguiram o mesmo padrão dos anteriormente mencionados onde, apesar de não existirem diferenças significativas entre tratamentos, se verificou que os peixes alimentados com a dieta que continha 50% de CP retiveram mais proteína que os demais tratamentos em HT.

Estes valores sugerem que rações para juvenis de corvina-legítima, com níveis de CP de 50% agregados a teores em lípidos otimizados, tornam-se mais vantajosas para a produção desta espécie, uma vez que um teor lipídico ideal irá compensar o excesso de proteína não sintetizada para o crescimento dos indivíduos que se iria depositar como reserva de energia ou excretada sob forma de N para o ambiente (NRC, 1993). Tal como demonstrado por Chatzifotis *et al.* (2012), quando estudou a interação dos níveis de lípidos e proteína em juvenis da mesma espécie. Estes resultados também foram verificados para outras espécies como salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) (Hillestad & Johnsen, 1994) ou halibute-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Hatlen, Grisdale-Helland, & Helland, 2005; Helland & Grisdale-Helland, 1998).

A falta de diferenças significativas entre os crescimentos dos diferentes tratamentos sugere que, no caso dos juvenis desta espécie, a temperatura da água poderá ter uma maior influência quanto ao seu crescimento.

Não existem muitos dados disponíveis quanto ao efeito da temperatura na composição bioquímica de corvina-legítima. Estudos com robalo (*Dicentrarchus labrax*), efetuados por Moreira *et al.*, (2008) e Oliva-Teles (2000), embora com resultados discrepantes entre si, demonstraram que a temperatura influenciava significativamente a composição bioquímica dos peixes. Médale *et al.* (1999), no seu estudo com carpa-comum (*Cyprinus carpio*), demonstrou que o conteúdo em lípidos das carcaças foi superior nos peixes cultivados a 18 °C, enquanto que a energia foi mais elevada naqueles que foram sujeitos a uma temperatura de 25 °C. No entanto, a retenção proteica não mostrou ter sido influenciada pela temperatura. Neste estudo, contrariamente aos anteriormente mencionados, nenhum efeito da temperatura da água foi apresentado na composição bioquímica das carcaças dos indivíduos, à exceção do teor em MS, que foi claramente superior em peixes tratados a 26 °C, comprovando assim a influência da temperatura no crescimento dos indivíduos.

Quanto aos tratamentos testados à temperatura mais elevada, a composição bioquímica das carcaças não mostrou ser afetada nem pelo incremento de proteína, nem pela fonte. Chatzifotis *et al.* (2012) também não verificou diferenças entre o conteúdo em proteína e cinza na composição corporal de juvenis desta espécie, quando estes foram alimentados com diferentes teores de proteína (40, 45, 50 e 53 de CP, em % de alimento). Quanto ao teor em lípidos, era esperado que este diminuísse com o aumento da proteína na dieta, no entanto, tal não foi verificado. Chatzifotis *et al.* (2012) verificou no seu estudo que juvenis de corvina-legítima alimentados com CP a 50%, obtiveram maior conteúdo em lípidos,

verificando que este grupo de peixes era o que apresentava maiores valores em TCE e PCF, coincidindo com o sucedido nos estudos de Lanari *et al.* (1999) e Vergara *et al.* (1996), com robalo (*Dicentrarchus labrax*) e dourada (*Sparus aurata*), respetivamente. Uma vez que neste estudo todos os tratamentos em HT obtiveram PCF e TCE similares, não se verificaram oscilações no conteúdo lipídico das carcaças entre tratamentos.

Sousa, (2016), demonstrou que o teor em energia presente nas carcaças de juvenis de corvina-legítima aumenta com o aumento da temperatura. O facto de os grupos de peixes em questão terem sido sujeitos a uma temperatura de 26 °C, considerada ótima para o crescimento da espécie, poderá ter influenciado a falta de diferenças entre tratamentos.

Peres & Oliva-Teles (1999), no seu estudo com robalo (*Dicentrarchus labrax*), também não foram observadas diferenças na composição bioquímica dos juvenis, quando os peixes tratados a 25 °C foram alimentados com 36, 42, 48 e 56% de CP.

A dieta CP55 ALT, que continha uma incorporação de 31,5% de farinhas de aves (FA), em alternativa a teores mais elevados de farinhas de peixe (FP), ao ser testada no presente estudo em juvenis de corvina-legítima, mostrou que a inclusão de FA em quantidades superiores a FP, não afetou negativamente o desenvolvimento dos animais cultivados a 26 °C, uma vez que não foram apresentadas quaisquer diferenças consideradas significativas, comparativamente com a dieta CP55 que continha o mesmo teor (quadro 3.3). Apesar de não existirem diferenças, verificou-se uma ligeira tendência nos peixes alimentados com esta dieta alternativa para crescerem mais que os demais, apresentando valores de PCF e TCE superiores aos restantes tratamentos em HT.

Através da observação do quadro 3.3, também se pode verificar que valores obtidos para TEP e RP, fazendo utilização da dieta CP55 ALT, se aproximaram dos valores considerados mais apelativos, obtidos para a dieta CP50.

A composição bioquímica dos animais também não mostrou diferenças significativas entre indivíduos que comeram 50 e 55% em CP com maior incorporação de FP, relativamente aos que se alimentaram com 55% em CP, mas com uma substituição das FP, por FA de 75%.

Corroborando os resultados obtidos neste estudo, quando o teor em FP foi substituído em 75% por FA, Dawson *et al.* (2018) indicou que a FP presente nas rações de juvenis de

serrano-estriado (*Centropristis striata*) pode ser substituída por FA até uma percentagem de 81,8 sem afetar a sobrevivência, crescimento, utilização de alimentos e composição bioquímica dos peixes, quando fez utilização de dietas que continham 44 e 15% em teor de CP e lípidos, respetivamente. Também Fontinha *et al.* (2020) e Karapanagiotidis *et al.* (2019), recentemente, publicaram estudos que indicam que juvenis de dourada (*Sparus aurata*) suportam valores de substituição de FP por FA de 83% e mais de 50%, respetivamente, sem que os seus valores de sobrevivência, crescimento, utilização de alimentos e composição bioquímica sejam comprometidos. No entanto, segundo o estudo de Karapanagiotidis *et al.* (2019), ainda para dourada (*Sparus aurata*), dietas com valores acima de 50% devem ser suplementadas com lisina e metionina, apontando o valor ótimo de 50% para dietas não suplementadas com estes aminoácidos essenciais.

O fígado é um órgão fundamental na morfologia dos peixes, uma vez que representa a principal reserva de lípidos e glicogénio do organismo (Bruslé & Anadon, 1996; McGoogan & Gatlin, 1999). O volume que este órgão ocupa no corpo dos peixes é dado pelo IHS e, pode servir como indicador de excesso de gordura no fígado.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a temperatura não afetou as reservas energéticas dos peixes em estudo, uma vez que os valores de IHS com o aumento da temperatura não revelaram diferenças significativas.

Por outro lado, o IHS mostrou ser afetado pelas dietas experimentais formuladas com maior percentagem de FP, sendo que um menor teor em CP, se traduziu num aumento em IHS. Indicando que menos disponibilidade de proteína para processos catabólicos de armazenamento de energia no fígado, dão lugar ao catabolismo de outras moléculas como polissacarídeos ou lípidos, para o mesmo efeito, originando valores de IHS mais elevados (Debnath *et al.*, 2007). A dieta que continha substituição de FP por FA (CP55 ALT), apesar de demonstrar valores mais próximos da dieta CP50, não mostrou diferir das demais quando ao IHS.

Esta tendência foi demonstrada por Fountoulaki *et al.* (2017), quando testou diferentes conteúdos em proteína (43 e 47, em % de alimento) e em lípidos (15 e 20, em % de alimento), para juvenis da espécie em estudo e por Yan *et al.* (2015), quando avaliou a influência da deposição lipídica no fígado em juvenis de roncadeira-amarela (*Larimichthys crocea*).

Através da observação histológica do fígado, verificou-se que todos os tratamentos (LT CP55, HT CP50, HT CP55 e HT CP55 ALT) apresentaram acumulação lipídica no fígado sob a forma de esteatose macro vesicular.

Nos peixes, tal como nos mamíferos, a esteatose hepática apresenta-se como um distúrbio associado à deposição excessiva de lípidos no fígado, que a longo prazo pode levar a uma disfunção metabólica por parte deste órgão e à libertação de radicais livres que resultam num processo inflamatório do organismo (Nassir *et al.*, 2015).

Este tipo de alteração morfológica do órgão hepático é comumente encontrado em peixes de aquacultura. Uma vez que a utilização de dietas artificiais promove a ingestão de lípidos e energia que por sua vez excedem a capacidade de oxidação de ácidos gordos por parte dos hepatócitos. O excesso de proteína nas dietas, tal como mencionado anteriormente, também pode comprometer a síntese proteica, resultando de uma deposição excessiva de triglicéridos nos vacúolos das células hepáticas (Couto *et al.*, 2016).

Esteatose do fígado também foi apresentada em estudos efetuados com dietas que continham diferentes níveis de substituição das FP por compostos vegetais (Ribeiro *et al.*, 2015). No entanto, o facto de se observarem fígados gordos em peixes produzidos em aquacultura, não quer dizer que estes venham a desenvolver doenças hepáticas mais graves (Benedito-Palos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2015).

De entre os tratamentos testados, não foram verificadas diferenças, quanto ao diâmetro médio dos hepatócitos (figura 4.2). Demonstrando que nem os diferentes níveis de proteína, nem as diferentes temperaturas tiveram efeito nos tecidos. Resultados idênticos foram obtidos por Güroy *et al.* (2017) e Ribeiro *et al.* (2015) em juvenis da mesma espécie, quando alimentados com diferentes níveis proteicos e diferentes percentagens de PV, respetivamente. No entanto, resultados discrepantes foram encontrados em outras espécies como o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e o achigã (*Micropterus salmoides*), quando os autores Dias *et al.* (2005) e Li *et al.* (2020), não verificaram a mesma tendência relativamente à deposição de lípidos no fígado, descrevendo que o teor e fonte proteicos podem afetar a deposição lipídica no fígado dos peixes.

## **5. Conclusão**

Tendo por base os objetivos colocados no início deste estudo, é possível concluir-se que a temperatura influencia claramente o crescimento de juvenis de corvina-legítima, uma vez que todos os parâmetros avaliados foram bastante favoráveis quando se utilizou uma temperatura de 26 °C, mostrando ser significativamente superiores, quando comparados com os resultados a uma temperatura de 22 °C.

Verificou-se também que a conjugação de uma temperatura da água ideal com uma dieta que contenha 50% de proteína (constituída maioritariamente por farinhas de peixe), maximiza o crescimento dos juvenis desta espécie, não sendo necessário sobrecarregar a indústria com gastos extra, em dietas com concentrações mais elevadas de proteína.

Quanto à dieta alternativa, verificou-se que fazendo utilização de temperaturas ideais, o crescimento de juvenis de corvina-legítima pode ser sustentado ou até melhorado, com a utilização de formulações dietéticas que contenham uma substituição de 75% de farinhas de peixe por farinhas de aves.

Assim, e transpondo todas as diferenças significativas e não significativas a uma escala industrial, pode afirmar-se que quanto à primazia das três variáveis estudadas que é preferível fazer uma produção desta espécie a 26 °C, e utilizar uma dieta com 75% de substituição das farinhas de peixe, por farinhas de aves. Estas dietas, para além de serem mais sustentáveis e estarem englobadas numa economia circular, representam custos significativamente mais baixos para as indústrias, uma vez que a proteína de aves utilizada neste estudo tem um preço médio a rondar os 660 € por tonelada, face aos 2100 € que custam as farinhas de peixe de alta qualidade também utilizadas neste estudo.

Futuramente, seria interessante fazer uma avaliação dos custos associados à formulação total das dietas utilizadas e dos custos energéticos que o aquecimento da água pode implicar em diferentes métodos de cultivo. Assim, seria possível avaliar se a redução da proteína, ou a utilização de dietas alternativas com o aumento da temperatura, seria realmente uma estratégia economicamente mais vantajosa para a produção desta espécie.

Estudos mais aprofundados para avaliar os impactos das dietas com altas inclusões de farinhas de aves, outros subprodutos, componentes nutricionais e micronutrientes para alimentação de corvina-legítima, também merecem uma investigação mais aprofundada

no futuro, uma vez que é de extremo interesse a minimização da utilização das farinhas de peixe em aquacultura.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abou Shabana, N. M., Abd El Rahman, S. H., Al Absawy, M. A., & Assem, S. S. (2012). Reproductive biology of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) inhabiting the south eastern Mediterranean Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, (38(2)), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.12.002>
- Albert G.J. Tacon. (1987). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp a training manual: the essential nutrients. <https://doi.org/http://www.fao.org/3/ab470e/AB470E02.htm>
- Amoedo, A. J. V. (2012). Determinação do requisito proteico em juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801). Retrieved from [papers3://publication/uuid/D4AD8ADC-2B8A-4DAE-BC58-F2AD92863F30](https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.12.002)
- Angelini, M.; Gilmozzi, M.; Larani, D.; Giorgi, G. (2002). Allevamento dell'ombrina bocca d'oro *Argyrosomus regius* (Asso). In *Ricerca per lo sviluppo dell'aquacoltura toscana: Risultati conseguiti* (D. Lanari and E. Tibaldi, eds.) (pp. 13–38). Verona, Italy: Cierre Grafica.
- AOAC. (2006). *Official Method of Analysis*. (18th ed.). (Dr. William Horwitz, Ed.), AOAC Press, Maryland, USA. MARYLAND, USA: AOAC INTERNATIONAL.
- APROMAR. (2020). *Aquaculture in Spain 2020*. Spanish Aquaculture Business Association. Cádiz: APROMAR.
- Auchterlonie, N. (2018). The continuing importance of fishmeal and fish oil in aquafeeds. In *Aquafarm Conference*. Pordenone, Italy, 15–16 February. Retrieved from [www.iffo.net/iffo-presentations](http://www.iffo.net/iffo-presentations)
- Barata, M., Soares, F., Aragão, C., Almeida, A. C., Pousão-Ferreira, P., & Ribeiro, L. (2016). Efficiency of 2-phenoxyethanol and Clove Oil for Reducing Handling Stress in Reared Meagre, *Argyrosomus regius* (Pisces: Sciaenidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(1), 82–92. <https://doi.org/10.1111/jwas.12245>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Benedito-Palos, L., Navarro, J. C., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2010). Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and fish oil. *Journal of Animal Science*, 88, 1759–1770. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2564>
- Besson, M., Vandeputte, M., van Arendonk, J. A. M., Aubin, J., de Boer, I. J. M., Quillet, E., & Komen, H. (2016). Influence of water temperature on the economic value of growth rate in fish farming: The case of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cage farming in the Mediterranean. *Aquaculture*, 462, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.030>
- Brett, J. R., & Groves, T. D. D. (1979). Physiological energetics. In W. Hoar & R. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, Vol.8 (1st ed., pp. 280–352). New York: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60029-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60029-1)
- Brill, R. W., Dewar, H., & Graham, J. B. (1994). Basic concepts relevant to heat transfer in fishes, and their use in measuring the physiological thermoregulatory abilities of tunas. *Environmental Biology of Fishes*, 40(2), 109–124. <https://doi.org/10.1007/BF00002538>
- Bruslé, J., & González i Anadon, G. (1996). The Structure and Function of Fish Liver. In H. M. Dutta & J. S. Datta-Mushi (Eds.), *Fish Morphology* (1st ed., pp. 77–93). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203755990-6>
- Cai, J., & Leung, P. (2017). Short-term projection of global fish demand and supply gaps. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*.
- Cárdenas, S. (2010). Crianza de la Corvina (*Argyrosomus regius*). *Cuadernos de Acuicultura*.

- Cárdenas, Salvador. (2009). Acuicultura de esciéndidos en el mundo y en Andalucía: el caso de las corvinas. In Curso sobre Avances de la Acuicultura Fundación de la Universidad de Málaga (pp. 1–7). Málaga, España: Fundación de la Universidad de Málaga.
- Catarino, C. M. (2017). Estudos morfológicos em modelos experimentais de fibrose: Quando os investigadores pretendem transformar uma imagem histológica num dado estatístico. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., & Divanach, P. (2012). Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture International*. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9443-y>
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M., Nengas, I., & Mylonas, C. C. (2010). Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture*, 307, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.002>
- Chatzifotis, S., Villamor Martin-Prat, A., Limberis, N., Papandroulakis, N., & Divanach, P. (2006). First data on growth of cultured brown meagre *Sciaena umbra* using diets with different protein and fat contents. *Fisheries Science*, 72(1), 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01120.x>
- Couto, A., Barroso, C., Guerreiro, I., Pousão-Ferreira, P., Matos, E., Peres, H., ... Enes, P. (2016). Carob seed germ meal in diets for meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles: Growth, digestive enzymes, intermediary metabolism, liver and gut histology. *Aquaculture*, 451, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.007>
- Cowey, C. B. (1995). Protein and amino acid requirements: A critique of methods. *Journal of Applied Ichthyology*, 11(3–4), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1995.tb00019.x>
- Dawson, M. R., Alam, M. S., Watanabe, W. O., Carroll, P. M., & Seaton, P. J. (2018). Evaluation of Poultry By-Product Meal as an Alternative to Fish Meal in the Diet of Juvenile Black Sea Bass Reared in a Recirculating Aquaculture System. *North American Journal of Aquaculture*, 80(1), 74–87. <https://doi.org/10.1002/naaq.10009>
- de Moura, L. B., Diógenes, A. F., Campelo, D. A. V., de Almeida, F. L. A., Pousão-Ferreira, P. M., Furuya, W. M., ... Oliva-Teles, A. (2019). Nutrient digestibility, digestive enzymes activity, bile drainage alterations and plasma metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) fed high plant protein diets supplemented with taurine and methionine. *Aquaculture*, 511(May), 734231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734231>
- Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Baruah, K., Yengkokpam, S., Das, T., & Manush, S. M. (2006). Thermal tolerance and metabolic activity of yellowtail catfish *Pangasius pangasius* (Hamilton) advanced fingerlings with emphasis on their culture potential. *Aquaculture*, 258, 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.037>
- Debnath, D., Pal, A. K., Sahu, N. P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., & Venkateshwarlu, G. (2007). Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 146(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.008>
- DGRM. (2020). Política de Conservação dos Recursos. Retrieved from <https://www.dgrm.mm.gov.pt/politica-de-conservacao-dos-recursos>
- Dias, J., Alvarez, M. J., Arzel, J., Corraze, G., Diez, A., Bautista, J. M., & Kaushik, S. J. (2005). Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.07.005>
- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A., Sánchez, L. N., Leyva, G., & Valenzuela, F. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*, 38(13), 1387–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01817.x>

- Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro de 2010 , relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. (n.d.). Retrieved from <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries (European Commission). (2019). The EU Fish Market. Italy: EUMOFA. <https://doi.org/10.2771/168390>
- Duncan, N. J.; Estévez, A.; Fernández-Palacios, H.; Hernández-Cruz, C. M.; Roo, J.; Schuchardt, D. (2013). Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. In G. Allan (Ed.), Advances in aquaculture hatchery technology (pp. 519–541). Cambridge: Woodhead Publishing. <https://doi.org/2012953436>
- El-Dahhar, A. A., Abd El Rahim, M., & Elebiary, H. E. (2016). Effect of Dietary Protein Levels on the Growth Performance, Survival and Feed Utilization of Juvenile Meagre (*Argyrosomus regius*) Reared under Intensive Culture System = على البروتين مستويات تأثير تحت اللوت لأسماك الغذاء من والإستفادة والإعاشة النمو كفاءة. Journal of The Arabian Aquaculture Society, 11(6), 81–94. <https://doi.org/10.12816/0043177>
- El-Sayed, A. F. M. (1998). Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), feeds. Aquaculture Research, 29, 275–280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00199.x>
- El-Shebly, A. A., El-Kady, M. A. H., Hussin, A. B., & Hossain, M. Y. (2007). Preliminary observations on the pond culture of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) (Sciaenidae) in Egypt. Journal of Fisheries and Aquatic Science.
- Elliott, J. M. (1975). The Growth Rate of Brown Trout (*Salmo trutta* L.) Fed on Maximum Rations. The Journal of Animal Ecology, 44, 805–821. <https://doi.org/10.2307/3720>
- Estévez, A., Treviño, L., Kotzamanis, Y., Karacostas, I., Tort, L., & Gisbert, E. (2011). Effects of different levels of plant proteins on the ongrowing of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles at low temperatures. Aquaculture Nutrition, 17(2), 572–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00798.x>
- Eurostat. (2020). Eurostat - Statistical office of the European Union. Retrieved February 10, 2020, from <https://ec.europa.eu/eurostat/web/fisheries/data/database>
- FAO. (1997). Aquaculture production statistics 1986-1995. Rome, Italy. Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/abstract/19971407511>
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, contributing to food security and nutrition for all. Food Agriculture Organisation. Rome, Italy.
- FAO. (2018a). The state of world fisheries and aquaculture 2018, meeting the sustainable development goals. Food Agriculture Organisation. Rome, Italy.
- FAO. (2018b). World Aquaculture Performance Indicators (WAPI) - Information, Knowledge and Capacity for Blue Growth. Aquaculture newsletter. Rome, Italy.
- FAO. (2020). The state of world fisheries and aquaculture 2020, sustainability in action. Food Agriculture Organisation. Rome, Italy.
- FAO (Fisheries and Aquaculture Management Division). (2011). AQUACULTURE DEVELOPMENT 5. Use of wild fish as feed in aquaculture (1st ed.). Rome, Italy: FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/documents/card/en/c/245a5cf3-35d6-5e09-98d1-3b46031be1f2>
- Fernandes, J. P. C. L. (2013). Optimizing the dietary protein:lipid ratio on meagre (*Argyrosomus regius*): effects on growth and lipid deposition. MSc Thesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Retrieved from [papers3://publication/uuid/A087CECD-4091-4D1B-9D43-74CA138B5DE3](https://publicacion.uuid/A087CECD-4091-4D1B-9D43-74CA138B5DE3)
- Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). ImageJ User Guide User Guide ImageJ. Image J user Guide. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Fontinha, F., Magalhães, R., Moutinho, S., Santos, R., Campos, P., Serra, C. R., ... Peres, H. (2020). Effect of dietary poultry meal and oil on growth, digestive capacity, and gut microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture, 530(8), 10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735879>

- Fountoulaki, E., Grigorakis, K., Kounna, C., Rigos, G., Papandroulakis, N., Diakogeorgakis, J., & Kokou, F. (2017). Growth performance and product quality of meagre (*Argyrosomus regius*) fed diets of different protein/lipid levels at industrial scale. *Italian Journal of Animal Science*, 16(4), 685–694. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1305259>
- Froehlich, H. E., Gentry, R. R., Rust, M. B., Grimm, D., & Halpern, B. S. (2017). Public perceptions of aquaculture: Evaluating spatiotemporal patterns of sentiment around the world. *PLoS ONE*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169281>
- Froehlich, H. E., Jacobsen, N. S., Essington, T. E., Clavelle, T., & Halpern, B. S. (2018). Avoiding the ecological limits of forage fish for fed aquaculture. *Nature Sustainability*, 1, 298–303. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0077-1>
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In W. Hoar & R. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 6 (1st ed., pp. 1–98). New York: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60146-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60146-6)
- Gadomski, D. M., & Caddell, S. M. (1991). Effects on temperature on early-life-history stages of California halibut *Paralichthys californicus*. *Fishery Bulletin*, 89(4), 567–576.
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., ... Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- González-Quirós, R., del Árbol, J., García-Pacheco, M. M., Silva-García, A., J., Naranjo, J., M., Morales-Nin, B. (2011). Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*, 109(1), 140–149.
- Griffiths, M. H., & Heemstra, P. C. (1995). A contribution to the taxonomy of the marine fish genus *Argyrosomus* (Perciformes: Sciaenidae), with descriptions of two new species from Southern Africa. *Ichthyological Bulletin*, 65, 1–40.
- Guardiola, F. A., Barroso, C., Enes, P., Couto, A., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., ... Costas, B. (2018). Humoral and mucosal immune responses in meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles fed diets with varying inclusion levels of carob seed germ meal. *Fish and Shellfish Immunology*, 79(January), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.027>
- Guerreiro, I., Castro, C., Antunes, B., Coutinho, F., Rangel, F., Couto, A., ... Enes, P. (2020). Catching black soldier fly for meagre: Growth, whole-body fatty acid profile and metabolic responses. *Aquaculture*, 516, 734613. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734613>
- Güroy, D., Karadal, O., Güroy, B., Mantoğlu, S., Çelebi, K., Şimşek, O., ... Genç, E. (2017). The effects of dietary protein levels with amino acid supplementation on the growth performance, haematological profile and histology of meagre (*Argyrosomus regius*) in two different size classes. *Aquaculture Research*, 48(12), 5751–5764. <https://doi.org/10.1111/are.13398>
- Haffray, P., Malha, R., Ould Taleb Sidi, M., Prista, N., Hassan, M., Castelnaud, G., ... Bonhomme, F. (2012). Very high genetic fragmentation in a large marine fish, the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae, Perciformes): Impact of reproductive migration, oceanographic barriers and ecological factors. *Aquatic Living Resources*, 25(2), 173–183. <https://doi.org/10.1051/alr/2012016>
- Halver, E., Hardy, W. (2003). Nutrient Flow and Retention. In *Fish Nutrition* (3rd ed., pp. 755–770). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50015-X>.
- Handeland, S. O., Imsland, A. K., & Stefansson, S. O. (2008). The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture*, 283, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.042>

- Harari, Y. N. (2014). *Sapiens A Brief History Of Humankind*. (Elsinore, Ed.) (20th ed.). Retrieved from <https://archive.org/details/HarariSapiensABriefHistoryOfHumankindRuLitMe456424/page/n315/mode/2up>
- Hasan, M. R. (2001). Nutrition and Feeding for Sustainable Aquaculture Development in the Third Millennium. In *Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium*. (pp. 193–219). Mymensingh 2202, Bangladesh.: Department of Aquaculture, Bangladesh Agricultural University.
- Hatlen, B., Grisdale-Helland, B., & Helland, S. J. (2005). Growth, feed utilization and body composition in two size groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in protein and carbohydrate content. *Aquaculture*, 249(1–4), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.040>
- Helland, S. J., & Grisdale-Helland, B. (1998). Growth, feed utilization and body composition of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. *Aquaculture*, 166(4), 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00273-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00273-7)
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountaulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future | Elsevier Enhanced Reader. *Animal Feed Science and Technology*, 203(1), 1–22.
- Hernández, M. D., Martínez, F. J., Jover, M., & García García, B. (2007). Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture*, 263(1–4), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.040>
- Hillestad, M., & Johnsen, F. (1994). High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture*, 124(1–4), 109–116. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90366-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90366-2)
- Homrich, A. S., Galvão, G., Abadia, L. G., & Carvalho, M. M. (2018). The circular economy umbrella: Trends and gaps on integrating pathways. *Journal of Cleaner Production*, 175, 525–543. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.064>
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., ... Strugnell, J. M. (2019). The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. *One Earth*, 1, 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2019.10.018>
- Imsland, A. K., Sunde, L. M., Folkvord, A., & Stefansson, S. O. (1996). The interaction of temperature and fish size on growth of juvenile turbot. *Journal of Fish Biology*. <https://doi.org/10.1006/jfbi.1996.0222>
- Imsland, Albert K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M. H. G., FitzGerald, R., Bonga, S. W., ... Stefansson, S. O. (2001). The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00507-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00507-5)
- INE. (2020). *Estatísticas da Pesca 2019*. Lisboa.
- Jancsary, N. L. (2017). Virtual Archaeology: Remains of a Roman Villa in the Bay of Stari Trogir, Central Dalmatia. *Interdisciplinaria Archaeologica - Natural Sciences in Archaeology*, VIII, 145–155. <https://doi.org/10.24916/iansa.2017.2.4>
- Jiménez, M. T.; Pastor, E.; Grau, A.; Alconchel, J. I.; Cárdenas, Y. S. (2005). Revisión sobre el cultivo de esciéndidos en el mundo y presentación del plan nacional de cría de corvina (*Argyrosomus regius*). In *X Congreso Nacional de Acuicultura* (pp. 396–397). València.
- Jobling, M. (1994). *Fish bioenergetics*. (Chapman & Hall, Ed.), *Fish bioenergetics* (1st.). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)90056-x](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)90056-x)
- Jobling, M. (2011). Energetic models | *Bioenergetics in Aquaculture Settings*. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 1964–1974). Tromsø, Norway: Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00152-0>

- Jobling, Malcolm. (1995). The influence of environmental temperature on growth and conservation efficiency in fish. In U. of T. NFH (Ed.), *Causes of Observed Variations in Fish Growth* (pp. 1–26). Tromsø, Norway.
- Jobling, Malcolm. (2016). Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International*, 24, 767–786. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>
- Jonsson, B., Forseth, T., Jensen, A. J., & Næsje, T. F. (2001). Thermal performance of juvenile Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Functional Ecology*, 15, 701–711. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00572.x>
- Karapanagiotidis, I. T., Psoufakis, P., Mente, E., Malandrakis, E., & Golomazou, E. (2019). Effect of fishmeal replacement by poultry by-product meal on growth performance, proximate composition, digestive enzyme activity, haematological parameters and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 25(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/anu.12824>
- Kır, M., Sunar, M. C., & Altındağ, B. C. (2017). Thermal tolerance and preferred temperature range of juvenile meagre acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 65, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.018>
- Kureshy, N., Davis, D. A., & Arnold, C. R. (2000). Partial Replacement of Fish Meal with Meat-and-Bone Meal, Flash-Dried Poultry By-Product Meal, and Enzyme-Digested Poultry By-Product Meal in Practical Diets for Juvenile Red Drum. *North American Journal of Aquaculture*, 62, 266–272. [https://doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)062<0266:profmw>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8454(2000)062<0266:profmw>2.0.co;2)
- Lanari, D., Poli, B. M., Ballestrazzi, R., Lupi, P., D'Agaro, E., & Mecatti, M. (1999). The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture*, 179(1–4), 351–364. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00170-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00170-2)
- Lem, A., Bjørndal, A., & Lappo, T. (2014). Economic analysis of supply and demand for food up to 2030 (Vol. 1089).
- Li, X., Zheng, S., Ma, X., Cheng, K., & Wu, G. (2020). Effects of dietary protein and lipid levels on the growth performance, feed utilization, and liver histology of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Amino Acids*, 52(6–7), 1043–1061. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02874-9>
- Lionello, P., Abrantes, F., Gacic, M., Planton, S., Trigo, R., & Ulbrich, U. (2014). The climate of the Mediterranean region: research progress and climate change impacts. *Regional Environmental Change*, 14, 1679–1684. <https://doi.org/10.1007/s10113-014-0666-0>
- Lovell, T. (1998a). Nutrition and Fish Health. In *Nutrition and Feeding of Fish*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4909-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4909-3_6)
- Lovell, T. (1998b). The Nutrients. In *Nutrition and Feeding of Fish* (pp. 11–71). Springer, Boston. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1174-5>
- Lund, E. K. (2013). Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? In *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.034>
- Manninen, K., Koskela, S., Antikainen, R., Bocken, N., Dahlbo, H., & Aminoff, A. (2018). Do circular economy business models capture intended environmental value propositions? *Journal of Cleaner Production*, 171, 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.003>
- Martinez-Llorens, S., Espert, J., Moya, J., Cerda, M. J., Tomas-Vidal, A. (2011). Growth and nutrient efficiency of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fed extruded diets with different protein and lipid levels. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 3(10), 195–203. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/10251/36508>
- Martoja, R.; Martoja-Pierson, M. (1970). *Técnicas de histología animal*. Barcelona: Toray-Masson, S. A.
- Matias, A. C., Dias, J., Barata, M., Araujo, R. L., Bragança, J., & Pousão-Ferreira, P. (2020). Taurine modulates protein turnover in several tissues of meagre juveniles. *Aquaculture*, 528(March), 9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735478>

- McCauley, R. W., & Huggins, N. W. (1979). Ontogenetic and non-thermal seasonal effects on thermal preferences of fish. *Integrative and Comparative Biology*, 19(1), 267–271. <https://doi.org/10.1093/icb/19.1.267>
- McGoogan, B. B., & Gatlin, D. M. (1999). Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*. I. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture*, 178, 333–348. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00137-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00137-4)
- Médale, F., Poli, J. M., Vallée, F., & Blanc, D. (1999). Comparaison de l'utilisation digestive et métabolique d'un régime riche en glucides par la carpe à 18°C ET 25°C. *Cybiuim*, 23(2), 139–152. <https://doi.org/http://sfi-cybiuim.fr/en/node/1674>
- Meeuwig, M. H., Dunham, J. B., Hayes, J. P., & Vinyard, G. L. (2004). Effects of constant and cyclical thermal regimes on growth and feeding of juvenile cutthroat trout of variable sizes. *Ecology of Freshwater Fish*, 13, 208–216. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2004.00052.x>
- Merella, P., Cherchi, S., Garippa, G., Fioravanti, M. L., Gustinelli, A., & Salati, F. (2009). Outbreak of *Sciaenacotyle panceri* (Monogenea) on cage-reared meagre *Argyrosomus regius* (Osteichthyes) from the western Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(2), 169–173. <https://doi.org/10.3354/dao02115>
- Mohanta, K. N.; Mohanty, S. N.; Jena, J.; Sahu, N. P. (2007). Effect of different oil cake sources on growth, nutrient retention and digestibility, muscle nucleic acid content, gut enzyme activities and whole-body composition in silver barb, *Puntius gonionotus* fingerlings. *Aquaculture Research*, 38(16), 1702–1713. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01836.x>
- Monfort, M. C. (2010). Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. *GFCM. Studies and Reviews*.
- Moreira, I. S., Peres, H., Couto, A., Enes, P., & Oliva-Teles, A. (2008). Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 274(1), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.016>
- Morgan, E. F. (1994). *Human Adaptability: An Introduction To Ecological Anthropology*. (TAYLOR & FRANCIS INC, Ed.) (12th–2007th ed.).
- Moutinho, S., Pedrosa, R., Magalhães, R., Oliva-Teles, A., Parisi, G., & Peres, H. (2020). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae larvae meal in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on liver oxidative status and fillet quality traits during shelf-life. *Aquaculture*, 736080. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736080>
- Nash, C. E. (2011). *The History of Aquaculture* (1st ed.). Ames, IA, United States: Iowa State University Press.
- Nassir, F., Rector, R. S., Hammoud, G. M., & Ibdah, J. A. (2015). Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis. *Gastroenterology and Hepatology*, 11(3), 167–175.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., ... Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405, 1017–1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>
- Nogueira, N., Cordeiro, N., Andrade, C., & Aires, T. (2012). Inclusion of low levels of blood and feathermeal in practical diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12(3), 641–650. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12\\_3\\_12](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12_3_12)
- NRC (National Research Council). (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- NRC (National Research Council). (2012). Nutrient requirements of fish and shrimp. *Aquaculture International*, 20, 601–602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10499-011-9480-6>

- Oliva-Teles, A. (2000). Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture International*, 8(6), 477–492. <https://doi.org/10.1023/A:1009236517555>
- Oliva-Teles, A., Enes, P., & Peres, H. (2015). Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100506-4.00008-8>
- ONU. (2019a). World Population Prospects, The 2019 Revision - Volume I: Comprehensive Tables (ST/ESA/SER.A/426). World Population Prospects, The 2019 Revision - Volume I: Comprehensive Tables (ST/ESA/SER.A/426). United Nations. <https://doi.org/10.18356/15994a82-en>
- Parés-Sierra, G., Durazo, E., Ponce, M. A., Badillo, D., Correa-Reyes, G., & Viana, M. T. (2014). Partial to total replacement of fishmeal by poultry by-product meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect on fatty acids from muscle tissue and the time required to retrieve the effect. *Aquaculture Research*, 45, 1459–1469. <https://doi.org/10.1111/are.12092>
- Parisi, G., Terova, G., Gasco, L., Piccolo, G., Roncarati, A., Moretti, V. M., ... Pais, A. (2014). Current status and future perspectives of Italian finfish aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1007/s11160-013-9317-7>
- Peres, H., & Oliva-Teles, A. (1999). Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170(3), 337–348. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00422-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00422-0)
- Person-Le Ruyet, J., Buchet, V., Vincent, B., Le Delliou, H., & Quéméner, L. (2006). Effects of temperature on the growth of pollack (*Pollachius pollachius*) juveniles. *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.029>
- Person-Le Ruyet, J., Mahé, K., Le Bayon, N., & Le Delliou, H. (2004). Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 237, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.021>
- Poli, B. M., Zampacavallo, G., Iurzan, F., Mecatti, M., Lupi, P., & Bonelli, A. (2003). Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): Body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International*, 11(3), 301–311. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0043286188&partnerID=40&md5=29365bc00a3bf197fd122ab2e5bcd330>
- Pollard, D.A. & Bizsel, K. (2020). *Argyrosomus regius*. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T198706A130099146.en>
- Prista, N., Costa, J. L., Costa, M. J., & Jones, C. M. (2007). New methodology for studying large valuable fish in data poor situations: commercial mark-recapture of meagre (*Argyrosomus regius*) in the southern coast of Portugal, ICES CM/O:(January), 18.
- Prista, N., Jones, C. M., Costa, J. L., & Costa, M. J. (2008). Inferring fish movements from small-scale fisheries data: the case of *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) in Portugal. ICES CM 2008/K:19. Fisheries (Bethesda), 19.
- Quéméner, L. (2002). *Le Maigre Commun (Argyrosomus regius): Biologie, Pêche, Marché et Potentiel Aquacole*. (Ifremer, Ed.) (1ère édit). Plouzané, France: Editions Quae.
- Quéméner, L., Suquet, M., Mero, D., & Gaignon, J. L. (2002). Selection method of new candidates for finfish aquaculture: The case of the French Atlantic, the Channel and the North Sea coasts. *Aquatic Living Resources*, 15(5), 293–302. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(02\)01187-7](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(02)01187-7)
- Quero, J.-C., & Vayne, J.-J. (1987). Le maigre, *Argyrosomus regius* (asso, 1801) (Pisces, Perciformes, Sciaenidae) du Golfe de Gascogne et des eaux plus septentrionales. *Revue Des Travaux de l'institut de Pêches Maritimes*.

- Raven, P. H., Johnson, G. B., Mason, K. A., Losos, J. B., and Singer, S. R. (2011). Proteins: Molecules with Diverse Structures and Functions. In *Biology* (9th ed., pp. 44–52). New York: McGraw-Hill.
- Regulamento (UE) 2017/1017 da Comissão, de 15 de junho de 2017, que altera o Regulamento (UE) n.º 68/2013 relativo ao Catálogo de matérias-primas para alimentação animal. (n.d.). Retrieved from <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/1017/oj>
- Regulamento (UE) 2017/893 da Comissão, de 24 de maio de 2017, que altera os anexos I e IV do Regulamento (CE) n.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho e os anexos X, XIV e XV do Regulamento (UE) n.º 142/2011 da Comissão no que respeita às disposiç. (n.d.).
- Regulamento (UE) 56/2013 da comissão, de 16 de janeiro de 2013 que altera os anexos I e IV do Regulamento (CE) n.o 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopati. (n.d.). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0056&from=PL>
- Ribeiro, L., Moura, J., Santos, M., Colen, R., Rodrigues, V., Bandarra, N., ... Dias, J. (2015). Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 447, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.017>
- Ribeiro, L., Soares, F., Quental-Ferreira, H., Gonçalves, A., & Pousão-Ferreira, P. (2013). Portuguese Research Studies on Meagre Production In Earthen Ponds. *Global Aquaculture Advocate*, 16, 38–40.
- Riche, M. (2015). Nitrogen utilization from diets with refined and blended poultry by-products as partial fish meal replacements in diets for low-salinity cultured Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture*, 435, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.001>
- Saavedra, M., Pereira, T. G., Candeias-Mendes, A., Carvalho, L., Pousão-Ferreira, P., & Conceição, L. E. C. (2018). Effect of increased dietary protein level in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile growth and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1153–1159. <https://doi.org/10.1111/anu.12654>
- Saavedra, Margarida, Pereira, T. G., Grade, A., Barbeiro, M., Pousão-Ferreira, P., Quental-Ferreira, H., ... Gonçalves, A. (2015). Farmed meagre, *Argyrosomus regius* of three different sizes: What are the differences in flesh quality and muscle cellularity? *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1311–1316. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12769>
- Sainsbury, J. C. (1986). *Commercial fishing methods: an introduction to vessels and gears*. (Fishing News Books Ltd, Ed.) (1st ed.).
- Sakamoto, K., Miyazaki, A., & Taniguchi, N. (2010). Thermal tolerance traits of redfin velvetfish *Paracentropogon rubripinnis* evaluated using their caudal fin cells. *Aquaculture*, 308, 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.042>
- Senior, A. W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., ... Hassabis, D. (2020). Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, 577(7792), 706–710. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1923-7>
- Shepherd, C. J., & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: Inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*, 83(4), 1046–1066. <https://doi.org/10.1111/jfb.12224>
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., & Rema, P. (2015). Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0453-9>

- Soares, F., Ribeiro, L., Gamboa, M., Duarte, S., Mendes, A. C., Castanho, S., ... Pousão-Ferreira, P. (2015). Comparative analysis on natural spawning of F1 meagre, *Argyrosomus regius*, with wild broodstock spawns in Portugal. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(6), 1509–1514. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0103-4>
- Soares, F., Roque, A., & Gavaia, P. J. (2018). Review of the principal diseases affecting cultured meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture Research*. <https://doi.org/10.1111/are.13613>
- Sousa, S. (2016). Efeito combinado da temperatura e da proteína na performance de crescimento de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*). MSc Thesis. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
- Steffens, W. (1994). Replacing fish meal with poultry by-product meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 124, 27–34. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90351-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90351-4)
- Stipa, P.; Angelini, M. (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyrosomus regius*. Retrieved August 20, 2020, from [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus\\_regius/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Argyrosomus_regius/en)
- Subasinghe, R., Soto, D., & Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x>
- Suja, B., Phillips, H., Lochmann, R., & Chen, R. (2009). Effect of Temperature on Growth, Feed Utilization, and Immune Status of Channel Catfish in a Recirculating System. *North American Journal of Aquaculture*, 71(1), 64–72. <https://doi.org/10.1577/a07-101.1>
- Suquet, M., Divanach, P., Hussenot, J., Coves, D., Fauvel, C. (2009). Pisciculture marine de “nouvelles espèces” d'élevage pour l'Europe. Synthèse domestication et transferts d'espèces. *Cahiers Agricultures*, 18(n° 2 – 3), 148–156.
- Tacon, A. G. J., Hasan, M. R., & Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: Trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* (Vol. 564). Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/015/ba0002e/ba0002e.pdf>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 258(1), 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2015). Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 23, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Tacon, A., Hasan, M., & Subasinghe, R. (2006). Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications.
- Takagi, S., Hosokawa, H., Shimeno, S., Ukawa, M. (2000). Utilization of Poultry By-Product Meal in a Diet for Red Sea Bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66, 428–438. <https://doi.org/10.2331/suisan.66.428>
- Ternengo, S., Agostini, S., Quilichini, Y., Euzet, L., & Marchand, B. (2010). Intensive infestations of *Sciaenocotyle panzerii* (monogenea, microcotylidae) on *Argyrosomus regius* (asso) under fish-farming conditions. *Journal of Fish Diseases*, 33(1), 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01094.x>
- Thoman, E. S., Davis, D. A., & Arnold, C. R. (1999). Evaluation of growout diets with varying protein and energy levels for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 176(3–4), 343–353. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00118-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00118-0)
- Tusche, K., Arning, S., Wuertz, S., Susenbeth, A., & Schulz, C. (2012). Wheat gluten and potato protein concentrate - Promising protein sources for organic farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 344–349, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.009>

- Velazco-Vargas, J., Tomás-Vidal, A., Hamdan, M., Moyano López, F. J., Jover Cerda, M., & Martínez-Llorens, S. (2014). Influence of digestible protein levels on growth and feed utilization of juvenile meagre *Argyrosomus regius*. *Aquaculture Nutrition*, 20(5), 520–531. <https://doi.org/10.1111/anu.12105>
- Velazco-Vargas, Jorge, Martínez-Llorens, S., Cerda, M. J., & Tomás-Vidal, A. (2013). Evaluation of soybean meal as protein source for *Argyrosomus Regius* (Asso, 1801) (Sciaenidae). *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 5(3), 35–44. <https://doi.org/10.5897/IJFA12.062>
- Vergara, J. M., Robainà, L., Izquierdo, M., & De La Higuera, M. (1996). Protein Sparing Effect of Lipids in Diets for Fingerlings of Gilthead Sea Bream. *Fisheries Science*, 62(4), 624–628. <https://doi.org/10.2331/fishsci.62.624>
- Wan, A. H. L., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R., & Johnson, M. P. (2019). Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 458–492. <https://doi.org/10.1111/raq.12241>
- Wang, Y., Guo, J. L., Bureau, D. P., & Cui, Z. H. (2006). Replacement of fish meal by rendered animal protein ingredients in feeds for cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture*, 252(2–4), 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.018>
- Wang, Y., Wang, F., Ji, W. X., Han, H., & Li, P. (2015). Optimizing dietary protein sources for Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) with an emphasis on using poultry by-product meal to substitute fish meal. *Aquaculture Research*, 46, 874–883. <https://doi.org/10.1111/are.12242>
- Watanabe, T. (2002). Method to estimate the population density of the snow crab *Chionoecetes opilio* using a deep-sea video monitoring system on a towed sledge. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 68(1), 101–104. <https://doi.org/10.6090/jarq.36.51>
- Watson, A. M., Buentello, A., & Place, A. R. (2014). Partial replacement of fishmeal, poultry by-product meal and soy protein concentrate with two non-genetically modified soybean cultivars in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 434, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.003>
- Whitehead, P. J. P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J., & Tortonese, E. (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Copeia (Vol. I–III). Paris: UNESCO. <https://doi.org/10.2307/1444931>
- Wolff, W. J. (2000). The south-eastern North Sea: Losses of vertebrate fauna during the past 2000 years. *Biological Conservation*, 95(2), 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00035-5)
- World Bank. (2013). *Fish to 2030: Prospects for fisheries and aquaculture - World Bank Report Number 83177-GLB*. Agriculture and Environmental Services Discussion Paper. <https://doi.org/83177-GLB>
- WWF. (2012). *The 2050 Criteria. Guide to Responsible Investment in Agricultural, Forest and Seafood Commodities*. Washington D.C.
- Yan, J., Liao, K., Wang, T., Mai, K., Xu, W., & Ai, Q. (2015). Dietary lipid levels influence lipid deposition in the liver of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) by regulating lipoprotein receptors, fatty acid uptake and triacylglycerol synthesis and catabolism at the transcriptional level. *PLoS ONE*, 10(6), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129937>
- Yarnold, J., Karan, H., Oey, M., & Hankamer, B. (2019). Microalgal Aquafeeds As Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science*, 24(10), 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.005>
- Zaman, A. U. (2015). A comprehensive review of the development of zero waste management: Lessons learned and file:///Users/jessicaredden/Desktop/Urban growth and waste management ZW City.pdf guidelines. *Journal of Cleaner Production*, 91, 12–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.12.013>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. (A. Nazuk, Ed.) (4th ed.). Universidade de Michigan: Prentice Hall, London.



## **7. Anexos**

### **7.1. Anexo I: Protocolo de Histologia**

- Desidratação e impregnação em parafina

De modo a obter os blocos para a realização dos cortes histológicos, os tecidos foram processados, utilizando um processador automático de tecidos *Leica® TP 1020* (Leyca, Vienna, Áustria), passando pelo processo de desidratação em várias concentrações de etanol (70%, 90%, 96%, 99% I e 99% II), mantendo desta forma a integridade dos tecidos. Seguidamente, pelo processo de diafanização utilizando xilol (xilol I e xilol II), que permite que o álcool presente nos tecidos seja substituído por este solvente que facilita o processo de impregnação. Por fim, passa-se ao processo de impregnação, por parafina líquida (56-58°C), tendo cada banho uma duração de cerca de 60 minutos.

Após o seu processamento e, de modo a conferir suporte aos tecidos, estes foram incluídos em parafina, com auxílio de um aparelho de inclusão *Leica® EG 1140 H* (Leyca, Vienna, Áustria), para a obtenção de blocos facilmente manejáveis, possibilitando uma boa microtomia dos blocos.

- Microtomia dos blocos

Os cortes histológicos foram efetuados num micrótopo *Leica® RM-2155* (Leyca, Vienna, Áustria), em secções de 5µm. Para a seleção do melhor corte e remoção de pregas, estes foram colocados em banho-maria (35°C e marca do equipamento), e aderidos às respetivas lâminas de vidro, que foram organizadas e colocadas em estufa, (marca) a 36°C, durante 24 horas, de modo a ficarem secas para posterior coloração.

- Coloração dos tecidos

As preparações histológicas, antes da sua montagem, foram coradas manualmente utilizando a técnica HE. Esta técnica de coloração é uma das mais utilizadas, pois mostra uma ampla gama de componentes celulares e tecidos. A hematoxilina apresenta uma coloração púrpura que cora os ácidos nucleicos, a eosina tem uma cor rosada e cora proteínas na sua generalidade. Com esta técnica o citoplasma e a matriz celular apresentam um espectro de tonalidades em rosa e os núcleos celulares coloração azul.

Para dar início ao processo de coloração foi feita uma desparafinação em xilol (xilol I – 10 minutos e xilol II – 5 minutos), uma hidratação com várias concentrações de etanol (100%, 95%, 70%) e água corrente, tendo cada banho 5 minutos de duração. Para a coloração fez-se um banho de 2 minutos de hematoxilina de *Mayer*, lavagem de 5 minutos de água corrente, mergulho rápido em solução diferenciadora (HCl a 0,5% em etanol 80%), nova lavagem em água corrente durante 5 minutos, banho em eosina a 1%, durante 1 minuto e, por fim, passagem rápida em água corrente para que não perdesse a coloração. No final voltou-se a desidratar as preparações, passando as lâminas três vezes em etanol a 100% (I, II e III) e a diafanizar duas vezes em xilol (I e II).

Após a coloração, as lâminas foram montadas, de modo a obter-se preparações histológicas definitivas. Para tal, foi colocada uma gota de meio de montagem Distreno Plastificante Xileno (DPX) sobre o corte, tendo sido finalizado com uma lamela. A secagem das preparações foi feita durante 72h.