

*Avaliar o impacto de duas temperaturas em biomarcadores de
crescimento e de stress no cultivo de corvina-legítima
(*Argyrosomus regius* (Asso, 1801))*

Miguel Mergulhão da Silva Ferrão Antunes

2022

*Avaliar o impacto de duas temperaturas em biomarcadores de
crescimento e de stress no cultivo de corvina-legítima
(*Argyrosomus regius* (Asso, 1801))*

Miguel Mergulhão da Silva Ferrão Antunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Pedro Pousão Ferreira (IPMA) e Doutora Cátia Lourenço Marques (IPMA), com coorientação da Professora Teresa Baptista (IPL, ESTM)

O conteúdo do trabalho apresentado é da exclusiva responsabilidade do autor, Miguel Mergulhão da Silva Ferrão Antunes.

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.

“First they ignore you, then they laugh at you, then they fight you, then you win.”

- Mahatma Gandhi

“The Best Is Yet to Come”

- Frank Sinatra

Dedico esta dissertação à minha avó Ana Mergulhão.

Porque tudo o que sou hoje foi fruto do teu amor e educação.

A única coisa que a minha avó queria antes de falecer era que eu acabasse o mestrado e por ela continuo a espelhar o seu amor, humildade e dedicação na vida, perpetuando a sua luta diária .



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, meios disponíveis para o cultivo, amostragens biológicas e análises laboratoriais. O 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.

Este trabalho foi financiado pelo projeto DIVERSIAQUA II – Diversificação, Inovação e Desenvolvimento da Aquacultura em Portugal (MAR2020-P02M01-0656P), liderado pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera I.P. (IPMA).

Agradecimentos

Porque é impossível viver esta vida e completar algumas fases importantes sem as pessoas que nos são próximas, quero agradecer em particular às seguintes pessoas:

Ao Doutor Pedro Pousão Ferreira por ter aceite fazer parte da orientação desta dissertação, por me ter permitido fazer parte da EPPO e conhecer todas as pessoas que considero família possibilitando desenvolver as minhas aptidões na investigação do setor da Aquacultura.

À Doutora Cátia Lourenço Marques por também ter aceite fazer parte da orientação deste trabalho e porque toda a sua ajuda e paciência foi fundamental para a realização deste estudo.

À professora Teresa Baptista por ter aceite coorientar-me e por ter estado sempre disponível para me ajudar em tudo o que eu precisasse ao longo destes anos de licenciatura e mestrado.

À Doutora Florbela Soares por ter tido sempre a simpatia de demonstrar o seu apoio ao longo destes meses de trabalho e integração na EPPO.

À Marisa Barata por me ter acompanhado e ajudado, orientado-me em todas as tarefas desempenhadas ao longo de todo o ensaio, acrescentando mais aptidões no meu desenvolvimento a nível profissional.

À Conceição Batista por me ter ajudado em todas as tarefas desempenhadas em laboratório e ser uma grande amiga.

À Letícia Luján por ter despendido o seu tempo em ajudar-me e tornar esta dissertação mais completa.

À Tetyana Urshulyak por estar presente em todas as tarefas diárias, e ser um suporte em todas as adversidades que iam surgindo, levo daqui uma grande amizade apesar de às vezes termos tido pequenas discordâncias.

À Mafalda Rocha e à Bárbara Requeijo pela amizade que levo, por todos os momentos passados na EPPO e principalmente pela motivação e ajuda que sempre me deram para terminar o mestrado.

Faltam aqui inúmeros nomes da família EPPO, este foi um dos momentos mais marcantes da minha vida. Tudo o que levo da EPPO foi bom para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Estão todos presentes no meu coração e nas minhas memórias, até um dia.

Agradeço também à minha família, pelo suporte financeiro e por estarem sempre presentes e sempre preocupados comigo.

Agradeço a todos os meus amigos por estarem sempre presentes em todos os momentos, em especial à Inês por estar sempre aqui para mim, em tudo.

Resumo

A corvina legítima, *Argyrosomus regius*, é um peixe teleósteo pertencente à família Sciaenidae e à ordem Perciformes. Esta espécie tem potencial para a produção em larga escala porque possui várias características positivas, como a fácil adaptação às condições de cativeiro, crescimento rápido, boa conversão alimentar, elevado valor nutricional e uma boa aceitação por parte do consumidor. A temperatura da água é um dos principais fatores que exerce influência na atividade metabólica e fisiológica dos peixes porque são animais que não conseguem regular a temperatura corporal. Essa influência pode afetar o apetite, crescimento, desenvolvimento e reprodução dos peixes. Em aquacultura, a temperatura para o cultivo da espécie pode estar entre os 22 e os 25°C. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de duas temperaturas da água na sobrevivência, desenvolvimento e crescimento de juvenis de corvina. Para isso, durante um período de 45 dias foram estudados 1800 juvenis de corvina nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. Fez-se uma distribuição aleatória dos indivíduos, onde dois triplicados homogêneos de juvenis foram colocados em seis tanques de fibra de vidro com um volume de 300L, cuja densidade não ultrapassou os 1,49 kg/m³. Um desses triplicados com temperatura de 24°C e os outros com temperatura de 28°C. Para além das 3 amostragens biométricas realizadas no decorrer do ensaio, na amostragem final foram também recolhidas amostras de fígado para avaliar a atividade das enzimas do *stress* oxidativo nos peixes cultivados às duas temperaturas. Os resultados mostram que na temperatura de 28°C os resultados da performance de crescimento foi significativamente melhor do que na temperatura de 24°C. Os resultados obtidos para a atividade das enzimas de *stress* oxidativo sugerem que não há alterações entre os dois tratamentos, indicando que o aumento da temperatura não se traduz num aumento do *stress* oxidativo nos animais. No entanto, sugere-se a realização de mais analítica para confirmar estes resultados. Os resultados obtidos neste estudo são bastante relevantes para o setor da aquacultura na medida em que comprovam que, para além da temperatura de 24°C ser ajustada à produção desta espécie, a temperatura de 28°C consegue ser ainda mais promissora, tendo apresentado melhores resultados na produção de juvenis de *A. regius*.

Palavras-chave: *Argyrosomus regius*, corvina-legítima, temperatura, crescimento, *stress* oxidativo.

Abstract

The meagre, *Argyrosomus regius* is a teleost fish (family Sciaenidae and order Perciformes). This species has the potential for large-scale production because it has several positive characteristics, such as easy adaptation to captive conditions, rapid growth, good feed conversion, high nutritional value, and good consumer acceptance. Water temperature is one of the main factors that influences the metabolic and physiological activity of fish because they are animals that cannot regulate their body temperature. This influence can affect the appetite, growth, development, and reproduction of fish. In aquaculture, the temperature for this species can be between 22 and 25°C. The aim of this study was to evaluate the impact of two water temperatures on the survival, development, and growth of juvenile meagre. During a period of 45 days, 1800 juveniles were studied in the facilities of Estação Piloto de Piscicultura de Olhão. A random distribution of individuals was carried out, where three homogeneous groups of juveniles were placed in six fiberglass tanks with a volume of 300L, whose density did not exceed 1.49 kg/m³, three of these groups with a temperature of 24°C and the other three with a temperature of 28°C. In addition to the biometric sampling carried out during the trial, in the final sampling, liver samples were also collected to predict the oxidative stress enzymes activity in fish, at both temperatures. The results show that at 28°C the growth performance results were significantly better than at 24°C. The results obtained for the activity of oxidative stress enzymes suggest the increase in temperature does not increase the oxidative stress in the animals. However, further analysis is suggested to confirm these results. The results obtained in this study are relevant for the aquaculture sector as they prove that, in addition to the temperature of 24°C being adjusted to the production of this species, the temperature of 28°C can be even more promising, having presented better results in the production of *A. regius* juveniles.

Keywords: *Argyrosomus regius*, meagre, temperature, growth, oxidative stress

Índice

Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Siglas e Acrónimos	xiv
1. Introdução	15
1.1. Aquacultura no mundo	15
1.2. Corvina legítima – <i>Argyrosomus regius</i>	18
1.2.1 Características da espécie	18
1.2.2 Produção em aquacultura.....	20
1.2.3 Técnicas de cultivo	21
1.2.4 Valores de mercado	22
1.3. A temperatura	23
1.4. Objetivo do estudo	24
2. Materiais e métodos	26
2.1. Descrição e desenho experimental	26
2.2. Amostragens	28
2.3. Avaliação da atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de resposta ao stress oxidativo	30
2.3.1 Protocolo de Homogeneização	30
2.3.2. Catalase.....	30
2.3.3. Glutathiona peroxidase	31
2.3.4. Superóxido dismutase.....	31
2.3.5. Peroxidação lipídica	32

2.4.	Análise estatística.....	33
3.	Resultados.....	35
3.1.	Performance de crescimento.....	35
3.2.	Sobrevivência	40
3.3.	<i>Stress oxidativo</i>	41
4.	Discussão.....	45
5.	Conclusão	52
6.	Bibliografia.....	54
7.	Anexos.....	58
7.1.	Anexo I: Protocolo para a catalase	58
7.2.	Anexo II: Protocolo para Glutathione Peroxidase	58
7.3.	Anexo III: Protocolo para Superóxido Dismutase.....	59
7.4.	Anexo IV: Protocolo para Peroxidação Lipídica.....	59

Lista de Figuras

Figura 1 - Produção mundial de aquacultura (incluindo algas) em contraste com as capturas pela pesca, desde o ano de 1950 até 2020 (FAO, 2022).	16
Figura 2 - Produção em aquacultura e captura da pesca global em milhões de toneladas (excluindo algas) desde 1951 até 2020 em diferentes regiões (FAO, 2022).	17
Figura 3 - Empregabilidade, em percentagem, no setor da aquacultura e pescas, por região, em 2020 (adaptado de FAO, 2022).	18
Figura 4 – Fotografia de um exemplar de corvina legítima (<i>Argyrosomus regius</i>) (Martins & Carneiro, 2018).	18
Figura 5 - Mapa da distribuição geográfica de <i>Argyrosomus regius</i> . (www.aquamaps.org).....	19
Figura 6 - Produção mundial de corvina em aquacultura (toneladas) desde 2010 até 2019 (adaptado de FAO, 2016).	20
Figura 7 - Evolução da produção mundial de várias espécies de corvina, em toneladas (adaptado de FAO, 2016).	21
Figura 8 - Esquema do ciclo de produção da corvina (adaptado de FAO, 2005).	22
Figura 9 - Oscilações da temperatura média dos dois tratamentos em estudo (<i>Low temperature</i> – 24°C e <i>High temperature</i> – 28°C) ao longo da idade definida em dias após a eclosão (DAE).	27
Figura 10 - Desenho experimental no início do estudo até à amostragem intermédia. 28	
Figura 11 – Boxplot da média do peso final, em gramas, das corvinas nos dois tratamentos em estudo (n=401) apresentados com média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	35
Figura 12- Boxplot da média do comprimento final, em centímetros, das corvinas nos dois tratamentos em estudo (n= 401) apresentados com média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).	36
Figura 13 - Taxa de crescimento específico (SGR) apresentados com média ± desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	37
Figura 14 - Índice de crescimento diário (DGI) apresentado com média ± desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	38

Figura 15 - Taxa de conversão alimentar (TCA) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).....	39
Figura 16 - Coeficiente de crescimento térmico (TGC) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	39
Figura 17 – Fator de condição (K) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).....	40
Figura 18 - Sobrevivência média (em percentagem) dos juvenis de corvina nos dois tratamentos.....	41
Figura 19 - Atividade da catalase expressa em U mg proteína ⁻¹ apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).	41
Figura 20 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) expressa em U mg proteína ⁻¹ apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).....	42
Figura 21 - Atividade da glutatona peroxidase dependente (GPx dep) expressa em μ mol NADPH/min/mg proteína apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).	43
Figura 22 - Atividade da glutatona peroxidase independente (GPx ind) expressa em μ mol NADPH/min/mg proteína apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	43
Figura 23 - Atividade da peroxidação lipídica (LPO) expressa em nmol TBARS g ⁻¹ apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).....	44

Lista de Siglas e Acrónimos

DGI - do inglês *Daily growth Index* (Índice de crescimento diário)

EPPO - Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

FAO - do inglês *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

K - do inglês *Fulton conversion Ratio* (Fator de condição K)

SGR - do inglês *Specific Growth Ratio* (Taxa de crescimento específico)

TCA - Taxa de conversão alimentar

TGC - Do inglês *Thermal unit Growth Coefficient* (Coeficiente de crescimento térmico)

RAS – Do inglês *Recirculating aquaculture system* (Sistema de recirculação)

1. Introdução

1.1. Aquacultura no mundo

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a aquacultura define-se pelo cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, sendo o setor de produção de alimentos que mais cresce em todo o mundo, contribuindo com aproximadamente 50% da proteína animal para consumo humano (Yue & Shen, 2021). Desde 2013, a produção na aquacultura já ultrapassou a produção da pesca de espécies selvagens. De acordo com a FAO, estima-se que a produção total de aquacultura aumente para 53% até 2030 (FAO, 2020) apesar das tendências de produção estarem a ser ameaçadas pelas mudanças climáticas um pouco por todo o mundo.

Apesar da aquacultura ainda ser um setor relativamente recente quando comparado com outros setores de produção animal, e enfrentar alguma resistência por parte dos consumidores, contribui significativamente com proteína de alta qualidade para satisfazer as necessidades nutricionais da população mundial. Nos últimos 50 anos, a investigação aplicada e a introdução de novas tecnologias promoveram um rápido desenvolvimento da aquacultura (Yue & Shen, 2021). Por exemplo, tecnologias reprodutivas aprimoradas, nomeadamente no campo da seleção genética e da zootecnia, permitiram que se conseguisse fechar os ciclos de vida de várias espécies importantes, o que possibilitou a diversificação das espécies produzidas em aquacultura (Mugwanya et al., 2022). O desenvolvimento do uso de alimento vivo, que inclui microalgas, artémia, rotíferos e copépodes resolveu muitos dos problemas que ainda existiam na produção de juvenis de espécies marinhas, principalmente porque a sua produção tem vindo a progredir. A seleção genética, com recurso a ferramentas genéticas, melhorou substancialmente as características de importância comercial em mais de 60 espécies, mas ainda há muito trabalho a fazer nesta área (Gjedrem & Robinson, 2014). Em Portugal, estas ferramentas genéticas ainda se encontram pouco aplicadas à maioria das espécies produzidas. Nestes últimos anos muita foi a investigação que permitiu fazer da aquacultura um setor cada vez mais promissor e sustentável. Não há dúvida que a aquacultura é, portanto, um setor fundamental para garantir a segurança alimentar e as economias locais, além de que contribui para a disponibilidade de dietas saudáveis

resultantes de alto teor de ácidos gordos de cadeia longa (p.e ómega-3 e ómega-6), proteínas, vitaminas e minerais (Bohnes et al., 2022).

Para realçar a importância e o crescimento da aquacultura nestes últimos anos, a figura 1 mostra graficamente o total da produção mundial do setor de aquacultura em comparação com as capturas pela pesca. Analisando o gráfico podemos afirmar que, ao contrário da pesca, que estagnou de há uns anos para cá, a aquacultura continua em franco crescimento, tendo mesmo ultrapassado o setor da pesca no ano de 2013.

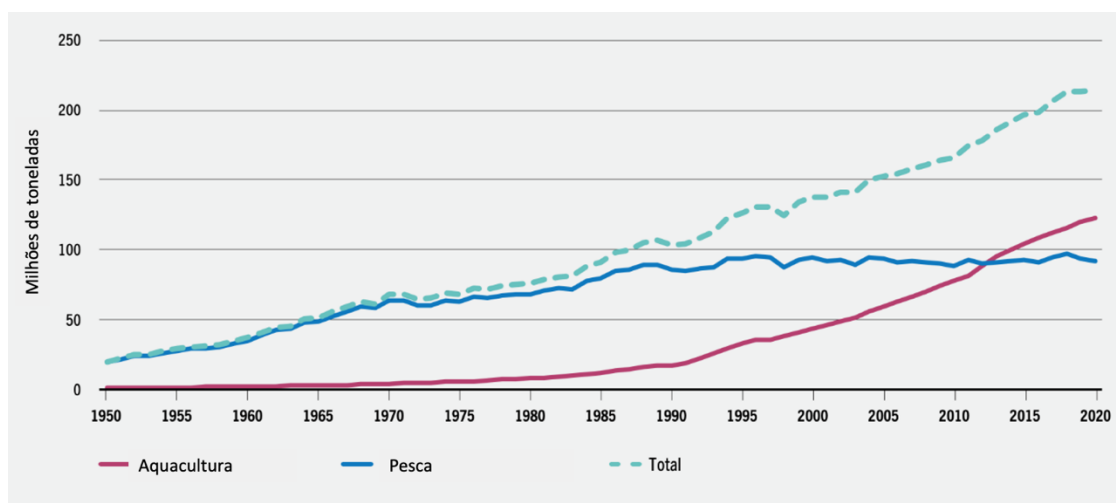


Figura 1 - Produção mundial de aquacultura (incluindo algas) em contraste com as capturas pela pesca, desde o ano de 1950 até 2020 (FAO, 2022).

Em relação aos maiores produtores a nível global, em 2020 os países asiáticos foram os principais produtores, seguindo-se a América, Europa, África e, por fim, Oceânia (figura 2). Globalmente, a produção total em aquacultura registou aumentos importantes em todos os continentes nas últimas décadas (FAO, 2022). No entanto, em comparação com 2019, a produção total de organismos marinhos em 2020 diminuiu 3% nos países africanos e 5% nos países da Oceânia, provavelmente como resultado da COVID-19 (FAO, 2022).

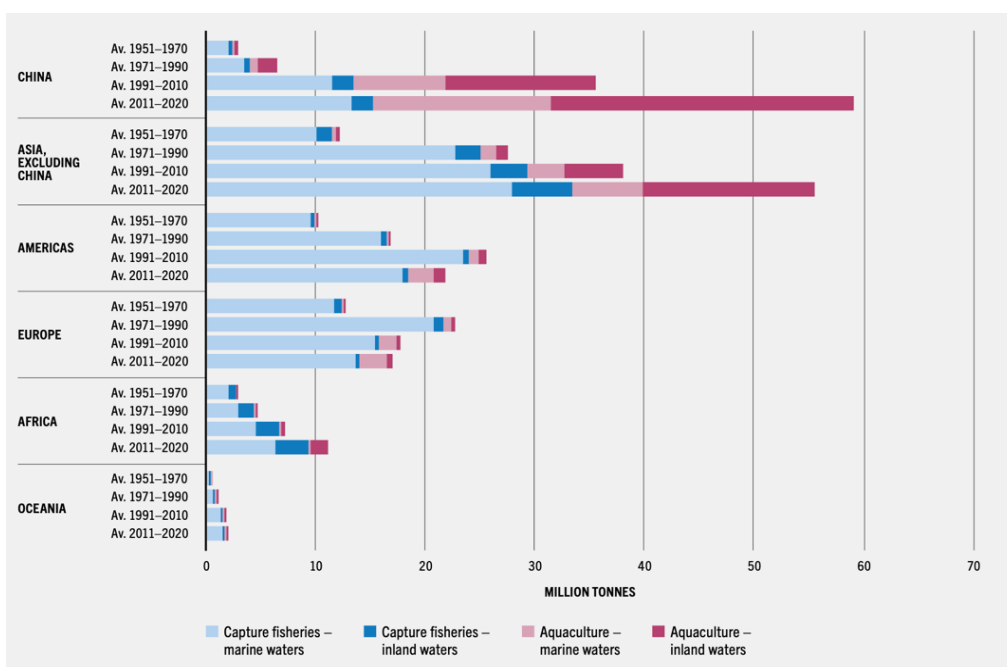


Figura 2 - Produção em aquacultura e captura da pesca global em milhões de toneladas (excluindo algas) desde 1951 até 2020 em diferentes continentes (FAO, 2022).

Para além da importância da aquacultura como setor de subsistência e de abastecimento de proteína de qualidade, a produção em aquacultura também tem vindo a desenvolver uma maior importância a nível de empregabilidade. Especialmente em países em desenvolvimento, aproximadamente 23 milhões de empregos em tempo integral estão direta ou indiretamente relacionados com o setor da aquacultura (Ahmad et al., 2021). De acordo com a FAO e como mostra a figura 3, com os dados mais recentes de 2020 a Ásia lidera significativamente em termos de oferta de emprego, comparativamente a África, América, Oceânia e Europa. Também na Ásia, ao contrário das restantes regiões, a aquacultura tem uma maior percentagem de empregabilidade comparativamente à pesca.

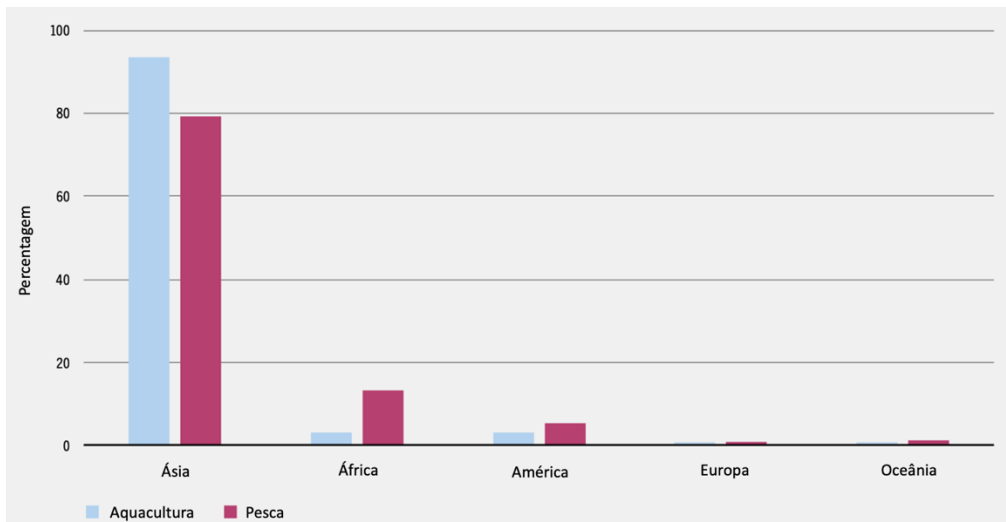


Figura 3 - Empregabilidade, em percentagem, no setor da aquacultura e pescas, por região, em 2020 (adaptado de FAO, 2022).

1.2. Corvina legítima – *Argyrosomus regius*

1.2.1 Características da espécie

A corvina legítima, *Argyrosomus regius* (Asso y del Rio, 1801) (figura 4), é um peixe teleósteo pertencente à família Sciaenidae e à ordem Perciformes. Fisicamente, apresenta um corpo alongado e ligeiramente comprido, com uma coloração prateada mais escura no dorso e reflexos acobreados nos flancos (Martins & Carneiro, 2018).



Figura 4 – Fotografia de um exemplar de corvina legítima (*Argyrosomus regius*) (Martins & Carneiro, 2018).

Em relação à sua distribuição geográfica (figura 5), este peixe está distribuído no Atlântico Este, da Noruega a Gibraltar e Congo, incluindo o Mediterrâneo e o Mar Negro (Kružić et al., 2016), sendo uma espécie maioritariamente de regiões temperadas.

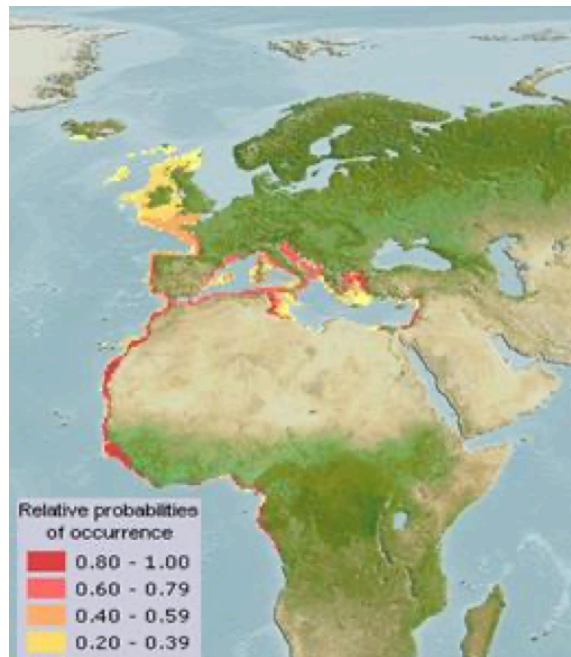


Figura 5 - Mapa da distribuição geográfica de *Argyrosomus regius* (www.aquamaps.org).

A sua taxa de crescimento máxima é alcançada no verão, quando as temperaturas são mais quentes, e a sua atividade alimentar é substancialmente reduzida quando a temperatura do mar diminui abaixo de 13 a 15°C (Ribeiro, 2011). A ingestão de alimento desta espécie é também afetada pela temperatura da água, diminuindo nos meses de inverno (Pereira et al., 2022). Na primavera, a corvina migra para a foz dos estuários para desovar e este processo dura até ao final do verão. Existem algumas áreas importantes para a desova destes peixes tais como o estuário do rio Gironde, o golfo da Biscaia, o rio Tejo e o rio Guadiana (Duncan et al., 2013). Os juvenis deixam os estuários no final do verão e passam dois a três anos em águas mais próximas da costa antes de migrarem para áreas mais profundas e *offshore* (FAO, 2022). A temperatura da água parece ser o fator mais relevante na determinação das migrações e na reprodução desta espécie (Duncan et al., 2013). A maturação sexual ocorre quando os peixes atingem cerca de 70cm de comprimento, correspondendo a 2 anos no caso dos machos e a 3 anos nas fêmeas (European Commission, 2022).

1.2.2 Produção em aquacultura

A corvina apresenta atributos interessantes a nível de mercado. É um peixe que atinge um tamanho consideravelmente grande, tendo um crescimento rápido de aproximadamente 1kg por ano, dependendo das condições de cultivo (Soares et al., 2015). Esta espécie possui potencial para a produção em larga escala porque possui várias características positivas, como a fácil adaptação às condições em cativeiro, crescimento rápido, boa conversão alimentar, elevado valor nutricional, baixo teor de gordura, excelente sabor e textura firme (Guerreiro et al., 2021). A sua taxa de conversão alimentar é excelente (0,9-1,2), dependendo da ração utilizada (Soares et al., 2015).

Começou a ser cultivada na Europa, nomeadamente em França e em Itália, no final dos anos noventa (Monfort, 2010). Em França essa produção começou em 1997, com um total anual de 30 toneladas (Duncan et al., 2013).

Em 2009, a produção de corvina atingiu as 2200 toneladas no Egito, 1348 toneladas em Espanha, 418 toneladas em França, 102 toneladas em Itália e 44 toneladas em Portugal (FAO, 2011). A produção desta espécie em aquacultura aumentou de algumas toneladas no ano de 2000 para cerca de 4000 toneladas no ano de 2008 e, mais tarde, para mais de 10000 toneladas em 2012 (FAO, 2010).

Ao longo dos últimos anos a produção mundial desta espécie em aquacultura tem vindo a aumentar significativamente, como é possível observar na figura 6.

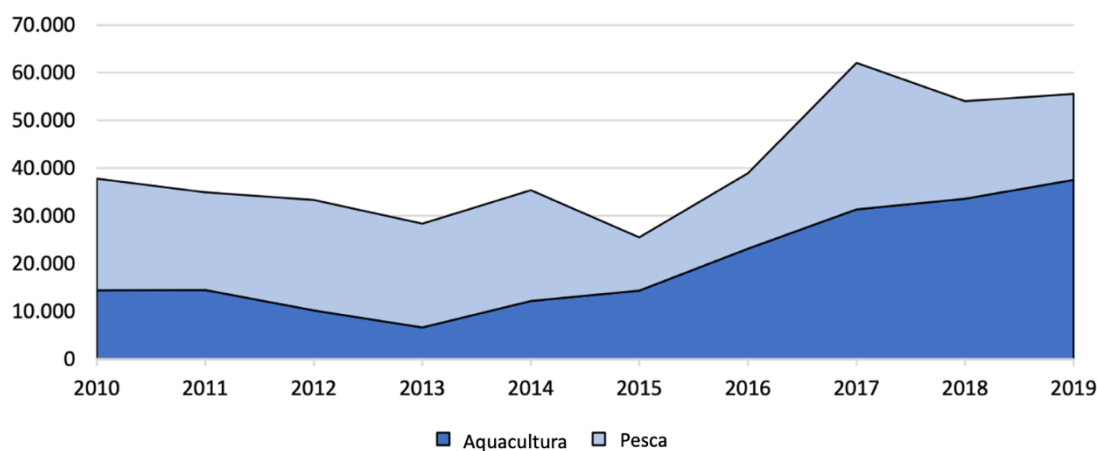


Figura 6 - Produção mundial de corvina em aquacultura (toneladas) desde 2010 até 2019 (adaptado de FAO, 2016).

Relativamente à evolução da produção mundial de *A. regius* em aquacultura em relação a outras espécies de corvina, esta pode ser comparada pelos dados apresentados na figura 7.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	% total 2019	Evol. 2019 / 2010
<i>Argyrosomus regius</i>	20.031	18.113	17.102	12.775	20.465	20.804	28.293	40.417	43.014	44.472	80%	+122%
Outras espécies	17.722	16.808	16.199	15.527	14.851	4.675	10.653	21.635	11.004	11.088	20%	-37%
Total	37.753	34.921	33.300	28.303	35.316	25.479	38.946	62.052	54.018	55.560	100%	+47%

Figura 7 - Evolução da produção mundial de várias espécies de corvina, em toneladas (adaptado de FAO, 2016).

A produção de outras espécies de corvina diminuiu ao longo dos anos e a produção de *A. regius* aumentou globalmente na última década, de 20031 toneladas em 2010 para 44472 toneladas em 2019.

1.2.3 Técnicas de cultivo

As técnicas de cultivo da corvina são semelhantes às utilizadas para a produção de robalo, *Dicentrarchus labrax*, e dourada, *Sparus aurata*. A corvina é cultivada principalmente em regime semi-intensivo, tanto em tanques de terra como em jaulas (FAO, 2022).

Esta espécie começou a ser estudada e reproduzida na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) em 2006, onde se estabeleceram as bases sustentáveis para a sua produção, através do desenvolvimento de protocolos de cultivo para as diferentes fases do ciclo biológico.

Na EPPO, o ciclo de produção da corvina (figura 8) inicia-se com reprodutores com 4 anos ou com cerca de 6Kg de peso, mantidos nas condições e parâmetros ótimos. Os ovos são acondicionados em tanques cilindro-cónicos e as larvas são mantidas no escuro e alimentadas com artémia e copépodes. Os alevins (3g a 20g) são transferidos para pequenos tanques com cerca de 80 a 100m³ e uma densidade de 300 a 350 indivíduos por m³. Normalmente, são mantidos nessas condições até atingirem os 100g. Durante essa fase, a taxa de sobrevivência é de 80% (FAO, 2022). Ao fim de aproximadamente 2 anos, ou com um peso maior de 1,5Kg a 3Kg, os peixes estão prontos para entrarem no

mercado. A corvina é vendida maioritariamente inteira com o peso referido anteriormente (FAO, 2022).

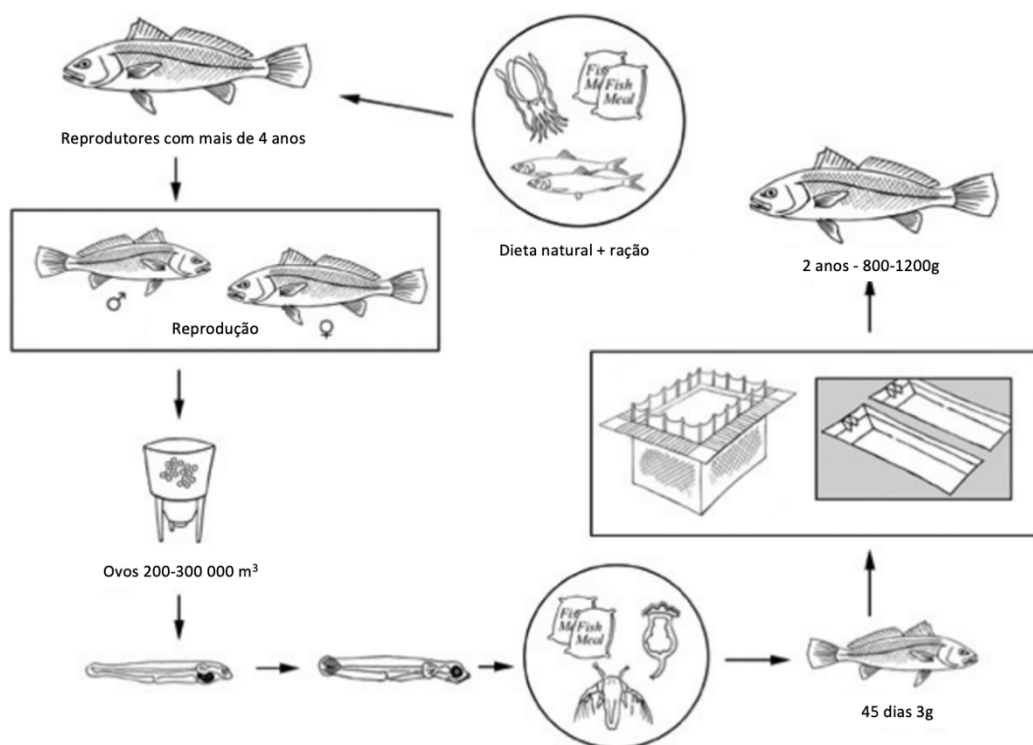


Figura 8 - Esquema do ciclo de produção da corvina (adaptado de FAO, 2005).

1.2.4 Valores de mercado

Embora a corvina não compita com o robalo e a dourada a nível de mercado e procura, é um peixe que tem vantagem pelo facto de ter um rápido crescimento (Duarte, 2016). Após a baixa produção em 1999, os preços aumentaram subitamente para 6 euros/kg. Desde então, tem havido um aumento da procura de peixe com peso superior a 2 kg, que é vendido atualmente entre 7 e 12 euros/kg (FAO, 2022). O sul da França e a Itália são os mercados mais importantes para esta espécie (1-3 kg). Desde 2002, os produtores tentam diferenciar os produtos magros: os peixes menores (600 g a 1 kg) são vendidos inteiros ou em filete, enquanto os peixes maiores (1 kg a 3-5 kg) são fatiados ou filetados e defumados (FAO, 2022). A qualidade da carne magra é considerada muito boa, devido ao seu alto teor de ácidos gordos polinsaturados (FAO, 2022).

1.3. A temperatura

A temperatura é um dos principais fatores que exerce influência na atividade metabólica e fisiológica dos peixes. Essa influência pode afetar o apetite, crescimento, desenvolvimento e reprodução dos peixes, uma vez que são animais incapazes de regular internamente a sua temperatura corporal (Stavrakidis-Zachou et al., 2021). Como tal, a temperatura da água tem um efeito muito significativo nas práticas de produção e manuseamento em aquacultura.

Os peixes são organismos poiquilotérmicos, isto é, que não conseguem regular a sua temperatura corporal, e, portanto, a temperatura do meio que os rodeia é muito importante, uma vez que são afetados diretamente por esta. Quando os peixes são expostos a determinadas condições, como por exemplo, mudanças de temperatura da água, ativam um mecanismo regulatório e adaptativo conhecido como resposta ao *stress*. Durante essa resposta inicial, as vias neuroendócrinas são ativadas no cérebro que, por sua vez, mobilizam respostas metabólicas, hematológicas e imunológicas, entre outras, para lidar com a mudança (Kir et al., 2017). Tipicamente, a resposta ao *stress* manifesta-se com o aumento da concentração de metabolitos durante e após a exposição ao fator de *stress* (Kir et al., 2017).

Temperaturas elevadas geralmente aumentam a taxa de crescimento e reduzem o tempo de maturação até um certo limite (Kir, 2020). Por outro lado, uma temperatura além dos limites ótimos de uma determinada espécie, pode produzir efeitos adversos, como o aumento das taxas metabólicas e conseqüente uma maior exigência de oxigênio, podendo ativar os mecanismos de resposta ao *stress* (Kir, 2020). No entanto, o aumento das taxas metabólicas não é necessariamente um efeito adverso porque podem ter um efeito direto nas taxas de alimentação, fazendo com que a digestão se dê mais rapidamente e fazendo com que haja uma absorção direta de nutrientes mais rápida.

Dado que a temperatura é um fator condicionante nas taxas de crescimento destes animais, todas as espécies de peixe produzidas em aquacultura são caracterizadas por terem uma determinada tolerância térmica e uma temperatura ótima na qual apresentam melhores taxas crescimento (Antonopoulou et al., 2020).

Os valores de temperatura ótima podem mudar consoante a idade e o tamanho dos peixes. Por exemplo, os juvenis de muitas espécies preferem temperaturas mais elevadas relativamente aos adultos. Além disso, os efeitos combinados entre o tamanho e a temperatura no crescimento foram descritos para várias espécies de peixes (Handeland et al., 2008).

Em relação à corvina, no seu habitat natural encontra-se exposta a temperaturas que variam de 14 a 26°C e as suas respostas biológicas nesse intervalo de valores já se encontram bem estudadas e documentadas (Kır et al., 2017). Ainda assim, os requisitos de temperatura para a produção da corvina ainda são muito limitados e há alguma incerteza sobre a resposta biológica à exposição prolongada a elevadas temperaturas. Estudos realizados nas instalações da EPPO sugerem um crescimento eficiente com uma temperatura da água entre os 22 e os 25 °C (Ribeiro et al., 2015; Saavedra et al., 2018).

Para organismos vivos, o crescimento implica a proliferação celular, o aumento do volume celular, ou ambos, o que resulta no aumento da massa corporal (Du & Turchini, 2022). Por razões económicas óbvias, uma vez que os produtos geralmente são vendidos nos mercados com base no peso, o aumento da massa corporal é um parâmetro importante na aquacultura.

Os parâmetros e índices de crescimento mais comumente usados são projetados, direta ou indiretamente, no ganho de peso corporal ao longo do tempo (Du & Turchini, 2022). Os índices mais utilizados são o ganho de peso, a taxa de crescimento específico e a taxa de conversão alimentar. Também são usados outros parâmetros, como crescimento médio diário ou o coeficiente de crescimento térmico.

1.4. Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da temperatura da água na sobrevivência, desenvolvimento e crescimento de juvenis de corvina *Argyrosomus regius*. As temperaturas em estudo foram de 24 e 28°C. Com estas temperaturas, o objetivo foi determinar qual a temperatura máxima de cultivo, uma vez que outros estudos mostraram que a temperatura ótima de crescimento desta espécie é de 24°C, logo, faz parte do objetivo perceber o que acontece quando submetemos os juvenis a uma temperatura mais elevada, de 28°C, e se este continua a ser ou não um bom valor para o

cultivo desta espécie. Esta é uma informação particularmente relevante para o setor, nomeadamente para cultivos em sistemas de recirculação (RAS).

Foram avaliados índices de crescimento, nomeadamente a taxa de crescimento específico (SGR), índice de crescimento diário (DGI), taxa de conversão alimentar (TCA), fator de condição (K) e coeficiente de crescimento térmico (TGC). Também se avaliou de que forma estas diferentes temperaturas influenciam o *stress* dos peixes, tendo-se analisado especificamente a catalase, a glutathione peroxidase, o superóxido dismutase e a peroxidação lipídica.

2. Materiais e métodos

2.1. Descrição e desenho experimental

Este estudo decorreu durante um período de 45 dias, especificamente entre o dia 8 de setembro de 2021 e o dia 22 de outubro de 2021, nas instalações da EPPO (37°01'59.9'' N; 7°49'12.9'' W), pertencente ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Inicialmente fez-se a triagem de 1800 juvenis pertencentes ao mesmo lote e com tamanho idêntico. O peso médio inicial dos juvenis foi de $1,49 \pm 0,014\text{g}$ e foram originários do *stock* de reprodutores da EPPO. Os reprodutores foram provenientes do lote “Ar5 2021-210706” do tanque “Text5”, mantidos a uma temperatura de 19,5°C e a data de postura foi a 5 de julho de 2021. Estes reprodutores selecionados foram mantidos sob condições estritamente controladas, de modo a garantir a qualidade da descendência.

Foram testados dois tipos de tratamento, um de baixa temperatura (*Low temperature*), de 24°C, e outro de elevada temperatura (*High temperature*) de 28°C. O objetivo foi determinar qual destas é a temperatura máxima de crescimento da corvina, uma vez que estudos anteriores, com outras temperaturas, mostraram que o crescimento da corvina é melhor a 24°C. A figura 9 apresenta as oscilações de temperatura observadas ao longo do ensaio. A média de temperaturas para o ensaio de 24°C foi de 24,2°C e a média para o ensaio de 28°C foi de 27,6°C.

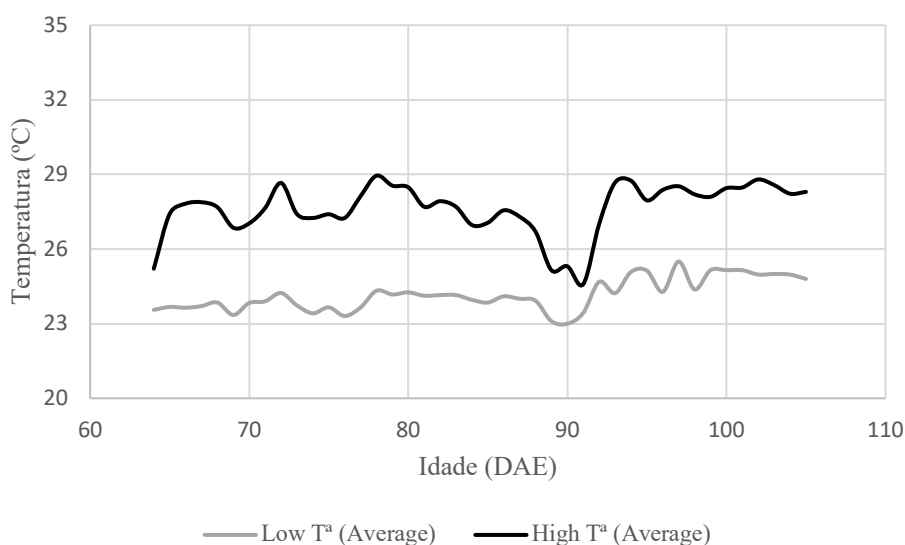


Figura 9 - Oscilações da temperatura média dos dois tratamentos em estudo (*Low temperature* – 24°C e *High temperature* – 28°C) ao longo da idade definida em dias após a eclosão (DAE).

Cada um dos tratamentos foi realizado em triplicado, ou seja, três tanques para o tratamento de 24°C e outros três tanques para o tratamento de 28°C (dando um total de seis tanques). Para isso houve uma distribuição aleatória dos indivíduos, que foram distribuídos pelos seis tanques de fibra de vidro com um volume de 300L, em que a densidade não ultrapassou os 1,49 kg/m³ (300 indivíduos por tanque) com um peso médio de 1,49g.

Utilizou-se um sistema aberto e a água salgada, previamente filtrada, foi originária da Ria Formosa.

Para manter as temperaturas de 24 e 28 °C utilizaram-se duas linhas de água aquecida (uma para o tratamento de 24° e outra para o tratamento de 28°) com recurso a uma caldeira e a *chillers*. A água, filtrada, foi bombeada a partir do reservatório da EPPO, até aos *chillers*, onde, depois de aquecida, foi distribuída para os respetivos tanques do sistema, consoante a temperatura pretendida em cada um deles. Devido ao facto de as temperaturas da água da ria terem sofrido descidas abruptas de temperatura, foi necessário recorrer ao uso da caldeira para manter as temperaturas estáveis nos valores estipulados.

A limpeza dos tanques também foi assegurada diariamente. Para evitar que os peixes saltassem para fora dos tanques, e consequentemente evitar mortalidade, todos os tanques foram cobertos com uma rede.

Durante o decorrer do ensaio, o fotoperíodo utilizado foi de 12/12 (d/n), . A salinidade registada durante o ensaio foi de 36 ± 1 e o oxigénio dissolvido foi mantido entre $7,2 \pm 1,6$ mg/L⁻¹. Os caudais foram medidos diariamente, para garantir que a renovação da água dos tanques na temperatura de 28°C era aproximadamente de 300% por hora e nos de temperatura de 24°C de aproximadamente 200% por hora. Esta renovação foi mais elevada no tratamento de 28°C porque os juvenis tinham um maior consumo de ração e, por isso, havia formação de maior quantidade de matéria orgânica.

Aos 29 dias de ensaio foi realizada uma amostragem biométrica e observou-se que a biomassa ultrapassou o limite para os volumes dos tanques utilizados, pelo que se fez o

desdobramento dos peixes dos dois tratamentos. Para isso distribuiu-se 150 peixes por tanque, em que na temperatura de 28°C o peso médio dos tanques distribuídos foi de 10,5g e na temperatura de 24°C foi de 8,66g. Este desdobramento resultou num total de 12 tanques, 6 com o tratamento de água mais quente e 6 com o tratamento de água mais fria.

O desenho experimental deste estudo encontra-se representado na figura 10.

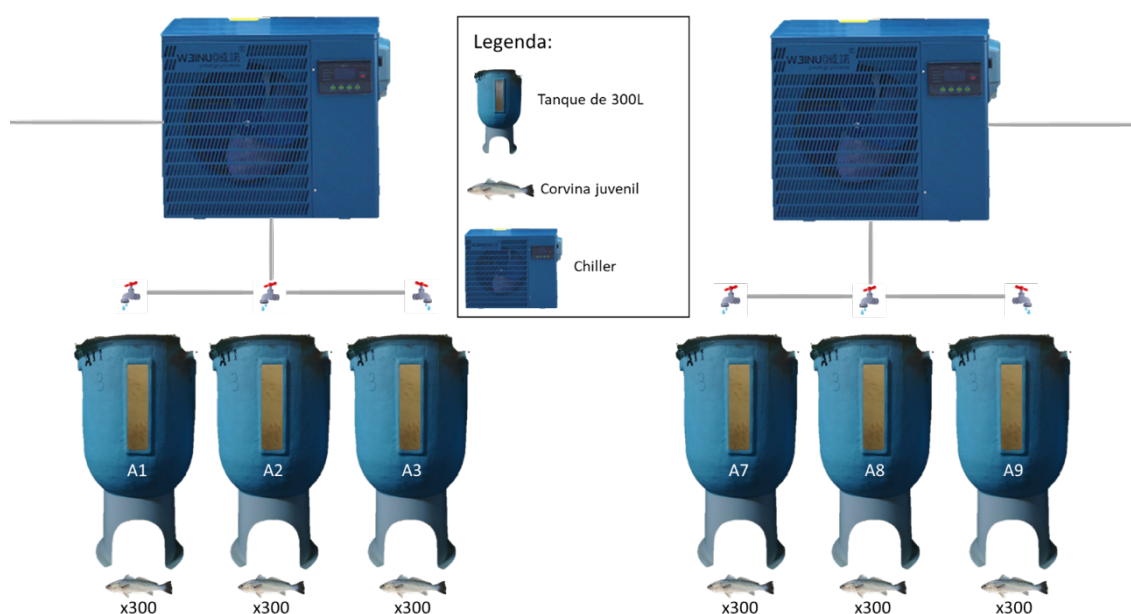


Figura 10 - Desenho experimental no início do estudo até à amostragem intermédia.

2.2. Amostragens

Foram realizadas 3 amostragens biométricas denominadas de inicial, intermédia e final. Os peixes, em jejum desde o dia anterior, foram retirados dos respetivos tanques onde se encontravam e, depois de serem anestesiados, foram pesados e medidos. O comprimento de cada peixe foi medido utilizando uma régua graduada ao milímetro. O peso foi medido utilizando uma balança (Ken & Sohn GmbH, modelo ITB 35K1IP) com sensibilidade de 1 grama. Nas amostragens do início e fim do ensaio, 50 peixes foram medidos individualmente (comprimento total, em centímetros) e pesados (em gramas), os

restantes foram pesados em grupos de 20. De seguida, foram transportados em baldes de água, voltando ao respetivo tanque novamente. A amostragem intermédia foi feita utilizando 10% do total de peixes de cada tanque. O objetivo desta amostragem intermédia foi monitorizar o crescimento, ou seja, garantir que os peixes estavam a crescer, observar a sua morfologia e recalcular a densidade do tanque, ajustando a distribuição dos peixes se necessário. Devido à alteração da biomassa, a densidade nos tanques aumentou e, como tal, a meio do ensaio os dois tratamentos foram desdobrados. Este desdobramento foi importante para que a densidade nos tanques cumprisse os valores ótimos estabelecidos para garantir o bem-estar animal.

No final do ensaio foram recolhidos, aleatoriamente, os fígados de 6 peixes de cada tanque, para análise da atividade de enzimas envolvidas na resposta ao *stress* oxidativo. Essas amostras foram imediatamente colocadas em azoto líquido e armazenadas na arca a -80°C até à sua análise.

Todos os parâmetros relativos à performance de crescimento foram calculados da seguinte forma:

- Taxa de crescimento específica: $SGR = ((\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{número de dias}) * 100$
- Índice de crescimento diário: $DGI = [(\text{peso final}^{1/3} - \text{peso inicial}^{1/3}) / \text{número de dias}] * 100$
- Taxa de conversão alimentar: $TCA = \text{consumo (g MS/peixe)} / (\text{peso final} - \text{peso inicial})$
- Coeficiente de crescimento térmico: $TGC = [(\text{peso final}^{1/3} - \text{peso inicial}^{1/3}) / (\text{temperatura} \times \text{número de dias})] * 100$
- Fator de condição: $K = [(\text{peso} \times 100) / \text{comprimento}^3]$

2.3. Avaliação da atividade de enzimas envolvidas no mecanismo de resposta ao *stress* oxidativo

As enzimas antioxidantes são normalmente utilizadas como biomarcadores, que podem ser definidos como respostas do organismo a alterações no ambiente (Miller et al., 2009). Os biomarcadores são ferramentas importantes para avaliar a influência das alterações no ambiente sobre os organismos. Como tal, os valores destas enzimas vão variar quando uma espécie de peixe é sujeita a condições de *stress*. Estes sistemas enzimáticos são compostos por várias enzimas, tais como a catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Estas enzimas têm um efeito antioxidante sendo capazes de neutralizar espécies reativas de oxigénio.

É importante a avaliação destes parâmetros porque através deles conseguimos perceber se determinada espécie de peixe se encontra sujeita a algum fator de *stress*.

Nas secções seguintes encontram-se referidos os protocolos efetuados para a atividade enzimática. Primeiro foi feita uma homogeneização dos tecidos e o homogeneizado foi utilizado posteriormente para as análises.

2.3.1 Protocolo de Homogeneização

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato salino com pH 7. Para a determinação do *stress* oxidativo usou-se uma diluição de 1:15 e para o LPO 1:3. Foi adicionado às amostras do LPO BHT a 4% para parar a oxidação de lípidos.

O processo foi feito sempre em gelo e com o ultra turrax. Por fim, foram centrifugadas 20' a 12.000g em centrífuga refrigerada. Após a centrifugação, foram imediatamente congeladas a -80°C.

2.3.2. Catalase

O método para a quantificação da catalase (CAT) segue a metodologia adaptada por Beers e Sizer (1952), sendo validada para microplacas por Li e Schellhorn (2007). A catalase é uma enzima antioxidante que decompõe o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em

oxigênio e água ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). A atividade da catalase é medida seguindo o consumo do substrato (H_2O_2) visto por uma diminuição da absorvância a 240 nm. Uma unidade de catalase decompõe 1,0 μmole de H_2O_2 por minuto a pH 7 e 25 °C. A CAT desempenha um papel importante na prevenção da formação e procura de radicais livres e outras espécies oxidantes potencialmente tóxicas.

As amostras de fígado foram diluídas A 1:20 e pipetadas para uma microplaca UV 20 μl . No leitor de microplacas, foram efetuadas 7 leituras com intervalos de 35 segundos.

O protocolo em detalhe da preparação de soluções para a quantificação da CAT encontra-se em anexo (anexo I).

2.3.3. Glutathione peroxidase

A atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) é determinada pela diminuição de NADPH que é consumido durante a transformação de GSH em GSSG. A diminuição da absorção de NADPH a 340 nm é proporcional à atividade da GPx. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1mmol de NADPH por minuto. A avaliação da atividade da GPx é importante porque permite verificar os danos efetuados ao organismo provenientes do *stress* oxidativo.

Para a determinação da atividade da GPx total o processamento das amostras foi efetuado adicionando 20 μl do branco (PBS) e 20 μl das amostras nos respetivos poços.

O protocolo em detalhe da preparação de soluções para a quantificação da GPx encontra-se em anexo (anexo II).

2.3.4. Superóxido dismutase

A Superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio elementar (O_2) e, como tal, fornece uma defesa importante contra a toxicidade do radical superóxido porque evita a acumulação do radical livre O^- , que é altamente reativo e prejudicial para a célula.

O anião superóxido é gerado pelo sistema xantina oxidase-xantina e é detetado pela formação de um cromóforo com NBT. Quando a enzima SOD está presente, a concentração do radical anião superóxido é reduzida, decrescendo assim a formação do cromóforo (Robak e Gryglewski, 1988).

Para o processamento da curva padrão e das amostras adicionou-se numa microplaca 10 µl de cada padrão em triplicado, 10 µl de cada amostra em triplicado, 40 µl de SOD buffer em todos os poços, 250 µl de solução de Nbt com Xantina e 50 µl de solução XO. Leu-se a placa a 550nm a 25°C durante 5 minutos com intervalos de leitura de 1 minuto, seguida de uma nova leitura após 20 minutos.

O protocolo em detalhe da preparação de soluções para a quantificação da SOD encontra-se em anexo (anexo III).

2.3.5. Peroxidação lipídica

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados, LPO, é uma consequência importante do *stress* oxidativo. É precedida por uma série de reações em cadeia e, no caso do ciclo redox, demonstra a habilidade de um único radical livre de oxigénio em propagar um número de reações bioquímicas com efeitos danosos. A peroxidação lipídica pode ser terminada pela reação entre dois radicais lipídicos que formem um produto de reação não radical. (Di Giulio et al., 1995; Kehrer, 2000).

Este método permite a determinação dos produtos da peroxidação lipídica (MDA e 4-HNE). A degradação dos peróxidos de ácidos gordos polinsaturados geram malondialdeído (MDA) e aldeídos tóxicos (2E) -4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE).

A 200 ul de amostra diluída a 1:10 adicionou-se 650ul de reagente R1 diluído e agitou-se em vortex; em seguida foi adicionado 150ul do reagente R2 agitando um pouco a amostra. Foi feita uma incubação a 45°C durante 60 minutos, e por fim para obter uma amostra clarificada a 15.000g durante 10 minutos. Em microplaca foi pipetado 200ul da cada amostra em duplicado, assim como cada ponto da reta, e de Tris-NaCl para o branco. Cada ponto da reta foi feito como se de uma amostra se tratasse.

O protocolo em detalhe da preparação de soluções para a quantificação da LPO encontra-se em anexo (anexo IV).

2.4. Análise estatística

A análise estatística deste estudo foi feita segundo a metodologia descrita por Zar (1999) através do *software SPSS Statistics* para o sistema operacional *Microsoft Windows*. A significância estatística foi testada com um nível de confiança de 95%.

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Todos os resultados foram verificados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov–Smirnov) e homogeneidade (teste de Levene) antes da análise de comparação. Diferenças entre os diferentes tratamentos foram comparadas através de ANOVA de um fator quando os dados passaram nos testes de homogeneidade e normalidade. Diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram detetadas usando o teste de Tukey quando diferenças significativas foram encontradas ($p < 0,05$). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Performance de crescimento

Na amostragem final pesou-se e mediu-se uma amostra de corvinas individualmente, obtendo-se, assim, o peso e o comprimento finais nos dois tratamentos. Como é possível observar-se na figura 11, o peso final foi significativamente maior nas corvinas cultivadas a uma temperatura de água de 28°C comparativamente às corvinas de 24°C. Em média, as corvinas do tratamento de 24°C tiveram um peso final de $16,24 \text{ g} \pm 5,77$, enquanto as corvinas do tratamento de 28°C tiveram um peso final de $22,81 \text{ g} \pm 6,67$.

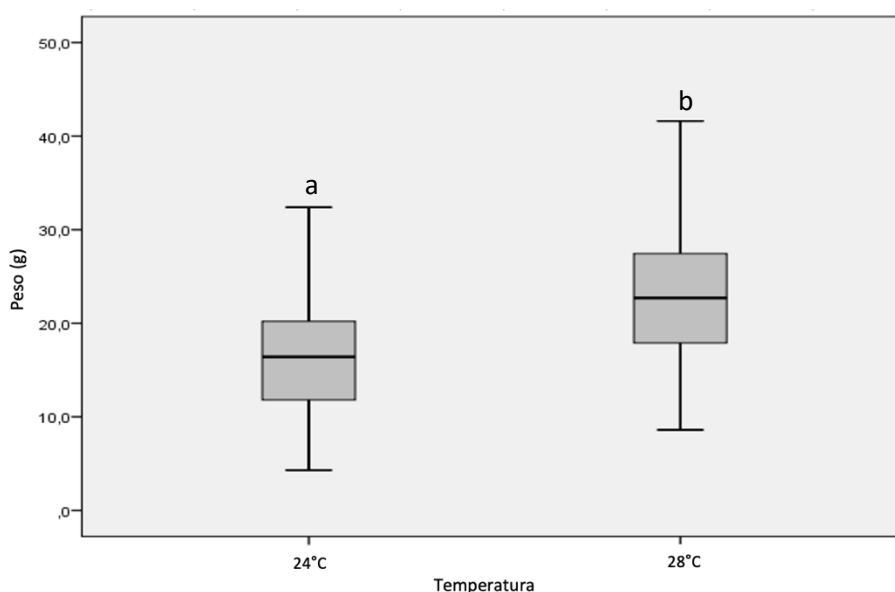


Figura 11 – Boxplot da média do peso final, em gramas, das corvinas *A. regius* nos dois tratamentos em estudo (n=401) apresentados com média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Através da análise deste gráfico podemos perceber que o gráfico do tratamento de 28°C tem um conjunto de valores superior ao tratamento de 24°C. A mediana indica o valor central do conjunto de dados permitindo perceber que 50% dos dados são maiores que esse valor e os outros 50% são menores. O seu valor também foi superior no tratamento de 28°C. No tratamento de 28°C tanto o valor máximo como o valor mínimo são superiores aos do tratamento de temperatura mais baixa, indicando que as medidas de

peso foram superiores. A amplitude dos gráficos é semelhante, indicando que ambos tiveram uma baixa dispersão de valores de peso.

Relativamente ao comprimento final (figura 12), verificou-se que este também foi maior no tratamento de 28°C, com uma média de 12,55cm ± 1,35 comparativamente ao tratamento de 24°C, com uma média de 11,18cm ± 1,45, embora não tenha sido um resultado estatisticamente significativo

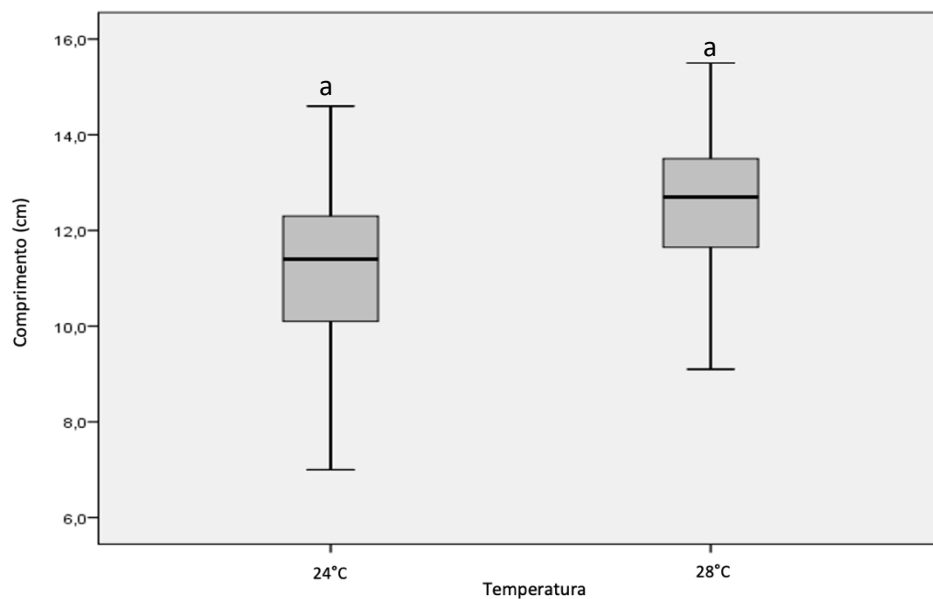


Figura 12- Boxplot da média do comprimento final, em centímetros, das corvinas *A. regius* nos dois tratamentos em estudo (n= 401) apresentados com média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Como é possível observar na figura 14, o gráfico do tratamento de 28°C tem um conjunto de valores superior ao tratamento de 24°C, assim como o valor da mediana. No tratamento de 28°C tanto o valor máximo como o valor mínimo foram superiores aos do tratamento de temperatura mais baixa, indicando que as medidas de comprimento foram superiores. A amplitude do gráfico do tratamento de 28°C foi menor, indicando que há uma menor dispersão dos seus valores, ou seja, que os comprimentos dos juvenis foram mais homogêneos nesta temperatura.

A taxa de crescimento específico (SGR) é definida pela variação do logaritmo do peso pelo tempo. Nos resultados do SGR obtiveram-se valores mais elevados no tratamento de 28°C (6,05 % ± 0,06) comparativamente ao de 24°C (5,32 % ± 0,13), como se pode observar na figura 13.

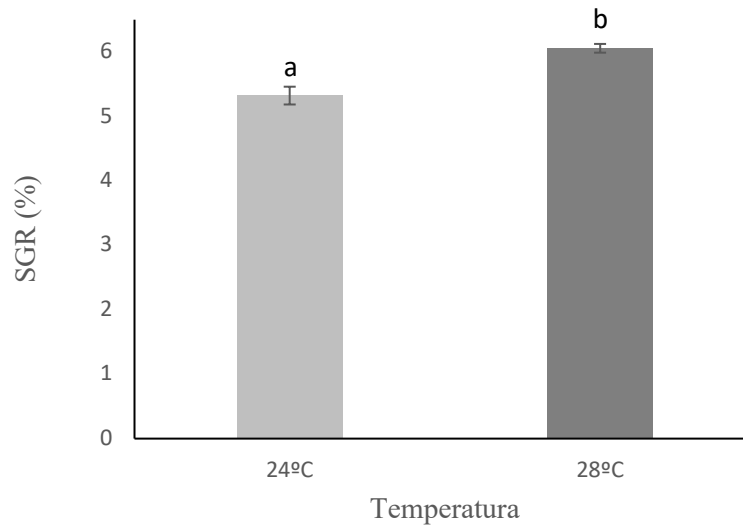


Figura 13 - Taxa de crescimento específico (SGR) apresentados com média ± desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O índice de crescimento diário (figura 14) foi mais elevado no tratamento de 28°C, em que o valor/dia foi de 3,76 %/dia ± 0,06, comparativamente ao valor registado no tratamento de 24°C, em que o valor obtido foi de 3,09 %/dia ± 0,10.

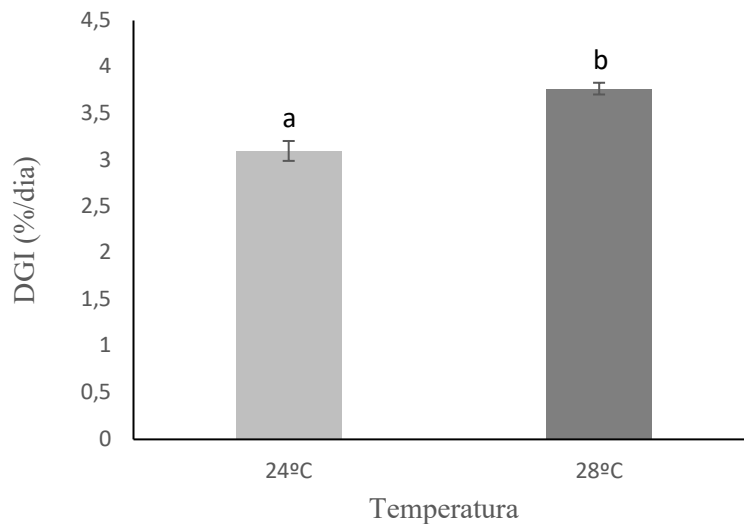


Figura 14 - Índice de crescimento diário (DGI) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A taxa de conversão alimentar, representada graficamente na figura 15, apresentou valores mais elevados no tratamento de 24°C do que no tratamento de 28°C. Estes valores foram de $1,03 \pm 0,065$ e $0,90 \pm 0,009$, respetivamente. O valor da TCA é tanto melhor quanto mais baixo for.

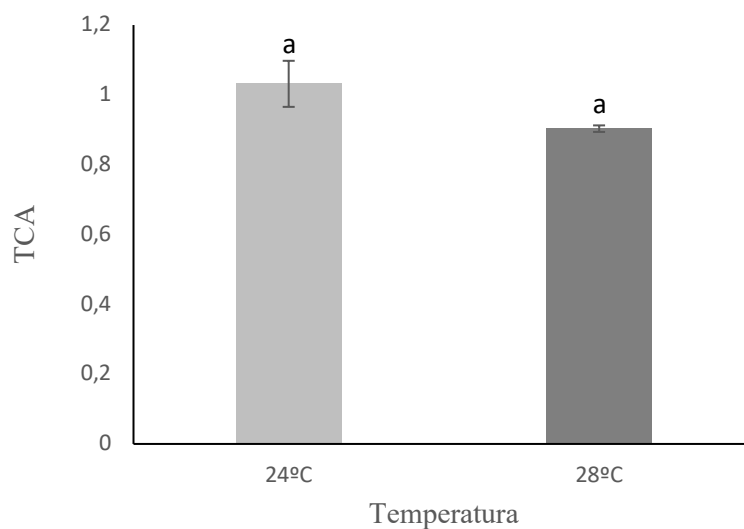


Figura 15 - Taxa de conversão alimentar (TCA) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Desde a época em que foi proposto em 1981 (Iwama & Tautz 1981), o modelo de coeficiente de crescimento térmico (TGC) tem sido amplamente utilizado para fins preditivos no planejamento de produção. Os valores de TGC (figura 16) foram mais elevados no tratamento de 28°C comparativamente ao de 24°C. Estes foram, respectivamente, $0,56\% \pm 0,01$ e $0,45\% \pm 0,02$.

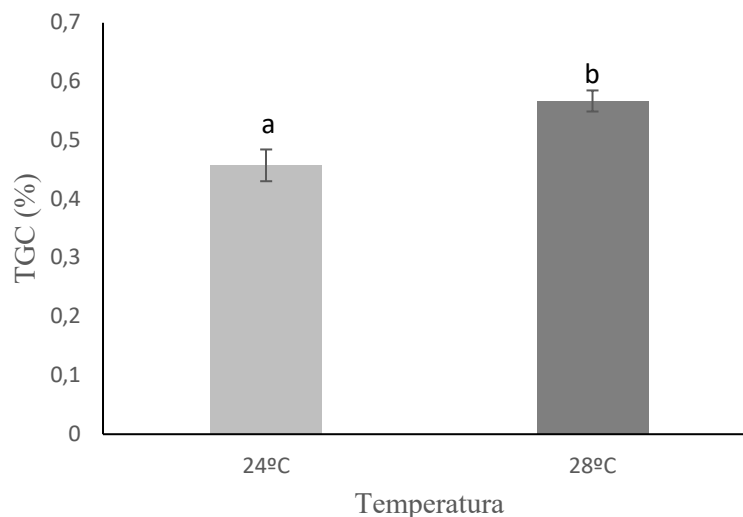


Figura 16 - Coeficiente de crescimento térmico (TGC) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O fator de condição (K) foi originalmente desenvolvido e aplicado na área da biologia pesqueira (Fulton, 1904). Este fator é uma medida quantitativa do bem-estar do peixe, podendo fornecer uma possível relação da sua condição corporal e/ou do seu estado fisiológico com o meio em que vive. No presente estudo, relativamente ao K (figura 17), foram obtidos valores mais elevados no tratamento de 24°C ($1,16 \pm 0,01$) do que no tratamento de 28°C, onde o valor médio foi de $1,15 \pm 0,02$.

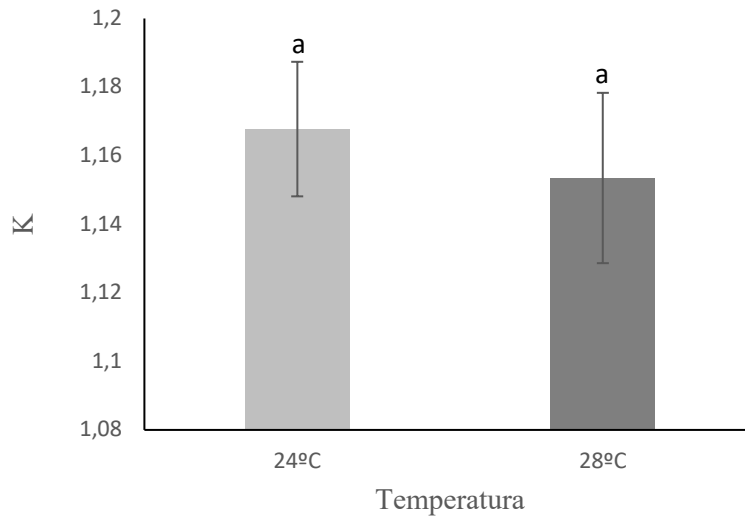


Figura 17 – Fator de condição (K) apresentado com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=882 na temperatura de 24°C e n=869 na temperatura de 28°C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

3.2. Sobrevivência

A percentagem de sobrevivência foi bastante elevada em ambos os tratamentos, no entanto, no tratamento de 24°C o seu valor foi ligeiramente mais elevado do que no tratamento de 28°C (figura 18). Já seria expectável que a sobrevivência obtida fosse elevada porque estamos a trabalhar com indivíduos juvenis.

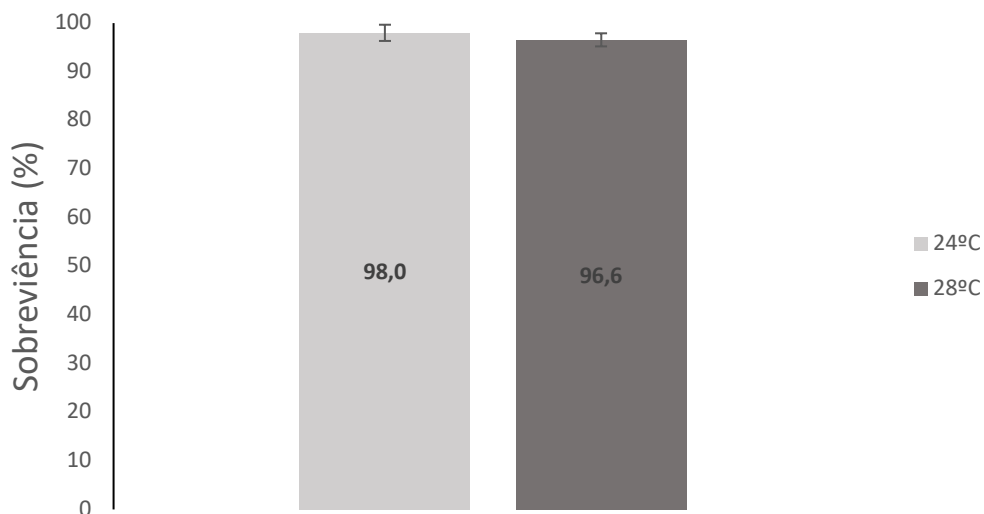


Figura 18 - Sobrevivência média (em percentagem) dos juvenis de corvina nos dois tratamentos.

3.3. *Stress oxidativo*

Na figura 19 encontra-se a representação gráfica da atividade da catalase. O seu valor foi mais elevado nos peixes sujeitos ao tratamento de 24°C, sendo este de $88,64 \pm 57,95$. O valor da catalase no tratamento de 28°C foi de $79,64 \text{ U mg proteína}^{-1} \pm 71,73$.

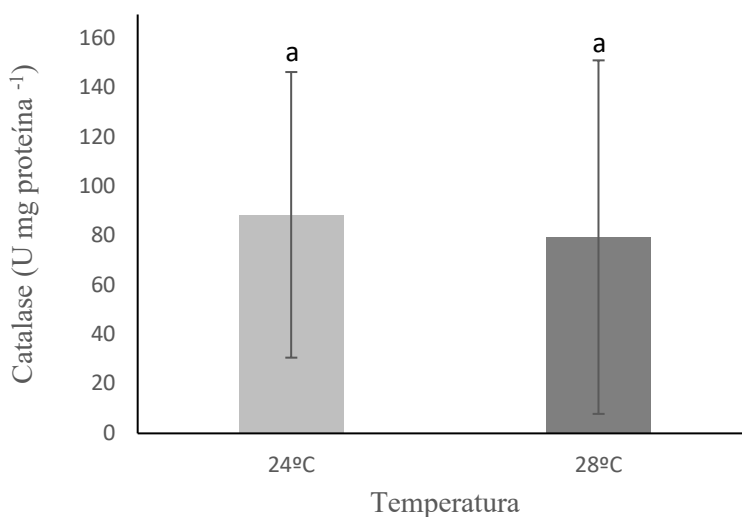


Figura 19 - Atividade da catalase expressa em $\text{U mg proteína}^{-1}$ apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo ($n=36$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Relativamente à atividade da superóxido dismutase (figura 20), esta foi mais elevada no tratamento de 28°C, com um valor de $27,09 \pm 5,31$ enquanto no tratamento de 24°C o valor obtido foi de $26,42 \text{ U mg proteína}^{-1} \pm 4,11$. Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.

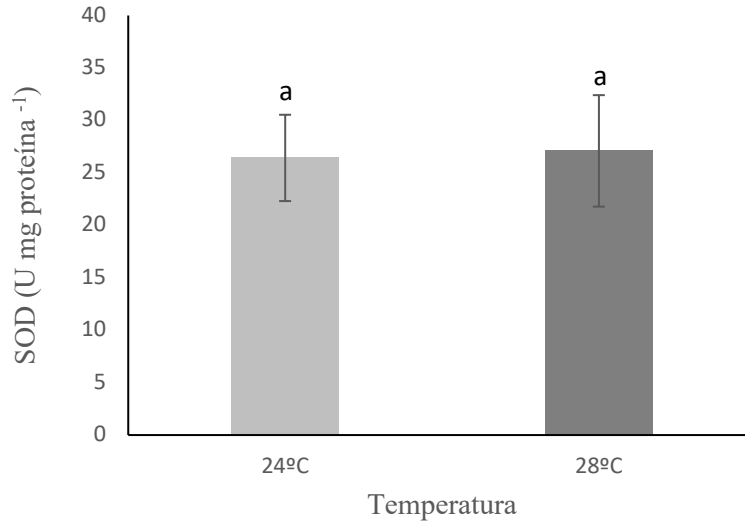


Figura 20 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) expressa em U mg proteína⁻¹ apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

A atividade da glutathione peroxidase dependente (figura 21) foi maior no tratamento de 24°C, tendo sido obtido um valor de 39,65 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína \pm 5,64, do que no tratamento de 28°C, cujo valor foi de 35,89 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína \pm 10,85. Relativamente à glutathione peroxidase independente (figura 22), o seu valor também foi superior no tratamento de 24°C (48,30 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína \pm 7,99) do que no tratamento de 28°C (39,61 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína \pm 14,16).

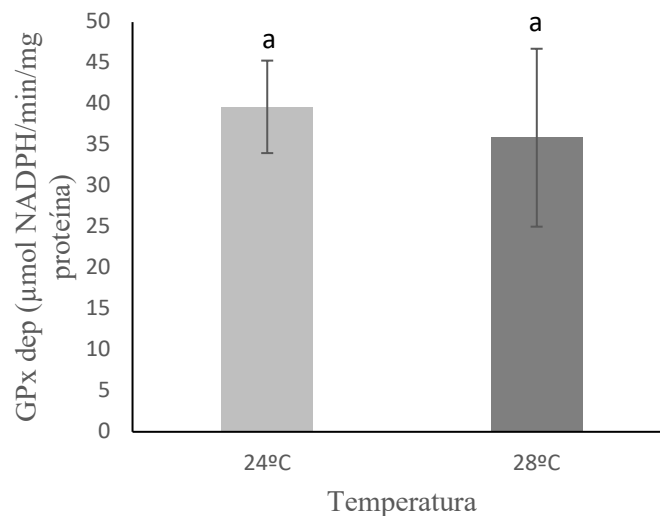


Figura 21 - Atividade da glutatona peroxidase dependente (GPx dep) expressa em $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo ($n=36$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

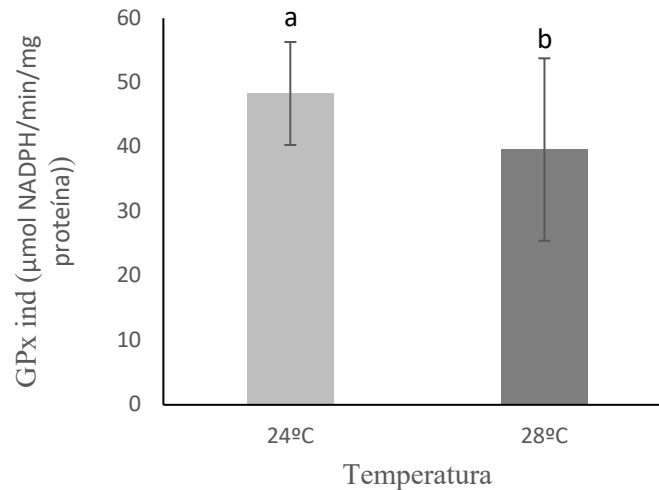


Figura 22 - Atividade da glutatona peroxidase independente (GPx ind) expressa em $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ proteína apresentada com média \pm desvio padrão dos dois tratamentos em estudo ($n=36$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A atividade da peroxidação lipídica, representada graficamente na figura 23, apresentou valores mais elevados no tratamento de 24°C do que no de 28°C, sendo estes de $335,72 \text{ nmol TBARS g}^{-1} \pm 191,04$ e $331,13 \text{ nmol TBARS g}^{-1} \pm 86,55$, respectivamente.

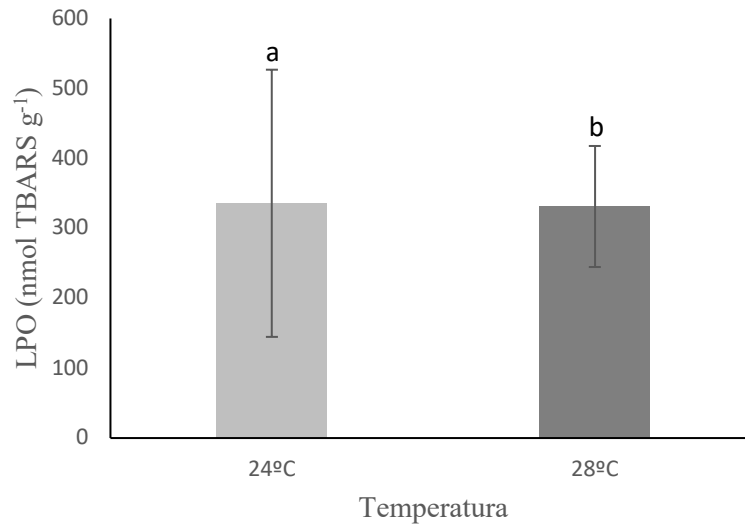


Figura 23 - Atividade da peroxidação lipídica (LPO) expressa em nmol TBARS g⁻¹ apresentada com média ± desvio padrão dos dois tratamentos em estudo (n=36). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

4. Discussão

A temperatura teve um efeito significativo na performance de crescimento dos juvenis de corvina. A sobrevivência nos dois tratamentos foi muito elevada ($98\% \pm 1,67$ no tratamento de 24°C e $96,6\% \pm 1,35$ no tratamento de 28°C), como já seria espectável porque se trata de indivíduos juvenis. Grande parte da mortalidade verificada resulta do facto de alguns peixes terem saltado para fora dos tanques, embora estes estivessem cobertos por uma rede. Os resultados de peso e comprimento mostraram diferenças entre as duas temperaturas em estudo. Na temperatura mais elevada, de 28°C , o peso e o comprimento dos juvenis no final do estudo foram superiores do que na temperatura de 24°C . Isto demonstra que os juvenis de corvina sujeitos à temperatura mais elevada crescem mais rapidamente, no mesmo intervalo de tempo. Como foi dito anteriormente, a temperatura é um fator importante no cultivo de várias as espécies. No entanto, para a corvina ainda se torna mais importante uma vez que tem um crescimento rápido e por isso a sua produção adequa-se em sistemas de recirculação (RAS). Para além disso, em RAS é fácil ter temperaturas bastante mais controláveis e estáveis e, portanto, é essencial estudar a temperatura ótima de crescimento para esta espécie. Adicionalmente, este resultado, mostra que os juvenis de corvina continuam a ter um bom crescimento a uma temperatura de 28°C , sabendo que vários estudos já mostraram um bom crescimento à temperatura de 24°C .

Para além dos resultados de comprimento e peso terem sido melhores na temperatura de 28°C , também apresentaram uma dispersão semelhante entre indivíduos, isto é, não houve uma grande discrepância de peso entre os indivíduos do tratamento de 28°C . Este resultado é muito positivo, porque é importante que uma aquacultura produza indivíduos com pesos e comprimentos semelhantes entre si, tornando os seus lotes mais equilibrados e constantes. Este equilíbrio de lotes também é positivo do ponto de vista logístico e económico uma vez que evita a necessidade de triagem dos mesmos, processo que acarreta custos e dificuldades na gestão das produções.

A fórmula mais comumente usada para a expressão da taxa de crescimento dos peixes é a taxa de crescimento instantânea, conhecida como taxa de crescimento

específica, que é baseada no logaritmo natural do peso corporal e pode ser usada para comparar o crescimento diariamente. Uma vez que os peixes não possuem um crescimento linear ao longo da sua vida, o SGR pode depender de diversos fatores como a espécie, a idade, o tamanho, a alimentação e também a temperatura da água a que o peixe se encontra exposto. O crescimento prevê-se através de um modelo que possibilita estimar a percentagem de crescimento num determinado intervalo de tempo. É importante calcular o SGR neste estudo para se perceber como variou o crescimento dos juvenis ao longo do tempo do estudo nas diferentes temperaturas.

Esta taxa apresentou valores superiores na temperatura de 28°C. Também o índice de crescimento diário foi superior na temperatura de 28°C. Estatisticamente, tanto os valores de SGR como os de DGI diferiram entre tratamentos, o que indica sinais positivos no crescimento dos juvenis nesta temperatura.

A taxa de conversão alimentar é o quociente entre a quantidade necessária de alimento ingerido para que um indivíduo aumente 1kg de peso vivo num determinado intervalo de tempo. Como tal, uma menor TCA significa que é necessária menor quantidade de alimento ingerido para que um indivíduo aumente 1kg. Em aquacultura é importante que os peixes atinjam um bom crescimento com a menor quantidade de ração ingerida possível, uma vez que a ração é o fator de maior custo de produção. Neste estudo, embora não tenha sido estatisticamente significativo, a TCA foi menor no tratamento de 28°C, o que poderia indicar que tendencialmente os juvenis de corvina aproveitam de forma mais eficiente a ração do que quando expostos a uma temperatura de água superior.

O coeficiente de crescimento térmico (TGC) é utilizado para prever o crescimento de uma determinada espécie ou *stock* em relação à sua dieta, condição de produção e temperatura (Al-Dubakel et al., 2011). A popularidade do modelo está relacionada com a facilidade de uso e flexibilidade. Dados de crescimento obtidos de peixes de determinado tamanho expostos a uma determinada temperatura podem ser utilizados para prever o crescimento de peixes de tamanho diferente quando mantidos noutras temperaturas. No entanto, isto não se aplica a todas as condições nas quais os peixes são cultivados e o uso incorreto do modelo TGC pode levar a erros de projeção. Este coeficiente foi maior no tratamento de 28°C (0,56) do que no tratamento de 24°C (0,45) o que indica que houve um maior crescimento em relação às condições de produção e temperatura da água. Noutro estudo (Ruiz et al., 2019), avaliou-se o efeito

de diferentes dietas no crescimento de juvenis de corvina. Os valores obtidos para o TGC variaram de 2,81 a 3,1, sendo estes mais elevados comparativamente ao presente estudo. Num outro estudo (Mansour et al., 2017), onde também foram testadas diferentes dietas em corvinas juvenis, os valores obtidos de TGC variaram entre 0,43 e 2,75.

O fator de condição (K) é uma medida quantitativa do bem-estar do peixe e é também muito importante para perceber a condição do mesmo. Apesar de amplamente utilizado, existem várias críticas a este fator quanto à sua aplicação. A principal crítica é que não permite comparações entre populações, a menos que tenham a mesma relação peso-comprimento. No entanto, o fator de condição relativo permite comparar condições de diferentes indivíduos de uma mesma amostra independente do comprimento. O K deve permanecer constante independentemente do tamanho que o peixe possa ter, num determinado período da sua vida. Se o seu valor for inferior a 1, os peixes são considerados magros ou mal nutridos. No nosso estudo, para os valores de K não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos em estudo. No entanto, em ambas as temperaturas o K foi superior a 1, indicando que nos dois tratamentos os juvenis se encontraram em condições positivas de bem-estar. No artigo de Ruiz et al. (2019), também são apresentados valores de K para as diferentes dietas estudadas. Nesse artigo foram obtidos valores de 1,1 e de 1,2, sendo estes muito semelhantes aos do presente estudo (1,16 na temperatura de 24°C e 1,15 na temperatura de 28°C). No estudo anteriormente indicado de Mansour et al. (2017), os valores obtidos de K variaram de 0,93 a 1,4 sendo estes também semelhantes aos do presente estudo.

Um estudo realizado em 2021 (Stavrakidis-Zachou et al., 2021) também tentou perceber de que forma juvenis de corvina reagiam a diferentes temperaturas de água. As temperaturas utilizadas neste estudo foram de 24°C, 29°C e 34°C. Em relação ao comprimento e peso dos juvenis, estes foram sempre superiores nas temperaturas de 24°C e de 29°C, sendo que na temperatura de 24°C foram sempre ligeiramente superiores. Apesar dos resultados apresentados neste estudo não serem concordantes com os observados por Stavrakidis-Zachou et al. (2021), os nossos dados sugerem que os animais se adaptaram muito bem às condições de cultivo, como se verifica pelo aumento do peso e do comprimento, pela melhoria da taxa de conversão e pela

não alteração das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo do *stress* oxidativo.

No estudo anteriormente mencionado, a mortalidade não se verificou nestas duas temperaturas, mas verificou-se na temperatura de 34°C, comprovando que esta acaba por ser prejudicial ao desenvolvimento dos juvenis. Também a TCA apresentou melhores valores nas temperaturas de 24 e 29°C comparativamente à de 34°C, sendo que obtiveram valores de $1,02 \pm 0,14$ para os 24°C e $1,30 \pm 0,10$ para os 29°C após 1 mês de estudo. No nosso estudo, embora os resultados para este parâmetro de crescimento não tenham sido estatisticamente significativos, conseguiu-se, ainda assim, obter melhores valores da TCA, ou seja, valores mais baixos para as duas temperaturas em estudo, comparativamente aos resultados de Stavrakidis-Zachou et al. (2021). Para os 24°C o valor que se obteve foi de 1,03, semelhante ao valor obtido no estudo mencionado para os 24°C, mas para os 29°C obteve-se um valor de 0,90, sendo este um valor bastante inferior ao valor obtido por Stavrakidis-Zachou et al. (1,30).

Num outro estudo realizado em 2021 (Kounna et al., 2021), foram testadas quatro temperaturas diferentes (17, 20, 23 e 26°C) no desempenho do crescimento e utilização de nutrientes em juvenis de corvina. Neste estudo o peso máximo alcançado foi no tratamento de 26°C, o que também sugere que temperaturas mais elevadas têm influência no crescimento e no aumento de peso desta espécie, assim como se verificou no presente trabalho. Nesse estudo de 2021, o SGR aumentou progressivamente com o aumento de temperatura tendo, aos 17°C um valor de $0,57 \pm 0,04$ e aos 26°C um valor mais elevado de $1,45 \pm 0,02$. No presente estudo obtiveram-se valores de SGR mais elevados do que os valores do estudo anteriormente mencionado ($5,32 \pm 0,13$ no tratamento de 24°C e $6,05 \pm 0,06$ no tratamento de 28°C). Uma vez que o SGR representa a taxa de aumento de biomassa numa população de células por unidade de concentração de biomassa, isso significa que este trabalho obteve melhores resultados neste parâmetro. Tanto no estudo de Kounna et al. (2021), como no presente estudo, temperaturas mais elevadas evidenciam maiores valores de SGR. Relativamente à TCA, este mesmo estudo (Kounna et al., 2021) obteve valores que variaram entre $1,40 \pm 0,04$ na temperatura de 17°C, $1,05 \pm 0,02$ na temperatura de 23°C e $1,10 \pm 0,01$ na temperatura de 26°C. Estes valores indicam que, mais uma vez, as temperaturas mais elevadas obtiveram menores valores para a taxa de

conversão alimentar, indicando que é necessária menor quantidade de ração para o aumento de peso do peixe. Ainda assim, o valor da TCA obtido para os 28°C no presente estudo (0,90) continua a ser inferior aos valores obtidos nos estudos mencionados, o que se mantém uma forte e positiva indicação de que os juvenis de corvina com uma temperatura de 28°C têm um ótimo desempenho no crescimento. Ainda neste estudo de 2021, de Kounna et al., foram calculados valores do TGC que são bastante semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Os valores apresentados por Kounna et al. (2021), variaram entre $0,40 \pm 0,02$ no tratamento de 17°C, $0,69 \pm 0,03$ com a temperatura de 20°C, $0,77 \pm 0,03$ na temperatura de 23°C e um valor de $0,76 \pm 0,01$ para a temperatura mais elevada de 26°C. Os valores do TGC foram aumentando com o aumento de temperatura também. No presente estudo foi obtido um valor do TGC mais elevado de $0,56 \pm 0,01$ no tratamento de 28°C e de $0,45 \pm 0,02$ no tratamento de 24°C. Aquele estudo de 2021 concluiu que os juvenis de corvina crescem eficientemente num intervalo de temperatura de 20 a 26°C e que 17°C pode ser considerado o limiar de temperatura abaixo da qual o desempenho de produção é prejudicado. Nesse estudo deduziu-se que o desempenho de crescimento será mais eficiente numa temperatura de 25,7°C e que a utilização mais eficaz de nutrientes será numa temperatura entre 23,1 e 23,6°C. No entanto, no nosso estudo conseguimos mostrar que é possível ir até mais alto no valor de temperatura e obter bons resultados.

Um outro estudo (Kır et al., 2017) avaliou-se a tolerância térmica e a preferência de temperatura em juvenis de corvina. Os juvenis deste estudo foram, durante 30 dias, expostos a diferentes temperaturas: 18°C, 22°C, 26°C e 30°C. Estes autores não mediram nenhum parâmetro de crescimento que tenha também sido medido no nosso estudo, porém, utilizaram o método da temperatura dinâmica para estimar mínimos térmicos críticos e máximos térmicos críticos. Através dessa estimativa obtiveram resultados que lhes permitiram afirmar que as temperaturas ótimas para o cultivo de juvenis de corvina se encontram entre os 26°C e os 30°C. Este resultado amplifica os resultados também obtidos no nosso estudo, em que a temperatura que apresentou melhores resultado (28°C) se encontra também entre estes intervalos de temperaturas. Isto também comprova que para além da temperatura de 24°C ser eficiente no crescimento dos juvenis desta espécie, a temperatura de 28°C também é eficiente e até apresenta melhores resultados de crescimento.

A temperatura pode induzir ao *stress* oxidativo devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio que derivam do aumento do metabolismo dos animais. Normalmente, os organismos respondem pela regulação positiva de enzimas antioxidantes como as analisadas neste estudo. Estas enzimas têm a função de inativar as espécies reativas de oxigénio, como tal, quando se encontram em maiores quantidades podemos deduzir que existe um maior *stress* oxidativo a combater no organismo do peixe.

Neste estudo a catalase, a GPx e a LPO apresentaram valores mais baixos no tratamento de 28°C, o que indicaria que a esta temperatura os juvenis sofrem menor *stress* oxidativo comparativamente com o tratamento de 24°C, o que é um fator muito positivo. No entanto, estatisticamente não existem diferenças significativas entre os dois tratamentos para o caso da GPx dependente, catalase e LPO. O facto de não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas temperaturas em estudo é um bom resultado. Isto significa que, apesar do aumento da temperatura e consequente aumento do metabolismo dos juvenis, não se obteve um aumento do *stress* oxidativo.

Ainda assim, na GPx independente existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos de temperatura, ou seja, para esta enzima houve maiores valores no tratamento de 24°C. Isto significa que esta temperatura causou uma maior produção desta enzima nos juvenis e teve, portanto, influência no *stress* oxidativo dos mesmos.

A SOD apresentou uma tendência de valores mais baixos no tratamento de 24°C, o que poderia indicar que ainda assim os juvenis sofreram algum *stress* oxidativo quando sujeitos a esta temperatura, embora nestes resultados não existam diferenças estatisticamente significativas entre os dois tratamentos e se trate apenas de uma tendência.

Através dos resultados obtidos, podemos afirmar que efetivamente continua a haver um bom desempenho do crescimento a uma temperatura superior a 24°C, neste caso, especificamente de 28°C. Verifica-se que o aumento da temperatura não tem impacto na atividade das enzimas do *stress* oxidativo.

No global, tanto em relação ao desempenho do crescimento como em relação ao *stress* oxidativo, a grande maioria dos resultados obtidos neste estudo corroboram a

teoria de que a temperatura ótima de crescimento da espécie é uma temperatura mais elevada do que a que está habitualmente a ser utilizada.

5. Conclusão

Segundo os objetivos propostos para este estudo, é possível concluir-se que a temperatura tem uma influência muito significativa no crescimento de juvenis de corvina-legítima. A temperatura influencia diretamente e a composição corporal dos peixes, controlando o consumo de ração, a taxa metabólica e as taxas enzimáticas.

Praticamente todos os parâmetros avaliados foram bastante positivos no tratamento de 28 °C, sendo superiores quando comparados com os resultados obtidos a uma temperatura de 24 °C.

A sobrevivência dos juvenis foi muito elevada, indicando que nenhum dos dois tratamentos em estudo causou por si só mortalidade de indivíduos, como seria de esperar tendo em conta o intervalo de temperaturas ótimas e toleradas por juvenis de corvina. Em relação ao aumento de peso e comprimento dos indivíduos, este foi significativamente maior na temperatura de 28°C comparativamente à de 24°C, indicando que é uma temperatura eficiente para o crescimento de juvenis desta espécie.

O índice K e a TCA foram os dois únicos parâmetros da performance de crescimento cujos resultados não foram estatisticamente significativos, não sendo possível retirar uma conclusão concreta em relação a qual dos dois tratamentos seria mais eficiente. No entanto, o valor obtido da TCA foi muito positivo no tratamento de 28°C, sendo este o valor mais baixo de todos os estudos com os quais foi comparado, embora não seja significativa a diferença de resultados entre os dois tratamentos e, portanto, não seja possível afirmar que uma das temperaturas foi mais eficiente em relação à outra. Os restantes parâmetros de crescimento foram estatisticamente significativos e os seus valores foram sempre superiores no tratamento de 28°C comparativamente ao tratamento de 24°C, indicando que, de modo geral, com uma temperatura da água a 28°C existe um maior desempenho a nível do crescimento dos juvenis de corvina.

Relativamente ao *stress* oxidativo, apenas a GPx dependente apresentou valores estatisticamente significativos. Os restantes, embora tenham tido valores maioritariamente mais elevados na temperatura de 24°C (sugerindo que sofrem um maior *stress* oxidativo neste tratamento), não foram estatisticamente significativos e, como tal,

não é possível concluir qual dos dois tratamentos seria mais eficiente para evitar o *stress* nestes indivíduos.

O tratamento de 28°C foi aquele em que se obteve melhores resultados principalmente no que diz respeito à performance de crescimento dos juvenis de corvina. Com isto podemos concluir que entre os dois tratamentos em estudo existe um maior desempenho de produção utilizando a temperatura mais elevada de 28°C. No entanto, não se verificou que o tratamento de 24°C prejudicasse o crescimento dos juvenis, apenas apresentou resultados menos promissores. Isto sugere que com uma temperatura de água de 28°C se tem uma produção eficiente de juvenis de corvina-legítima.

Seria interessante, no futuro, repetir este estudo utilizando um maior intervalo de temperaturas.

A corvina-legítima é uma espécie com grande potencial para o cultivo em RAS, apresentando um crescimento rápido com potencial de processamento. A informação e os resultados obtidos neste estudo são relevantes para o setor da aquacultura na medida em que comprovam que, para além da temperatura de 24°C ser ajustada à produção desta espécie, a temperatura de 28°C consegue ser ainda mais promissora. Isto porque os resultados obtidos foram muito positivos e substancialmente melhores do que na temperatura mais baixa, principalmente no que diz respeito à performance de crescimento.

6. Bibliografia

- Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. 'Izzati. (2021). Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current issues and treatment technology. *Journal of Environmental Management*, 287 (March), 112271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112271>
- Al-Dubakel, A. Y., Jabir, A. A., & Al-Hamadany, Q. H. (2011). Growth performance and implication of a thermal-unit growth coefficient of grass carp *ctenopharyngodon idella* and silver carp *hypophthalmichthys molitrix* larvae reared in recirculation system. *Journal of King Abdulaziz University, Marine Science*, 22(2), 33–43. <https://doi.org/10.4197/Mar.22-2.3>
- Antonopoulou, E., Chatzigiannidou, I., Feidantsis, K., Kounna, C., & Chatzifotis, S. (2020). Effect of water temperature on cellular stress responses in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(3), 1075–1091. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00773-0>
- Bohnes, F. A., Hauschild, M. Z., Schlundt, J., Nielsen, M., & Laurent, A. (2022). Environmental sustainability of future aquaculture production: Analysis of Singaporean and Norwegian policies. *Aquaculture*, 549 (November 2021). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737717>
- Du, Z. Y., & Turchini, G. M. (2022). Are we actually measuring growth?—An appeal to use a more comprehensive growth index system for advancing aquaculture research. *Reviews in Aquaculture*, 14(2), 525–527. <https://doi.org/10.1111/raq.12604>
- Duarte, S. R. (2016). Qualidade de posturas naturais de reprodutores F1 de corvina (*Argyrosomus regius*): efeito da densidade de cultivo no desenvolvimento larvar. 85.
- Duncan, N. J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C. M., Roo, J., Schuchardt, D., & Vallés, R. (2013). Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): Hatchery techniques, ongrowing and market. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.3.519>
- European Commission. (2022). *Case study Meagre in the EU* (Issue June). <https://doi.org/10.2771/28936>
- 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. Rome.
- FAO 2022. *Argyrosomus regius*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Stipa, P.; Angelini, M. Fisheries and Aquaculture Division. Rome.
- Gjedrem, T., & Robinson, N. (2014). Advances by Selective Breeding for Aquatic Species: A Review. *Agricultural Sciences*, 05(12), 1152–1158. <https://doi.org/10.4236/as.2014.512125>
- Guerreiro, I., Serra, C. R., Coutinho, F., Couto, A., Castro, C., Rangel, F., Peres, H., Pousão-Ferreira, P., Matos, E., Gasco, L., Gai, F., Oliva-Teles, A., & Enes, P. (2021). Digestive enzyme activity and nutrient digestibility in meagre (*Argyrosomus regius*) fed increasing levels of black soldier fly meal (*Hermetia illucens*). *Aquaculture Nutrition*, 27(1), 142–152. <https://doi.org/10.1111/anu.13172>
- 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(1–4), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.042>
- Kır, M. (2020). Thermal tolerance and standard metabolic rate of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 93(August). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102739>
- 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>
- Kounna, C., Fountoulaki, E., Miliou, H., & Chatzifotis, S. (2021). Water temperature effects on growth performance, proximate body and tissue composition, morphometric characteristics and gastrointestinal evacuation processes of juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso 1801). *Aquaculture*, 540(March), 736683. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736683>
- Kružić, N., Mustać, B., Župan, I., & Čolak, S. (2016). UZGOJ HAME (*Argyrosomus*

- regius* ASSO, 1801) U HRVATSKOJ. *Ribarstvo, Croatian Journal of Fisheries*, 74(1), 14–19. <https://doi.org/10.1515/cjf-2016-0003>
- Mansour, A. T. E., Goda, A. A., Omar, E. A., Khalil, H. S., & Esteban, M. Á. (2017). Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.060>
- Martins, R., & Carneiro, M. (2018). *Manual De Identificação De Peixes Ósseos Da Costa Continental Portuguesa*. DOI?
- Miller, M., Cotrim, C. F. C., Souza, L. De, & Pq, O. (2009). *Capacidade antioxidante em peixes como biomarcador da qualidade da água. Ic*. DOI
- Monfort, M. C. (2010). Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture, Studies and Reviews. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2022). Anthropogenic temperature fluctuations and their effect on aquaculture: A comprehensive review. *Aquaculture and Fisheries, December*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.12.005>
- Pereira, T. G., Carvalho, L., Grade, A., Pousão-Ferreira, P., & Gonçalves, A. (2022). Variações na textura, conteúdo lipídico e fibras musculares de corvinas de três tamanhos comerciais diferentes, capturadas no inverno e no verão / Seasonal variations in texture, fat content and muscle cellularity in meagre, *Argyrosomus regius*, of three d. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 5(2), 2172–2187. <https://doi.org/10.34188/bjaerv5n2-056>
- Prista, N. M. G. G. (2013). *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) fishery and ecology in Portuguese waters, with reference to its relationships to other European and African populations. 258.
- Ribeiro, B. D. C. (2011). Desenvolvimento de produtos reestruturados de corvina (*Argyrosomus regius*) de aquacultura.
- Ruiz, M. A., Betancor, M. B., Robaina, L., Montero, D., Hernández-Cruz, C. M., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Fontanillas, R., & Caballero, M. J. (2019). Dietary combination of vitamin E, C and K affects growth, antioxidant activity, and the incidence of systemic granulomatosis in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 498, 606–620. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.078>
- 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>
- Soares, F., Ribeiro, L., Gamboa, M., Duarte, S., Mendes, A. C., Castanho, S., Barata, M., Lourenço, T. M., & 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>
- Stavrakidis-Zachou, O., Lika, K., Michail, P., Tsalafouta, A., Mohamed, A. H., & Nikos, P. (2021). Thermal tolerance, metabolic scope and performance of meagre, *Argyrosomus regius*, reared under high water temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 100(March), 103063. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103063>
- Yue, K., & Shen, Y. (2021). An overview of disruptive technologies for aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.04.009>

7. Anexos

7.1. Anexo I: Protocolo para a catalase

Para se preparar a solução stock de tampão fosfato a 1M (pH 7) preparou-se uma primeira solução KH_2PO_4 a 1M e para isso dissolveu-se 13,608g em 100mL de H_2O mili-Q (MQ). De seguida preparou-se a solução K_2HPO_4 a 1M, dissolvendo-se 87,09g em 500mL de H_2O MQ. Adicionou-se 50mL da primeira solução preparada a 250mL da segunda solução referida. Verificou-se e ajustou-se o pH e adicionou-se H_2O MQ para perfazer 500ml de solução.

Para a solução stock de H_2O_2 (30%) a 1M misturou-se 5,1 mL de H_2O_2 a 30% com 2,5mL de Tampão Fosfato (1M) e com 42,4mL de H_2O MQ.

Para a solução tampão de trabalho diluiu-se 20x a solução stock de tampão fosfato a 1M para obter uma solução de tampão fosfato a 50mM e adicionou-se 5mL de tampão fosfato (a 1M) a 95mL de H_2O (MQ). De seguida, adicionou-se 4mL de H_2O_2 (1M) a 96mL de Tampão Fosfato a 50mM.

7.2. Anexo II: Protocolo para Glutathione Peroxidase

Para preparar a solução tampão misturou-se uma solução (50 mM) composta por 1,7011g de KH_2PO_4 , 0,0093 g de EDTA, 0,00244 g de NaN_3 e 250 ml de Água MQ a uma solução (50mM) composta por 4,3545 g de K_2HPO_4 , 0,0186g de EDTA, 0,00488 g de NaN_3 e 500 ml de água MQ. Após misturar essas duas soluções, ajustou-se o pH a 7,6 e armazenou-se a solução a 4°C.

Para o substrato da GPx dependente utilizou-se 6,38 μL de H_2O_2 30% em 50mL da solução tampão Gpx. Incubou-se a 30°C antes da análise. Para o substrato da GPx independente utilizou-se 9,26 μL de Cumene hidroperóxido 80% e também 50mL da solução tampão Gpx. Incubou-se à mesma temperatura que a GPx dependente. Para a mistura da reação diária utilizou-se 0,01844 g de GSH, 0,00572 g de NADPHm, 29.54 μL de GR e 20mL do tampão GPx. Incubou-se novamente a 30°C antes da análise.

Para a determinação da atividade da GPx total o processamento das amostras foi efetuado adicionando 20 μl do branco (PBS) e 20 μl das amostras nos respetivos poços

em duplicado (mantendo a microplaca no gelo). Adicionou-se 200 µl da solução MRD em todos os poços e incubou-se a 28 °C durante 2 minutos. Adicionou-se 50 µl de cada substrato (peróxido de hidrogénio e cumene hidroperóxido) para dar início à reação. Leu-se a microplaca a 340 nm, a 28 °C.

7.3. Anexo III: Protocolo para Superóxido Dismutase

Para se preparar o tampão SOD buffer (50mM) preparou-se uma solução com 1.701 g de KH_2PO_4 , 0,0093 g de EDTA e 250 ml de água MQ e uma outra solução composta por 0,0037 g de EDTA, 0,8709 g de K_2HPO_4 e 100mL de água MQ. Adicionou-se a primeira solução (ácida) à segunda solução (básica) até se atingir um pH de 7,8.

Para a solução de EDTA (0,1mM) dissolveu-se 0,003722g EDTA em 100mL de água MQ. Para a solução de NaOH (1M) adicionou-se 4g a 100mL de água MQ. Para a solução de xantina (0,72mM) dissolveu-se 0,00275g de Xantina em 25mL de água MQ e acrescentou-se 25µl de NaOH a 1M. Esta solução foi preparada no próprio dia, mantida no gelo e protegida da luz. A solução de NBT com xantina (0,38mM) foi preparada também no próprio dia adicionando 0,0154g de NBT a 50ml de Phosphate buffer com 5mL de solução de xantina. A solução de xantina oxidada (0,1 U/ml) em EDTA (0,1mM) também foi preparada no próprio dia, mantida no gelo e protegida da luz. A solução SOD padrão (300 U/mL) foi mantida nas mesmas condições que a anterior e foi realizada suspendendo o reagente SOD em 1mL de tampão fosfato para se obter uma solução com 2800U/mL. Fez-se alíquotas com 60µl e congelou-se a -80°C.

Preparou-se uma solução de trabalho SOD padrão com 55 µL da solução stock e adicionou-se 445µL de tampão SOD buffer para se obter uma solução de 300 U/mL.

7.4. Anexo IV: Protocolo para Peroxidação Lipídica

A solução de Butylated hydroxytoluene (BHT) foi preparada a 4% em acetonitrilo. Para a solução de tris-NaCl adicionou-se 1,2114g de Tris em aproximadamente 300ml de H_2O , utilizando um agitador magnético. De seguida, adicionou-se 4,383g de NaCl e agitou-se. Perfez-se para um volume de 500ml e acertou-se o pH em 8,6 com HCl. A solução foi mantida no frio. Para o reagente N-methyl-2-phenylindole (reagente R1)

adicionou-se 0,107g de N-methyl-2-phenylindole a 50ml de acetonitrilo. Para se preparar o reagente anterior diluído (reagente R2) adicionou-se 6ml de metanol a 18ml de reagente. Para a curva padrão (Padrão de Malonaldehyde bis (dimethyl acetal) -MDA) prepararam-se três soluções (A, B e C). Para a solução A adicionou-se 1ml de MDA 99% a 201ml de tris-NaCL. Para a solução B adicionou-se 1ml da solução A a 2ml da solução Tris-NaCL. Finalmente, para a solução C adicionou-se 20ul da solução B a 10ml da solução Tris-NaCL.