



**Caracterização da reprodução e ensaios de crescimento da
Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852)**

Inês Hermenegildo Silva

2015



Caracterização da reprodução e ensaios de crescimento da Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852)

Inês Hermenegildo Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Raul José Silvério
Bernardino

2015

Título: Estudo da produção de Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852)

Copyright © Inês Hermenegildo Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2015

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/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou em 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.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao Doutor Raul José Silvério Bernardino toda a disponibilidade e orientação prestadas ao longo deste trabalho e por me ter proporcionado o contato com uma espécie tão fascinante.

Ao Laboratório da Caviar Portugal da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve por me ter oferecido os indivíduos que compuseram os grupos reprodutivos.

Aos meus pais por todo o esforço e dedicação que sempre estiveram ao meu lado, colocando sempre em primeiro lugar o meu mestrado apesar de todas as dificuldades ultrapassadas nestes longos meses. E, por isso mesmo, a eles lhes dedico esta dissertação.

Ao meu namorado, que desde início me apelidou, muito carinhosamente, como *Menina das Tilápias*. O meu melhor amigo, o meu grande suporte, que nunca me deixou ir abaixo nos momentos de maior fraqueza.

Aos restantes amigos e colegas que de alguma forma deram alguma ajuda, cada um à sua maneira, neste trabalho.

Um enorme obrigado a todos vocês.

A todos dedico a citação final:

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.” (Isaac Newton)

RESUMO

Três grupos constituídos por indivíduos de tilápia da espécie *Oreochromis mossambicus* foram observados por um período de 6 meses e registado os seus comportamentos reprodutivos, número de fêmeas em incubação e o número de *fry* que nasceram durante este tempo. Cada grupo apresentava proporções sexuais distintas (macho:fêmea), nomeadamente, 1:3, 1:4 e 2:2.

Após a evolução do estágio das *fry* a alevins, foram testados nestes indivíduos 3 dietas experimentais: a dieta RT (ração para tilápia), a dieta RD (dieta para douradas) e a Mix (uma mistura de 50% de cada uma das rações anteriormente referidas). Os alevins foram distribuídos em 9 tanques, 20 indivíduos/tanque, existindo três réplicas por dieta e todos se encontravam a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram alimentados 3 vezes por dia durante 11 semanas, fazendo jejum 1 dia por semana. A cada 2 semanas, os indivíduos eram pesados e medidos e a quantidade de ração era ajustada de acordo com o seu crescimento. Como forma de se reduzir o *stress* neste procedimento de medição e pesagem, utilizaram-se três anestésicos a diferentes concentrações: MS-222 (0,15, 0,25 e 0,35ml L⁻¹), óleo de cravo (0,10, 0,15 e 1,2ml L⁻¹) e 2-fenoxietanol (0,40, 0,60, 0,80 e 1,00ml L⁻¹). Registaram-se os tempos de indução e recuperação e avaliou-se qual o anestésico mais eficaz. No final do ensaio, os indivíduos foram mortos por choque térmico, filetados e sujeitos a estudos para avaliação do teor de proteína, lípidos, humidade e cinzas.

No final de todo este trabalho experimental verificou-se que existiu reprodução nos Grupos 1 e 2 durante os 6 meses e que a melhor proporção sexual é 1:3 (macho:fêmea). Observou-se que as fêmeas que produzem mais posturas seguidas têm um menor número de *fry* por postura e as que fazem um maior intervalo de tempo entre cada postura, produzem posturas com um maior número de *fry*. Para qualquer uma destas opções das fêmeas, a taxa de mortalidade das *fry* é muito reduzida. No ensaio das dietas, os alevins aceitaram com boa aceitabilidade as três dietas mas com o decorrer do tempo, os indivíduos da dieta RD começaram a ganhar hemorragias em algumas partes do corpo. Não existiram diferenças significativas entre as dietas. A dieta Mix foi a que mostrou melhores resultados finais com um peso e comprimento máximos de $4,51 \pm 3,39\text{g}$ e $3,36 \pm 1,81\text{cm}$, respetivamente. Para os valores de WG, SGR e FCR também não existiram diferenças significativas para as três

dietas, sendo a dieta Mix a obter os valores máximos para WG (4,71g) e SGR (2,97% dia⁻¹) mas com o FCR baixo (12,45 g/g). Para os resultados da composição química obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) nos dados da proteína e humidade. A dieta RT foi a que apresentou um maior teor de proteína (18,53%) e os valores máximos para a humidade foram nas dietas RT (80,54%) e Mix (80,57%). Os lípidos e as cinzas não tiveram diferenças significativas e os valores máximos para estes dois parâmetros foram 1,38% e 1,50% na RT, respetivamente. Para os anestésicos estudados existiram diferenças significativas ($P < 0,05$) para os tempos de anestesia e recuperação pertencentes ao MS-222 e 2-fenoxietanol; o óleo de cravo apenas apresentou diferenças significativas no tempo de indução. As concentrações que mais eficazes se mostraram para anestésiar Tilápias Moçambicanas foram: 0,25ml L⁻¹ para o MS-222, 0,10ml L⁻¹ para o óleo de cravo e 0,80ml L⁻¹ e 1,00ml L⁻¹ para o 2-fenoxietanol.

Os resultados deste trabalho sugerem que a reprodução de Tilápia Moçambicana se consegue com bastante sucesso quando se proporcionam condições ótimas, principalmente, a temperatura que é um dos fatores mais importantes; é uma espécie que aceita com facilidade variados tipos de rações; e os anestésicos utilizados mostraram-se eficazes a anestésiar os juvenis desta espécie apesar de ser necessário continuar o estudo com mais concentrações.

Palavras-chave: *Oreochromis mossambicus*, Reprodução, Fry, Dietas, Crescimento, Anestésias

ABSTRACT

Three groups consisting of tilapia individuals, *Oreochromis mossambicus*, were observed for a period of 6 months and registered their reproductive behavior, number of females in reproduction and number of fry born during this time. Each group had different sex ratios (male:female), namely, 1:3, 1:4 and 2:2.

After the evolution of the fry stage to alevins experimental diets were tested: RT diet (tilapia feed), RD diet (sea bream feed) and mix (a mix of 50% of each two feed above referred to). The fry were distributed into 9 tanks, 20 individual per tank, there being three replicates per diet and all were at a temperature of $28 \pm 1^\circ\text{C}$. They were fed 3 times per day for 11 weeks, making fasting 1 day per week. Every 2 weeks subjects were weighed and measured and the amount of feed was adjusted according to their growth. In order to reduce this *stress* measurement and weighing procedure anesthetics were used at three different concentrations: MS-222 (0,15, 0,25 and 0,35ml L⁻¹), clove oil (0,10, 0,15 and 1,2ml L⁻¹) and 2-phenoxyethanol (0,40, 0,60, 0,80 and 1,00 ml L⁻¹). The induction and recovery times were measured and the most effective anesthetic was evaluated. After the experiment the individuals were killed by thermal shock, filleted and subjected to studies to assess the protein, fat, moisture and ash.

At the end of the experimental work it was found that reproduction in Groups 1 and 2 existed during 6 months and the best sex ratio is 1:3 (male:female). It was observed that females that lay eggs more often have a lower number of fry per posture and female with greater time intervals between each posture produce a greater number of fry. For any of these options the fry mortality rate is very low. All the three test diets showed good acceptance but with time, individuals of the RD diet began to gain hemorrhage in some parts of the body. The Mix diet presented better final results with a maximum body weight and length of $4,51 \pm 3,39\text{g}$ and $3,36 \pm 1,81\text{cm}$, respectively. For WG, SGR and FCR values also there were no significant differences in the three diets, the diet Mix get the maximum values, for WG (4,71g) and SGR (2,97% day⁻¹) but with low FCR (12,45 g/g). For the results of chemical composition was obtained statistically significant differences ($P < 0,05$) in the data of protein and moisture. The RT diet was the one with a higher protein content (18,53%) and the maximum values for humidity were in RT diets (80,54%) and Mix (80,57%). Lipids and ash were not significantly different and the maximum values for these two parameters were

1,38% and 1,50% on RT, respectively. For anesthetics studied were no significant differences ($P < 0,05$) for the anesthetic and recovery times belonging to MS-222 and 2-phenoxyethanol; clove oil only showed significant differences in the induction time. Concentrations that the most effective proved to numb Mozambican Tilapia were: 0,25ml L⁻¹ for MS-222, 0,10ml L⁻¹ to clove oil and 0,80ml L⁻¹ and 1,00ml L⁻¹ for 2-phenoxyethanol.

These results suggest that the reproduction of Mozambique Tilapia is achieved with great success when the optimal conditions are provided, the temperature is one of the most important factors; this a species that easily accepts different types of feed; and anesthetics used were effective in numbing the juveniles of this species even though more concentrations must be studied.

Keywords: *Oreochromis mossambicus*, Reproduction, Fry, Diet, Growth, Anesthesia

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE MATÉRIAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aquacultura	1
1.2 Produção aquícola de Tilápias.....	1
1.2.1 Desenvolvimento de tecnologias para a produção de Tilápias.....	2
1.2.2 Tilápias vermelhas.....	5
1.3 A Tribo Tilapiini	6
1.3.1 Tilápia Moçambicana (<i>Oreochromis mossambicus</i>).....	6
1.3.1.1 Distribuição natural.....	7
1.3.1.2 Alimentação	8
1.3.1.3 Salinidade.....	9
1.3.1.4 Temperatura	10
1.3.1.5 Oxigénio, Amónia e pH	11
1.3.1.6 Reprodução	11
1.4 Nutrição.....	13
1.5 Anestésias.....	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 Desenho experimental	18
2.2 Transporte e aclimatização.....	18
2.3 Ensaio de reprodução	20

2.4 Dietas experimentais	21
2.5 Anestesias.....	22
2.6 Detecção do desempenho de crescimento.....	24
2.7 Análises químicas.....	25
2.7.1 Proteína.....	26
2.7.2 Lípidos.....	27
2.7.3 Humidade.....	28
2.7.4 Cinzas	29
2.8 Análise estatística dos dados	30
3. RESULTADOS	32
3.1 Reprodução.....	32
3.2.1 Detecção do desempenho de crescimento.....	39
3.2.2 Análises químicas	44
3.3.1 Tempos médios para os três anestésicos.....	45
4. DISCUSSÃO	51
4.1 Reprodução.....	51
4.2 Nutrição	64
4.3 Anestesias.....	70
5. CONCLUSÕES.....	77
PERSPETIVAS FUTURAS	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ovos de uma fêmea <i>Oreochromis mossambicus</i>	37
Figura 2 - Embrião de <i>Oreochromis mossambicus</i>	37
Figura 3 - Larva de <i>Oreochromis mossambicus</i>	38
Figura 4 - Fry de Tilápia Moçambicana após a sua libertação pela progenitora.....	39
Figura 5 - Tamanhos corporais finais de juvenis de <i>Oreochromis mossambicus</i>	42
Figura 6 - Juvenil de Tilápia Moçambicana com hemorragias corporais alimentado com RD.	42
Figura 7 - Fêmea juvenil da espécie <i>Oreochromis mossambicus</i> com ovos na sua zona ventral.	43
Figura 8 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com três concentrações distintas para o agente anestésico MS-222. Os dados encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.	47
Figura 9 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com três concentrações distintas para o agente anestésico óleo de cravo. Os dados encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.	48
Figura 10 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com quatro concentrações distintas para o agente anestésico 2-fenoxietanol. Os dados encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Estágios de anestesia nos peixes (Weber <i>et al.</i> , 2009).....	23
Tabela II - Quantidade de fêmeas em fase de incubação e de posturas que ocorreram durante o período de estudo da reprodução de <i>Oreochromis mossambicus</i>	34
Tabela III – Número de fêmeas com ovos e comparação das posturas com sucesso e insucesso na eclosão dos ovos. Número total de <i>fry</i> que nasceram durante o ciclo de incubação. Os valores do peso e comprimento dos indivíduos encontram-se representados como média ± Desvio Padrão	35
Tabela IV – Performance de crescimento de juvenis de Tilápia moçambicana alimentados com as dietas experimentais. Comparação de valores de pesos e comprimentos efetuados ao longo do período experimental. Os valores encontram-se representados como média ± Desvio Padrão.	40
Tabela V - Eficiência final na utilização das rações e taxa de sobrevivência de juvenis de <i>Oreochromis mossambicus</i> alimentados com três rações distintas durante 11 semanas. Os valores encontram-se representados como média ± Desvio Padrão.	43
Tabela VI - Composição química final como % de matéria seca de músculo de juvenis de tilápia moçambicana. Os valores encontram-se representados como média ± Desvio Padrão de determinações em triplicado.	44
Tabela VII - Tempos médios de anestesia e de recuperação, em minutos, para as Diferentes concentrações utilizadas nos anestésicos estudados. Os dados encontram-se representados como média ± Desvio Padrão.	46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DO – “Dissolved Oxygen” – Oxigénio dissolvido

ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

EUA – Estados Unidos da América

FAO – “Food and Agriculture Organization” – Organização para a Alimentação e Agricultura

FDA – “Food and Drug Administration” – Administração de Medicamentos e Alimentos

GIFT – “Genetically Improved Farmed Tilapia” – Produção de Tilápias Geneticamente Modificadas

IPL – Instituto Politécnico de Leiria

LC₅₀ – “Lethal Concentration to kill 50% of population” – Concentração letal para matar 50% da população

LEOA – Laboratório Experimental para Organismos Aquáticos

MT – 17 α -metiltestosterona

RD – Ração de Dourada

RT – Ração de Tilápia

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aquacultura

Atualmente, a aquacultura é o setor de produção alimentar com maior crescimento a nível mundial, tendo uma taxa média de crescimento anual de 8,9% desde 1970, em comparação com apenas 1,2% para a pesca de captura e 2,8% para os produtores de animais terrestre, dentro do mesmo período. A aquacultura mundial tem crescido muito nos últimos 50 anos, iniciando-se com uma produção de menos de 1 milhão de toneladas no início de 1950 para 79,7 milhões de toneladas em 2012 (FAO, 2014; Pandiyan *et al.*, 2013). O consumo médio de peixe por ano, numa escala mundial, subiu de 9,9 Kg *per capita* em 1960 para 16 Kg *per capita* em 2000, 18,6 Kg *per capita* em 2010 e 19,2 Kg *per capita* em 2012, como resultado desta rápida expansão. Em 2018, metade dos peixes utilizados para consumo humano serão provenientes da aquacultura e até 2022 prevê-se que este setor forneça um acréscimo adicional de 22 milhões de toneladas de peixe; um aumento de 35%, relativamente aos dados atuais (FAO, 2014; Toufique e Belton, 2014).

Aquacultura é o cultivo de organismos aquáticos: peixes, moluscos, crustáceos e algas. A aquacultura implica que exista, de alguma forma, a intervenção no processo de cultivo para se aumentar a produção, alimentação, proteção contra predadores, etc. (FAO, 2015; Lucas e Southgate, 2003). O objetivo principal da aquacultura é a produção de proteína de origem animal para consumo humano, cumprindo, assim, o princípio básico da atividade – aumentar a quantidade de alimento disponível e converter alimentos de baixo valor económico noutros de valor mais elevado (Henriques, 1998). É pretendido maximizar o crescimento, o desempenho, a eficiência alimentar e a resistência dos organismos aquáticos a potenciais doenças, tendo em conta a redução dos custos na produção por forma a tornar-se uma prática rentável (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012).

1.2 Produção aquícola de Tilápias

Embora o património líquido da indústria da aquacultura seja dominado pelo alto valor das espécies carnívoras, a produção em volume é dominada, principalmente, por sistemas em água doce com peixes herbívoros, incluindo carpas, bagres, tilápias e marisco. A

aquacultura de tilápias tem atravessado um período de rápido crescimento, particularmente, na África, Ásia e algumas partes da América Latina (Canónico *et al.*, 2005). Os cinco principais países produtores durante o ano 2000 foram a China (49,7%), o Egito (12,4%), a Tailândia (7,8%), as Filipinas (7,3%) e a Indonésia (6,7%), da produção total de aquacultura de tilápias a nível mundial (Gupta e Acosta, 2004). As tilápias contribuem cada vez mais na oferta de alimento e fonte de proteína animal para a população humana. Atualmente, a tilápia é o segundo peixe mais cultivado no mundo (5% do total do cultivo global de peixes), tendo produzido mais de 3 milhões de toneladas/ano, em 2009, estando em primeiro lugar as carpas, que respondem com mais de 70% (Ansah *et al.*, 2014). Das várias espécies de tilápia, *Oreochromis* spp., *Tilapia* spp. e *Sarotherodon* spp. como as mais importantes comercialmente, a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a Tilápia azul (*O. aureus*) e vários híbridos destas com a Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*), são as espécies mais comumente produzidas em aquacultura. Por exemplo, na China, foi reportado 1,1 milhões de toneladas de *O. niloticus* produzida em 2008, e cerca de ¼ eram híbridos entre a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e a Tilápia azul (*O. aureus*) (Ansah *et al.*, 2014; Canónico *et al.*, 2005; Ng e Romano, 2013). O termo “frango aquático” é usado para enfatizar a importância da tilápia na aquacultura (Canónico *et al.*, 2005; Cnaani e Hulata, 2008; Lévêque, 2002) devido ao seu potencial com um preço acessível, ótima fonte de proteína animal que pode ser facilmente produzida numa vasta gama de ambientes – de subsistência ou em unidades de aquacultura intensiva (Canónico *et al.*, 2005).

1.2.1 Desenvolvimento de tecnologias para a produção de Tilápias

Devido à crescente importância das tilápias no mundo da aquacultura, a intensidade e diversidade de esforços para melhorar a base genética dessas espécies tem-se intensificado ao longo das últimas décadas. O melhoramento genético é um dos meios mais poderoso e menos dispendioso para aumentar a eficiência da aquacultura. A reprodução animal tradicional e as abordagens genéticas quantitativas baseadas na ciência têm sido usadas para melhorar os fenótipos de tilápia. A reprodução animal tradicional ainda é o método mais fácil para melhorar os *stocks* de tilápia em aquaculturas com pouca tecnologia, o que acontece na maioria dos países (Ansah *et al.*, 2014; Lucas e Southgate, 2003). Culturas de tilápia monossexuada de machos são preferidas às de fêmeas devido ao crescimento

diferencial em favor dos machos. No sexo masculino, a energia metabólica é canalizada para o crescimento. Nas fêmeas, existe uma maior redistribuição da energia metabólica para a reprodução (El-Greisy e El-Gamal, 2012). Por esta razão, o cultivo de populações monossexuadas de tilápia é conseguido através de técnicas como separação de sexos manualmente, inversão sexual com recurso a hormonas, hibridação ou manipulação genética, têm sido relatadas como soluções para o problema da maturação sexual precoce e reprodução indesejada (Lucas e Southgate, 2003).

A separação sexual por meios manuais implica a eliminação das fêmeas com base no dimorfismo sexual observada na morfologia genital: os machos têm uma única abertura, enquanto as fêmeas têm dois orifícios na papila urinogenital. É uma técnica simples mas, contudo, é morosa, exige pessoal qualificado, implica o desperdício das fêmeas e os resultados apresentam uma margem de erros de 3-10% (Gupta e Acosta, 2004; Henriques, 1998; Lucas e Southgate, 2003).

Alguns cruzamentos específicos entre progenitores puros de certas espécies de tilápia originam descendências apenas masculinas. No entanto, a inversão sexual por ação de hormonas incorporadas na dieta, por injeção e imersão em solução aquosa tem vantagens reconhecidas relativamente aos outros métodos (Henriques, 1998). Durante o estágio *fry* , quando o peixe adquire natação livre, é possível alterar o seu desenvolvimento e direcioná-lo para o resultado pretendido. E isto é possível com a determinação do sexo. Geneticamente, o sexo de cada peixe é determinado no momento da fertilização, mas fenotipicamente as *fry* são totipotentes, ou seja, são capazes de desenvolver qualquer fenótipo sexual. No momento, biologicamente certo, um ou mais genes acionam um sinal químico que orientará o tecido totipotente das gónadas para se desenvolver em qualquer um dos órgãos masculinos ou femininos. É nesse momento que o sexo fenotípico é determinado (Lucas e Southgate, 2003). O sexo fenotípico, em algumas espécies de salmonídeos, é determinado antes da eclosão; no bagre do canal e na Tilápia-do-Nilo dá-se nas primeiras 3-4 semanas após a eclosão; e na carpa capim a determinação do sexo fenotípico dá-se já no estágio de alevim (85-200mm) (Dunham, 2004). A eficiência da inversão sexual depende de vários aspetos como a espécie, a hormona usada e a sua dosagem, o método utilizado para administrar a hormona, a temperatura, as datas de início e fim do tratamento e o sistema de cultivo usado durante o tratamento (Lucas e Southgate, 2003). Das diversas hormonas testadas, a 17 α -metiltestosterona (MT) é a mais utilizada, sendo um recurso eficaz e barato para

masculinização das principais espécies de tilápia, principalmente Tilápia-do-Nilo, utilizadas em aquacultura, tanto nos países industrializados como nos em desenvolvimento (Dunham, 2004; El-Sayed *et al.*, 2012). 17 α -metiltestosterona é uma hormona masculina sintética que imita a hormona testosterona produzida naturalmente (El-Greisy e El-Gamal, 2012).

Uma vez que as espécies de tilápia divergiram de um ancestral marinho relativamente recente, alguns representantes do grupo podem hibridizar e produzir descendência viável. Por exemplo, a hibridação de *O. mossambicus* com *O. aureus* foi realizada para a aquacultura com o objetivo de se melhorar a tolerância ao frio (Cnaani *et al.*, 2000). A hibridação intencional para fins de aquacultura levou à descoberta acidental do cruzamento de fêmeas de *O. mossambicus* com machos de *O. urolepis hornorum* que originou a produção de uma descendência exclusivamente do sexo masculino (Gupta e Acosta, 2004; Lucas e Southgate, 2003). Esta descendência mostrou-se mais adequada para a produção intensiva. A hibridação de *O. mossambicus* X *O. niloticus*, no seu meio natural, é preocupante na medida em que, encontrar uma linhagem pura de *O. mossambicus* converteu-se num grande desafio. Isto levanta preocupações uma vez que as adaptações genéticas (*e.g.* resistência à seca, capacidade de sobrevivência e reprodução em águas salinas e resistência a temperaturas tão baixas quanto 11°C) podem ser alteradas através de hibridação (Russell *et al.*, 2012).

O melhoramento genético por meio de seleção, cruzamentos ou ambos, tem sido aplicado no desenvolvimento de linhagens de tilápias visando um traço específico (principalmente a taxa de crescimento). Um esforço bem documentado no melhoramento genético de tilápias é o desenvolvimento do programa de tilápias de cultivo geneticamente modificadas, *Genetically Improved Farmed Tilapias* (GIFT) na Ásia (Canonico *et al.*, 2005; Lucas e Southgate, 2003). A população GIFT base foi criada através do cruzamento de oito linhagens diferentes de Tilápia-do-Nilo, quatro amostras de África e outras quatro de *stocks* de aquaculturas asiáticas (Bentsen *et al.*, 2012; Khaw *et al.*, 2008). Este projeto teve como objetivo principal aumentar a quantidade e a qualidade da proteína consumida por populações rurais e urbanas, de baixo rendimento, em países tropicais em desenvolvimento e em todas as regiões do mundo, conduzindo a um aumento no lucro dos produtores com pouco poder económico. A Tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) foi escolhida como a espécie focal por uma série de razões. Esta espécie tem um tempo de geração curto (aproximadamente 8 meses), o que tornou a espécie perfeita para um programa de melhoramento. O seu desenvolvimento na aquacultura encontrava-se em grande crescimento, ampliando, ainda

mais, a sua importância. Além disso, a dieta omnívora da Tilápia-do-Nilo torna-a uma excelente opção para a aquicultura de baixo custo, em contraste com espécies carnívoras que dependem fortemente de proteína animal extremamente cara, como farinha de peixe (Ansah *et al.*, 2014). Através do programa GIFT foi alcançado um progresso genético médio de 12-17% por geração ao longo de cinco gerações e o aumento na taxa de crescimento de 85% em *O. niloticus* (Gupta e Acosta, 2004; Khaw *et al.*, 2008). E para além da biomassa desta linhagem de “Tilápia-do-Nilo GIFT” existem outros parâmetros genéticos que foram estudados, nomeadamente, a dimensão corporal, o rendimento do filete, a composição da carne e a sua forma e a tolerância ao frio (Lozano *et al.*, 2013; Trong *et al.*, 2013b).

1.2.2 Tilápias vermelhas

Um dos avanços significativos no cultivo de tilápias foi o desenvolvimento da Tilápia Vermelha na década de 1980s. A maioria das tilápias, particularmente *O. mossambicus*, uma espécie que era amplamente cultivada na Ásia, apresenta uma pele com coloração cinza escuro e preto. Esta tonalidade foi considerada pouco atraente em diversos mercados, resultando numa má aceitação do peixe. Os mutantes que possuíam a pele vermelha foram observados em *O. mossambicus*, pela primeira vez em Taiwan (Gupta e Acosta, 2004), e mais tarde nos EUA e Israel. Estes mutantes foram desenvolvidos em linhagens de *O. mossambicus* vermelho, que evocaram forte interesse comercial no cultivo de tilápias (Lucas e Southgate, 2003). A Tilápia Vermelha assemelha-se a espécies marinhas com um nível económico superior como o Dourada-do-Japão (*Pagrus major*) e o Luciano-do-Golfo (*Lutjanus campechanus*) (Gupta e Acosta, 2004; Lucas e Southgate, 2003; Pongthana *et al.*, 2010). Alcançou-se um maior potencial na aceitação pelo consumidor e preços mais elevados em muitos mercados (Pongthana *et al.*, 2010). Como as linhagens de *O. mossambicus* vermelhos puros têm um crescimento lento, foram hibridizados com tilápias que apresentavam um crescimento mais rápido, como *O. niloticus*, *O. aureus* ou os seus híbridos. Como resultado, um grande número de linhagens de Tilápia Vermelha foram produzidas e encontram-se disponíveis para os piscicultores. Existem diferenças entre as diferentes linhagens como a taxa de crescimento, a tolerância a temperaturas baixas e a tolerância a salinidades elevadas (Lucas e Southgate, 2003).

1.3 A Tribo Tilapiini

As tilápias constituem um grupo de Ciclídeos africanos ao qual era atribuído o estatuto de género. No entanto a existência de três sub-agrupamentos com traços da biologia alimentar e da reprodução bem distintos e com distribuições geográficas características levou à criação de três géneros dentro do grupo das tilápias: *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis* (Greiner e Gregg, 2008; Lèveque, 2002; Oliveira, 1995; Russell *et al.*, 2010). No que diz respeito à biologia de reprodução, cada uma das três linhagens possui características próprias dentro do grupo. Assim, o género *Tilapia* é incubador de substrato, *Sarotherodon* é incubador bucal paterno ou biparental e *Oreochromis* é incubador bucal materno. Estes três tipos de cuidados parentais estão correlacionados com uma série de características da biologia reprodutiva. Relativamente ao sistema de acasalamento, *Tilapia* e *Sarotherodon* são monogâmicos, pelo menos para uma postura, e *Oreochromis* são poligâmicos, ocorrendo poliginia e poliandria, estando esta última registada apenas para duas espécies (*O.N. macrochir* e *O. aureus*). Em relação à forma como incubam os seus ovos e larvas, *Tilapia* coloca os seus ovos num substrato. Ambos os progenitores cuidam dos ovos até à sua eclosão. As fêmeas têm a função de ventilar e limpar os ovos com suas barbatanas, enquanto os machos guardam o território (*e.g. T. mariae* e *T. guineensis*); *Oreochromis* coloca os seus ovos num ninho preparado pelos machos. Depois da deposição dos ovos, a fêmea incuba os ovos na boca. O cuidado parental pela fêmea continua por vários dias, mesmo após a eclosão dos ovos e as *fry* já apresentarem natação livre (*e.g. Oreochromis mossambicus*); *Sarotherodon* é bastante semelhante ao comportamento reprodutivo de *Oreochromis*, mas neste género existe incubação bucal dos ovos e larvas bi-parental (*e.g. S. galilaeus*), ou apenas por parte do macho (*e.g. S. melanotheron* e *S. occidentalis*) (Lucas e Southgate, 2003; Oliveira, 1995).

1.3.1 Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*)

A espécie selecionada para o presente estudo foi *Oreochromis mossambicus*, com o nome comum Tilápia Moçambicana, pertencente à ordem Perciformes, família Cichlidae e género *Oreochromis*. *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) foi descrito pela primeira vez

como *Chromis (Tilapia) mossambicus* por Peters (1852) a partir de exemplares recolhidos em Moçambique na região inferior do rio Zambeze até à região do Tete (Oliveira, 1995). É um peixe profundamente encorpado com as barbatanas dorsal e anal quase simétricas e com uma prominente concavidade na mandíbula superior no sexo masculino. O tamanho dos indivíduos adultos geralmente ronda os 30-44 cm para os machos e 25-33cm para as fêmeas sob condições “normais”: esta espécie pode apresentar nanismo envolvendo maturação sexual em tamanhos pequenos de forma a reduzir os efeitos da pressão populacional sobre os recursos bióticos e/ou abióticos na massa de água (Greiner e Gregg, 2008; Webb e Maughan, 2007). As fêmeas e os machos imaturos apresentam uma coloração cinza prateado para verde-azeitona com 2-5 manchas médias laterais. Os machos reprodutores são tipicamente verde-oliveira escuro a preto com branco e amarelo nas partes inferiores da cabeça (opérculo, face e garganta) e margens avermelhadas nas pontas das barbatanas dorsal e caudal. As *fry* e juvenis são em tons de verde-oliveira pálido e cinza prateado. As *fry* medem cerca de 60-80mm de comprimento, com listagens verticais, com ou sem manchas médias laterais. Na zona posterior da barbatana dorsal encontra-se presente uma mancha redonda escura, normalmente, preta (Webb and Maughan, 2007).

1.3.1.1 Distribuição natural

África, excluindo Madagascar mas incluindo partes do Médio Oriente, é a região geográfica natural de todas as tilápias. Em geral, as espécies *Oreochromis* são endémicas nas zonas centrais e do leste de África, enquanto as espécies de *Tilapia* e *Sarotherodon* são mais comuns na zona ocidental. No entanto, espécies como *Tilapia zillii*, *Sarotherodon galilaeus* e *O. niloticus* têm uma área de distribuição natural muito maior. Outra espécie conhecida, *O. aureus*, é nativa do delta do Nilo e do Médio Oriente (Lucas e Southgate, 2003). A distribuição natural de *O. mossambicus* em África é um pouco confusa devido à sua ampla translocação, mas geralmente encontra-se restrito a correntes com fluxo para leste, que se estendem dos rios Zambezi e Shire para sul até à baía Algoa e o rio Bushman. Existem também populações nos rios Hunyani e Shangani mas não é claro se estas populações são nativas ou introduzidas pelo Homem (Russel *et al.*, 2012). Webb e Maughan (2007) afirmam que a Tilápia Moçambicana ocorre em regiões costeiras da África oriental entre 33°S lat. e 17°S lat. incluindo Botswana, Malawi, Lesotho, Moçambique, Suazilândia, Zimbabwe e

África do Sul. E de acordo com Oliveira (1995), a distribuição natural conhecida para *O. mossambicus* tem o seu limite norte, em Quelimane e estende-se ao sul do rio Pongola (27°S, 31°E). No entanto, devido à sua alta tolerância à salinidade esta espécie estende a sua distribuição mais a sul, em habitats estuarinos como o rio Bushman, na Província do Cabo (África do Sul). Esta espécie é uma das espécies de peixes mais amplamente distribuída e foi introduzida em pelo menos 90 países, incluindo a Austrália, onde surge em dois estados: Austrália Ocidental e Queensland (Webb e Maughan, 2007). A espécie foi introduzida principalmente para fins de aquacultura ou para estabelecer a pesca comercial ou recreativa, mas também foi introduzida como um agente de controlo biológico (para larvas de mosquito, fitoplâncton e plantas aquáticas), e como fonte de proteína animal (Canónico *et al.*, 2005; Greiner e Gregg, 2008; Russel *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Foi introduzida, inicialmente, como uma espécie ornamental na Indonésia e EUA, seguindo, como base para a implementação da aquacultura nestes países. A Austrália é o único país onde a espécie foi introduzida exclusivamente para o comércio ornamental (Greiner e Gregg, 2008; Webb e Maughan, 2007). Atualmente, *O. mossambicus* é considerada uma praga que ameaça os ecossistemas naturais que ocupam. Outras tilápias foram deliberadamente estabelecidas numa ampla distribuição geográfica: *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. urolepis hornorum*, *Tilapia rendalli* e *T. zillii* (Lucas e Southgate, 2003).

1.3.1.2 Alimentação

As tilápias são geralmente consideradas herbívoras, detritívoras ou plantívoras (Canónico *et al.*, 2005; Greiner e Gregg, 2008; Lévêque, 2002). A dieta de *Oreochromis mossambicus* consiste em macrófitas aquáticas, algas bentónicas, algas azuis, fitoplâncton, zooplâncton, detritos, perifiton (algas fixas a plantas), ovos e larvas de peixes (Greiner e Gregg, 2008; Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). A *Tilapia mariae* tem uma dieta semelhante à de *Oreochromis mossambicus* que pode ser descrita como planctívora. No entanto, foi documentado para ambas as espécies o consumo de ovos e larvas de outras espécies de peixes (Canónico *et al.*, 2005; Greiner e Gregg, 2008). Vários estudos descobriram bactérias livres e cianobactérias (*Microcystis* spp.) como um componente dominante ou frequente na dieta de juvenis e adultos da Tilápia Moçambicana (e Tilápia-do-Nilo, *O. niloticus*). *O. mossambicus* sofre mudanças ontogenéticas na alimentação, com a

mudança de macrofagia nos estágios *fry* e alevins (*e.g.* bactérias, diatomáceas, microcrustáceos, rotíferos) para macrofagia predominante em adultos. O canibalismo também tem sido relatado em *Oreochromis* incluindo *O. mossambicus* embora ocorra, principalmente, em condições não naturais, tais como aquários e tanques de cultivo (Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007).

1.3.1.3 Salinidade

As tilápias preferem fluxos de água com movimentos lentos ou estuários. São capazes de sobreviver e reproduzir em água doce ou salina e podem mostrar alguma preferência por águas ligeiramente salinas, encontrando-se relacionado com as suas tolerâncias térmicas (Greiner e Gregg, 2008). Após ter evoluído a partir de um antepassado marinho, *O. mossambicus* é considerada, de todas as espécies de tilápia, como uma das mais tolerantes a salinidades elevadas, tolerando entre 0 a 120‰ no lago de Santa Lucia (África do Sul) e reproduz-se, igualmente, em elevadas salinidades (*e.g.* > 30 ‰) (Oliveira, 1995; Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Kamal e Mair (2005) reportam que as grandes populações selvagens existem em muitas áreas de água salobra, refletindo uma maior tolerância ao sal, o que tem sido demonstrado em vários estudos, incluindo um em que foi relatado para esta espécie um ótimo crescimento em salinidades superior a 40‰. Breves *et al.* (2014) afirmaram que a Tilápia Moçambicana é fortemente eurialina e pode aclimatar a salinidades superiores a 70‰, enquanto *Oreochromis niloticus* é visivelmente menos tolerante a elevadas salinidades e não aclimatizam facilmente em salinidades superiores a 25‰. Juvenis e adultos de *O. mossambicus* sobrevivem em transferências diretas de água doce para águas com 20‰, mas não diretamente para 30‰ sem, previamente, um período de aclimatização em 20‰. Inversamente, as *fry* são capazes de sobreviver numa transferência direta de 32‰ para água doce (Webb e Maughan, 2007). Para gerir esses desafios, os peixes teleósteos, incluindo a eurialina Tilápia Moçambicana, evoluíram funções fisiológicas complexas ao nível dos órgãos osmorregulatórios, como as brânquias, os rins e o intestino, que são regidos, em grande parte, pelo sistema endócrino (Seale *et al.*, 2014). Oliveira (1995) refere dois tipos de hemoglobina para *O. mossambicus* e relacionando este fato com o caráter eurialino e euritérmico desta espécie. Um dos tipos de hemoglobina, que só surge aos 47 dias de idade, tem a sua afinidade para o oxigénio pouco

afetada pela salinidade e pela temperatura, o que segundo este autor permitiria aos adultos de *O. mossambicus* colonizar habitats com temperaturas e salinidades mais elevadas do que as toleradas pelos alevins. No entanto, *O. mossambicus* não só ocorre nestas condições como se reproduz, e sabe-se que alevins desta espécie suportam temperaturas excepcionalmente elevadas em pequenos corpos de água utilizados como *nurseries*.

1.3.1.4 Temperatura

Os constrangimentos térmicos para a manutenção de uma população são basicamente dois: (a) que em pelo menos um período do ano a temperatura atinja níveis que permitam a reprodução da espécie e o crescimento dos alevins e juvenis; (b) que em nenhum período do ano a temperatura ultrapasse os valores máximos e mínimos letais para os indivíduos (Oliveira, 1995).

Os peixes Tilapiine são termofílicos e as suas distribuições geográficas encontram-se limitadas por temperaturas de águas mais frias. Temperaturas entre os 8 e 15°C foram relatadas como valores letais mínimos. A espécie tem uma "zona de tolerância" térmica entre 15 e 37°C, e uma tolerância limitada de temperaturas entre 39 e 40°C, com temperaturas letais máximas em 41 – 42°C (Bhujel, 2000; Henriques, 1998; Webb e Maughan, 2007). Param de crescer a temperaturas inferiores a 16°C. Para *O. niloticus* a temperatura letal mínima encontra-se nos 12°C; *O. aureus* tolera temperaturas relativamente baixas em relação à maioria das espécies de tilápia, com temperatura letal mínima nos 8°C; *O. spilurus* também apresenta uma baixa tolerância a temperaturas frias como a maioria das espécies do género *Oreochromis* (Lucas e Southgate, 2003). No lago Sibaya (África do Sul), Russell *et al.* (2012) relataram que os juvenis e *fry* de *O. mossambicus* preferiram águas entre 19 e 35°C, mas tinham uma tolerância de 16.5 – 39°C. Em contrapartida, notaram que os adultos escolheram águas rasas entre 22 e 30°C e com um intervalo de tolerância entre os 19 – 32°C. Estudos têm demonstrado que *O. mossambicus* e outros Ciclídeos do grupo das tilápias toleraram temperaturas mais baixas em habitats salinos do que em água doce e ocorrem mais frequentemente em estuários do que em meios de água doce (Webb e Maughan, 2007). Oliveira (1995) reporta que *O. mossambicus* tolera melhor baixas temperaturas em água salgada do que em água doce, o que pode ajudar a explicar a extensão para sul da sua área de distribuição em ambientes estuarinos e costeiros. Este autor ainda acrescenta que em água

doce *O. mossambicus* atinge o coma a 11°C, devido a um decréscimo da osmolaridade do plasma e das concentrações iónicas de sódio e cloro; à mesma temperatura mas em água salgada (5‰) não se verifica nenhuma destas reações (Bhujel, 2000; Webb e Maughan, 2007).

1.3.1.5 Oxigénio, Amónia e pH

O. mossambicus consegue suportar baixas concentrações de oxigénio dissolvido de 0.1ppm por curtos períodos. A explicação para estes limites de tolerância encontra-se numa combinação de mecanismos fisiológicos: (a) hemoglobinas com uma afinidade muito elevada para o oxigénio, que permitem captar oxigénio dissolvido a níveis muito baixos; (b) respirar na camada superficial da coluna de água, mais oxigenada; (c) suportar condições de anerobiose (Oliveira, 1995). *O. mossambicus* apresenta uma respiração de ar facultativa e, dependendo da temperatura do ar, pode sobreviver à exposição completa do ar durante várias horas (Bhujel, 2000; Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Por outro lado, as tilápias suportam também elevadas concentrações de dióxido de carbono na água, bem como outros gases tóxicos resultantes da decomposição da matéria orgânica (*e.g.* NH₃, H₂S) (Oliveira, 1995). A Tilápia Moçambicana é capaz de suportar concentrações de amónia de 3mgL⁻¹, sem qualquer impacto adverso significativo sobre a alimentação ou o crescimento. O LC₅₀ às 96h para a amónia foi de 32mgL⁻¹ e em concentrações abaixo de 14mgL⁻¹ encontraram 100% de sobrevivência (Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Esta espécie também tolera extremos de acidez e alcalinidade, com valores de pH variando entre 3.7 e 10.3 (Bhujel, 2000; Webb e Maughan, 2007). Oliveira (1995) refere o limite letal de acidez aproximadamente de pH 4.0 e o limite letal de alcalinidade de pH 11.0, sendo o pH de 7 – 8 o recomendado para as culturas comerciais.

1.3.1.6 Reprodução

A Tilápia Moçambicana exhibe um sistema de reprodução poligâmico encontrando-se os machos sincronizados com a desova das fêmeas. Entre os peixes Ciclídeos com este sistema de reprodução, diferenças sexuais de tamanho (dimorfismo), cor (dicromatismo) e outros comportamentos reprodutivos são prevalentes e estão sob controlo hormonal (Oliveira e Almada, 1995; Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Oliveira e Almada (1998a)

propuseram que os andrógenos (hormonas sexuais masculinas), não só desempenham um papel importante na expressão de caracteres sexuais secundários masculinos, mas também como mediadores do *status* social (dominância). Durante a maturação sexual, os machos são muito maiores do que as fêmeas em várias características morfológicas (tamanho do corpo, altura das barbatanas dorsal e anal, largura e comprimento da mandíbula pré-maxilar). Os machos reúnem-se em cardumes à superfície e começam a adotar uma coloração preta nupcial (Oliveira e Almada, 1995; Oliveira e Almada, 1998a; Oliveira e Almada, 1999; Webb e Maughan, 2007). Os cardumes de machos movem-se, em seguida, para zonas costeiras litorais com águas rasas, onde os machos competem entre si para a aquisição e manutenção de arenas reprodutivas. Os machos que conquistam uma posição mais elevada na hierarquia social, têm os níveis de andrógenos e índices gonadossomáticos mais elevados, são mais eficazes na defesa dos seus territórios, constroem e exibem *leks* maiores e têm uma taxa de corte mais elevada (Webb e Maughan, 2007). Nesta altura os machos adotam uma coloração nupcial, em que o corpo se apresenta todo negro, com exceção da região sub-mandibular que é branca e dos bordos das barbatanas caudal, anal e dorsal que são vermelhos (Oliveira, 1995). O sucesso de reprodução é fortemente direcionado para machos dominantes nos grupos estabelecidos, conjuntamente com a capacidade de um macho conseguir manter as arenas dentro da sua área de territorialidade. Essas arenas consistem em arenas de reprodução circulares rasas ou *leks* escavados com o auxílio das bocas em substratos arenosos ou lamacentos (Amorim *et al.*, 2003; Oliveira e Almada, 1998b,d; Russell *et al.*, 2012; Webb e Maughan, 2007). Os territórios são apenas defendidos durante o dia. No período da noite, os machos migram para águas mais profundas, onde existe uma amplitude térmica menor e não são expostos a predadores. O principal predador de *O. mossambicus* neste habitat é *C. gariepinus*, que possui atividade noturna deslocando-se de águas mais profundas para os terraços litorais durante a noite (Oliveira, 1995). Se a fêmea manifestar a cor-padrão indicativa que se encontra pronta para a reprodução e um comportamento correto (natação normal e sem demonstração de ameaças), o macho dominante irá guiar a fêmea para o ninho de desova, onde podem ocorrer atos nupciais ou, instantaneamente, a desova. A fêmea entra no ninho, no fundo do qual deposita os ovos, apanhando-os de seguida com a boca e armazena-os numa bolsa mandibular. Durante a sequência de corte e quer antes, quer depois, da oviposição e coleta dos ovos, a fêmea aproxima a boca da região genital do macho, chegando a mordiscar a sua papila genital. Nesta fase o macho ejacula o esperma, o qual deverá ser recolhido pela fêmea para a sua cavidade bucal, sendo a fertilização dos ovos

intrabucal e facilitada por movimentos de mastigação da fêmea. Após a postura as fêmeas retiram-se das arenas reprodutoras, incubando os ovos e as *fry* em águas mais profundas e afastadas da costa, formando-se cardumes de fêmeas incubadoras. Durante o período de incubação bucal, as fêmeas não se alimentam ou reduzem substancialmente a atividade alimentar (Amorim *et al.*, 2003; Oliveira, 1995; Oliveira e Almada, 1998a,d; Oliveira e Almada, 1999; Webb e Maughan, 2007). No meio selvagem, os embriões e as *fry* são encubadas na boca da fêmea por um período de 20-22 dias, após o qual as *fry* podem encontrar refúgio na cavidade bucal materna durante a noite ou em situações de perigo. Existe assim, neste género, uma ligação fêmea-*fry* para além do período de incubação bucal, tendo-se desenvolvido comportamentos de chamamento das *fry* (Amorim *et al.*, 2003; Oliveira, 1995; Oliveira e Almada, 1998d). As *fry* são libertadas para o exterior da cavidade bucal em habitats costeiros com vegetação densa e com pouquíssima profundidade – *nurseries* –, tendo por vezes, as fêmeas que nadar de lado para terem acesso a estes corpos de água (Oliveira, 1995). Neste estágio, as *fry* já adquiriram natação livre e as suas bexigas-natatórias já se encontram bem desenvolvidas (Webb e Maughan, 2007).

1.4 Nutrição

A alimentação é o custo operacional principal da aquacultura. Ingredientes alternativos que reduzam os custos de alimentação, mas que proporcionem níveis adequados de crescimento e de produção, podem ter um forte impacto sobre a rentabilidade da indústria (Middleton *et al.*, 2001). O contínuo aumento e melhoramento da eficiência da produção aquícola obriga ao seu acompanhamento por parte do setor da nutrição através da formulação e da tecnologia de fabrico dos alimentos. Este desenvolvimento pressupõe, de um lado, o conhecimento correto das necessidades nutricionais dos peixes e, por outro, a disponibilidade de ingredientes e o conhecimento do seu valor nutricional. A formulação de dietas corretamente balanceadas em conjunto com um maneiio alimentar correto constitui um ponto-chave no sucesso do desenvolvimento da aquacultura (Henriques, 1998). As tilápias tornaram-se uma das principais fontes de proteína em todo o mundo, principalmente, devido à sua distinta capacidade de adaptação sob uma vasta gama de condições ambientais e ao excelente crescimento com base no fornecimento de uma boa dieta, podendo ser natural ou comercial (Davis *et al.*, 2010). A produção de tilápias é uma empresa em plena expansão em

muitas partes do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde os produtos nacionais podem competir com sucesso com os produtos importados como sardinha, atum e cavala. A tilapia ganhou uma enorme popularidade como uma ótima candidata para a aquicultura por causa dos seus atributos como já amplamente referenciados (Fasakin *et al.*, 2005). Além disso, como é um peixe omnívoro pode-se usar uma elevada proporção de fontes vegetais de baixo custo na sua alimentação (Daudpota *et al.*, 2014). Estes autores relataram que a aquicultura de Tilápia-do-Nilo exige a formulação de dietas com uma ótima eficiência que atenda às necessidades proteicas para o período de crescimento. A proteína é considerada como o principal constituinte do corpo do peixe, pelo que é essencial um fornecimento alimentar suficiente para se obter um crescimento ótimo. Os peixes convertem de forma mais eficiente o alimento exógeno em proteína corporal do que os restantes animais cultivados na produção animal. A deposição de proteína corporal nos peixes é efetuada com um menor dispêndio de energia. A percentagem de parte magra edível da carcaça dos peixes é superior à dos bovinos, porcos e aves. O perfil dos ácidos aminados, tal como o das carnes vermelhas, é reflexo de uma proteína de elevado valor biológico (Henriques, 1998). Uma vez que a proteína é o componente mais caro da dieta, por conseguinte, a quantidade de proteína na dieta deve ser apenas o suficiente para o crescimento dos peixes. E com a tendência de se aumentar a produtividade de tilápias via programas genéticos em conjunto com tilápias de aquicultura, passando de um cultivo extensivo para práticas semi-intensivas, haverá, inevitavelmente, uma maior dependência em produzirem-se dietas específicas para estas novas espécies e de baixo custo. Por exemplo, em 1995, 70% da produção mundial de tilápias foi baseada no fornecimento de rações comerciais, que aumentou para 85% em 2010 e prevê-se que, até 2020, aumente até aos 95% (Ng e Romano, 2013). O excesso de proteína numa dieta pode tornar-se num desperdício e produzir dietas desnecessariamente caras. A alimentação de peixes representa mais de 50% dos custos operacionais em aquicultura intensiva. Assim, a redução de custos na alimentação é importantíssima para um bom crescimento lucrativo da aquicultura (Daudpota *et al.*, 2014; El-Sayed, 1999; Ng e Romano, 2013).

Na aquicultura, um bom manejo alimentar é demonstrado por uma íntima relação entre a quantidade de alimento distribuída e a quantidade ingerida. No entanto, não é fácil de atingir este objetivo. Em muitos casos, a quantidade de ração distribuída excede os requisitos, que conduz a excesso de despesas pelo produtor e poluição da água. Em outras

situações, a quantidade distribuída é menor do que a que é exigida, resultando na limitação do crescimento dos peixes e, muitas vezes, aumentando a heterogeneidade no tamanho dos peixes. A quantidade de alimentos propensos a serem ingeridos é influenciada por inúmeros estímulos que podem iniciar, prolongar ou interromper a ingestão dos alimentos. Estes estímulos podem resultar em mudanças significativas no comportamento alimentar a curto, médio ou longo prazo (Guillaume *et al.*, 1999).

1.5 Anestésias

Os peixes são facilmente stressados pelo manuseio e transporte e o *stress* pode resultar em imuno-supressão, lesões físicas ou, até mesmo, em mortalidade. Na aquacultura, os anestésicos são usados durante o transporte para evitar danos físicos e reduzir o metabolismo (consumo de DO e excreção). Também são utilizados na imobilização dos peixes durante os procedimentos de tratamentos, colheita, amostragem, procedimentos de reprodução, classificação, marcação e cirurgia (Chambel *et al.*, 2013; Coyle *et al.*, 2004; Kolanczyk *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008). A anestesia é um estado biológico com perda parcial ou completa da sensibilidade ou perda do controlo neuromotor voluntário induzida por meios químicos ou não-químicos. Os anestésicos reduzem o *stress* ao causarem uma depressão na função nervosa (Gholipour kanani *et al.*, 2013). Considera-se como anestésico ideal o que induz o estado de anestesia rapidamente, com o mínimo de hiperatividade ou *stress*. Deve ser fácil de administrar, assim, como manter o animal no estado escolhido. Quando o peixe é removido do anestésico, a recuperação deverá ser igualmente rápida (Chambel *et al.*, 2013; Coyle *et al.*, 2004). No entanto, os tipos de anestésico, dosagem e o tempo de indução podem afetar a fisiologia do peixe. Existem vários tipos de anestésicos: tricaina metanosulfonato (designado por MS-222), óleo de cravo e 2-fenoxietanol são os anestésicos mais utilizados na aquacultura (Mitjana *et al.*, 2014) e o MS-222 é o único anestésico aprovado, atualmente, pela *Food and Drug Administration* (FDA) a ser usado em peixes destinados a comercialização para alimentação humana (Gholipour kanani *et al.*, 2013; Kolanczyk *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2010).

Tricaina mesilato (MS-222), um sal de metanossulfonato de éster etílico do ácido 3-aminobenzóico (Chambel *et al.*, 2013; Kolanczyk *et al.*, 2003), é absorvida através das brânquias (e da pele, em algumas espécies), biotransformada no fígado (e provavelmente

nos rins) e eliminada, essencialmente, pelas brânquias, com os metabolitos adicionais a serem eliminados através da urina e da bÍlis (Neiffer e Stamper, 2009). O MS-222 é normalmente adquirido na forma de ácido e, quando dissolvido em água, pode originar um pH baixo, até 2.8, estando, normalmente, dependente da dureza da água e da concentração do anestésico. O uso de bicarbonato neutraliza o MS-222 num pH > 7, resultando numa ação mais rápida (tempo de indução mais curto), mais segura e a anestesia torna-se mais consistente (Kolanczyk *et al.*, 2003). Investigações recentes com Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) demonstraram a ausência de atividade genotóxica induzida pelo MS-222, tanto sob condições *in vivo* como *in vitro* (Vera *et al.*, 2010). Em dourada (*Sparus aurata*), MS-222 não enfraquece as respostas imunes humoral ou celular (Ortuño *et al.*, 2002).

O óleo de cravo é um líquido de cor castanho-escuro, proveniente do destilado de flores, caules e folhas das árvores de cravo *Eugenia aromatic* e *Eugenia caryophyllata* e é conhecido desde a antiguidade por ter um efeito anestésico suave sobre os humanos (Gholipour kanani *et al.*, 2013; Grush *et al.*, 2004; Mitjana *et al.*, 2014). Este anestésico é uma mistura de compostos fenólicos: eugenol (corresponde 85 – 95% dos ingredientes ativos), isoeugenol, e metileugenol. O óleo de cravo comercialmente disponível tem aproximadamente 84% de eugenol, mas é possível comprar-se com 100% de eugenol (Neiffer e Stamper, 2009). Nos últimos anos, o óleo de cravo tem sido amplamente utilizado na indústria da aquacultura, por ser seguro, barato e não-tóxico para o ambiente e não requer um período de espera em comparação com outros produtos químicos anestésicos. O óleo de cravo tem sido estudado como um ótimo anestésico em diversas espécies incluindo Peixe-Arroz Japonês (*Oryzias latipes*), Peixe-Dourado (*Carassius auratus*), carpa (*Cyprinus carpio*), *rabbitfish* (*Siganus lineatus*), Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Grush *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008).

O 2-fenoxietanol é um líquido oleoso claro ou cor de palha moderadamente solúvel em água (Neiffer e Stamper, 2009), e o seu ingrediente ativo é o éter monofenílico de etileno de glicol (Mitjana *et al.*, 2014; Weber *et al.*, 2009). Tem sido sugerido como um bom anestésico embora não esteja aprovado para ser utilizado em peixes produzidos para consumo humano. Sem um limite máximo de resíduos (LMR) ainda fixado, o uso deste agente anestésico promissor continua a ser ilegal de acordo com o Regulamento CEE 2377/90 (Klimánková *et al.*, 2008; Tsantilas *et al.*, 2006).

Sendo a Tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) uma espécie com um grande desenvolvimento, um forte potencial na aquacultura e com um elevado valor proteico, o presente estudo teve como objetivos: (1) avaliar a reprodução desta espécie, divididos em 3 Grupos diferenciados através da proporção sexual (macho:fêmea) em um sistema de aquaponia, (2) utilização de três dietas distintas administradas a alevins de *Oreochromis mossambicus*, provenientes dos Grupos de reprodutores, e determinação da dieta que manifeste um efeito mais promotor no crescimento e engorda dos peixes e, (3) uso de três anestésicos, MS-222, óleo de cravo e 2-fenoxietanol, em diferentes concentrações, avaliando-se os seus efeitos de anestesia e recuperação e possíveis efeitos secundários sobre os indivíduos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

Este trabalho experimental de produção de Tilápias Moçambicanas (*Oreochromis mossambicus*) decorreu no Laboratório de Aquacultura pertencente às instalações da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM), do Instituto Politécnico de Leiria (IPL), em Peniche, Portugal.

2.2 Transporte e aclimatização

Treze indivíduos adultos da espécie *Oreochromis mossambicus* (9 fêmeas e 4 machos) foram adquiridos do Laboratório da Caviar Portugal pertencente à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve (UAAlg), localizado em Faro (Algarve, Portugal).

Os exemplares foram transportados dentro de sacos de plástico previamente encheidos com água doce e colocados dentro de caixas de plástico, de forma a diminuir o *stress* que poderia advir da deslocação do carro. Estes foram transportados de carro de Faro até Peniche, tendo-se feito algumas paragens durante o percurso para se abrirem os sacos de modo a aumentar o nível de oxigénio na água e, também, verificar se os indivíduos se encontravam o mínimo stressados possível.

Assim chegados ao Laboratório de Aquacultura da ESTM, foram distribuídos por três tanques retangulares de PVC de 250L com água doce, formando-se três proporções sexuais diferentes (macho:fêmea), do seguinte modo: 1:3 (Grupo 1); 1:4 (Grupo 2); 2:2 (Grupo 3). Ambos os tanques possuíam no seu interior areia como meio de substrato e tubos de PVC, fornecendo condições ambientais semelhantes às do seu habitat. A temperatura da água encontrava-se nos $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Estes tanques encontravam-se num sistema fechado com recirculação de água. O sistema era constituído por 4 tanques rectangulares de PVC de 250L, três para as tilápias e o quarto para a constituição de uma *sump*. A *sump* possuía métodos de filtração de água, sendo um físico subdividido em duas divisões, a primeira constituída por lã de vidro e a segunda por gravilha; e um biológico, usando-se biobolas. A água era novamente bombeada para os tanques de cultivo através do auxílio de uma bomba (*Iwaki Magnet Pump (90/100L/min), modelo: MX-70VM-13*). Em cada tanque existia 1 termostato (*EHEIM JÄGER, 100W*) e na *sump* havia 2 com o objetivo de aumentar a temperatura da água. O fornecimento de oxigénio manteve-se constante durante todo o ensaio, sendo distribuído por uma pedra difusora em cada tanque e também no tanque destinado à *sump*. Exteriormente, os tanques foram revestidos com sacos de plástico preto, diminuindo, assim, a claridade no interior dos mesmos e foi mantido um regime de fotoperíodo (12/12h).

Nos dias seguintes, um período de 2 semanas, foram alimentados até à saciedade com ração comercial para tilápias (*Sparos, Nutrition in Aquaculture*), *pellets* de 3mm, 3 vezes ao dia. Diariamente monitorizou-se a temperatura tendo-se mantido nos $27 \pm 1^\circ\text{C}$, assim, como, os níveis de amónia e nitritos uma vez por semana através de *kits* de testes rápidos (*API*,

Aquarium Pharmaceuticals). Quando necessário procedeu-se à troca parcial da água dos tanques.

2.3 Ensaio de reprodução

Após o período de aclimatização, os indivíduos permaneceram nos mesmos tanques. Mantiveram-se os mesmos procedimentos de monitorização da temperatura, qualidade da água e o regime de fotoperíodo. Todos os indivíduos foram pesados com o auxílio de uma balança (*aeADAM®*, modelo: *PGL3002*, cap. máx. 3600g) e medidos, com valores médios \pm D.P. por Grupo: 348.10 \pm 53.83g e 25.25 \pm 1.96cm (Grupo 1); 162.30 \pm 19.01g e 20.50 \pm 1.05cm (Grupo2); 127 \pm 14.44g e 15.73 \pm 1.21cm (Grupo 3). A alimentação manteve-se 2 vezes por dia, sendo dada no período da manhã e da tarde. O ensaio teve uma durabilidade de 6 meses.

A reprodução natural de tilápias em cativeiro é bastante comum e requiere as seguintes condições (Oliveira, 1995):

- (a) Temperatura – a atividade reprodutora inicia-se aos 22°C e o ótimo varia entre 25-29°C;
- (b) Alimentação – deve ser rica em proteínas e vitaminas uma vez que a água dos tanques é pobre em plâncton, algas, etc.;
- (c) Iluminação – o fotoperíodo deve ser de 12 a 14 horas de luz diária;
- (d) Água – deve ser mantida uma boa visibilidade, retirando-se as excreções e os restos de comida regularmente;
- (e) Tanques – devem de ser compridos de forma a permitir aos machos estabelecerem os seus territórios reprodutores, e a evitar as interferências de outros peixes durante as posturas aos pares.

No presente ensaio, observou-se a sequência de eventos que ocorrem no início de cada episódio de criação, nomeadamente o estabelecimento de hierarquias de dominação entre os machos e o subsequente comportamento de exibição dos machos para com as fêmeas. No início de um período de reprodução, os machos estabelecem territórios em *leks* (arenas) para que as fêmeas se sintam atraídas quando estiverem prontas para desovar. Ao contrário de

lekking periódicos, os machos desta espécie praticam *lekking* contínuo, não deixando o seu território durante todo o período de reprodução (Oliveira & Almada, 1998b). Após a reprodução, as fêmeas recolhem imediatamente os óvulos e os espermatozóides nas suas bocas e deixam o ninho para incubar os embriões por um período de 20-22 dias até ao estágio *fry* (Russel *et al.*, 2012). Ao 3º mês de trabalho, decidiu-se isolar as fêmeas que se encontravam a incubar para caixas de plástico de 72L sem recirculação de água, a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ mantida por auxílio de um termostato e aeração contínua por pedra difusora. Diariamente procedia-se à limpeza das caixas e troca de 50% do volume da água previamente aquecida. Após o fim do ciclo de incubação, as fêmeas eram devolvidas ao seu respetivo Grupo.

Aquando da libertação das *fry*, estas foram recolhidas com um camaroeiro, contabilizadas e transferidas para maternidades compostas por caixas de plástico de 72L, sobrepostas sobre os tanques dos reprodutores e, assim, estando incluídas no mesmo sistema de produção, a uma temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$. As *fry* foram alimentadas até à saciedade com a mesma ração comercial fornecida aos progenitores, desfeita em pó com o auxílio de um almofariz, 6 a 8 vezes por dia (Lucas e Southgate, 2003). Diariamente foi monitorizada a temperatura, recolhidos e registados os mortos e limpeza das maternidades.

2.4 Dietas experimentais

Três dietas distintas foram usadas para crescimento e engorda de alevins de *Oreochromis mossambicus*: uma ração comercial para tilápia (RT) (*Sparos, Nutrition in Aquaculture, diâmetro: 3mm*); uma ração comercial para douradas (RD) (*Aquasoja, produto STD5, diâmetro: 4.5-5.5mm*); e uma mistura das duas rações anteriormente referidas, numa proporção de 50:50% (Mix). As dietas foram moídas numa picadora (*FLAMA, modelo:1705FL, 700W*) e reduzidas a pequenas partículas, de acordo com o tamanho dos peixes a serem alimentados. O tamanho das partículas foi ajustado consoante o crescimento dos indivíduos.

Todos os indivíduos de *O. mossambicus* utilizados foram obtidos dos *stocks* de alevins nascidos no experimento anterior. Foram recolhidos 180 indivíduos e foram pesados e medidos, sendo a Média_{peso inicial} ± D.P. e Média_{comprimento inicial} ± D.P., $0.46 \pm 0.26\text{g}$ e $2.80 \pm 0.44\text{cm}$, respetivamente (Gunasekera *et al.*, 1995). Os alevins foram distribuídos por 9 tanques retangulares de PVC de 60L, existindo para cada ensaio 3 réplicas, conectados a um sistema com recirculação de água fechado, sendo a filtração da água assegurada por uma *sump* com filtração física (lã de vidro e gravilha) e biológica (biobolas) e equipadas com aeração contínua e um regime de fotoperíodo (12/12h). A temperatura foi mantida nos $28 \pm 1^\circ\text{C}$, recorrendo-se a um total de 11 termostatos (*EHEIM JÄGER, 100W*), 1 termostato/tanque e 2 na *sump* (Hasan *et al.*, 1997). Para cada dieta, colocou-se uma densidade de 20 indivíduos por tanque (20 alevins por tanque X 3 tanques). Os alevins foram aclimatizados por 2 semanas antes de se iniciar o ensaio. Durante o período de aclimatização, os peixes foram alimentados três vezes por dia, com as dietas a estudar. Durante estas duas semanas tentou-se encontrar um peso inicial de ração. Foram dadas várias quantias de ração por dia até se ter chegado à quantia em que os peixes ficavam saciados sem o desperdício de alimento. Quantia que se estabeleceu em 0.4050g de ração 3x dia^{-1} . O período experimental teve uma durabilidade de 11 semanas, em que os alevins foram alimentados 3x dia^{-1} , sete dias da semana, fazendo-se jejum ao domingo (Hoseinifar *et al.*, 2014). A ração era pesada diariamente numa balança de precisão com 4 casas decimais (*Adventurer™ OHAUS, modelo: AR2140, cap. máx. 210g*). A taxa de alimentação foi retificada a cada duas semanas seguido de um período de jejum de 24h e, posteriormente, anestesiou-se individualmente os indivíduos para pesagem (balança *aeADAM®*, modelo: *PGL3002, cap. máx. 3600g*) e medição, calculando-se o peso e comprimento médios para cada tanque (Hoseinifar *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 1997). Diariamente era registado a temperatura e mortos e sifonado o fundo dos tanques, removendo os dejetos dos peixes e possíveis restos de ração. Uma vez por semana eram verificados os níveis de amónia e nitritos através de *kits* de testes rápidos (*API, Aquarium Pharmaceuticals*) e, de duas em duas semanas, procedeu-se a uma troca parcial da água do sistema.

2.5 Anestésias

Para se pesar e medir os alevins do ensaio das dietas, procedeu-se a métodos anestésicos prevenindo-se a diminuição do *stress* dos indivíduos assim, como, testar a eficácia de diferentes anestésicos em *Oreochromis mossambicus*. Foram selecionados três anestésicos, nomeadamente, o MS-222 (SIGMA, Ref. E10521), o óleo de cravo (SIGMA, Ref. C8392) e o 2-fenoxietanol (Fluka, Ref. 77699) e para cada um deles foram determinadas diferentes concentrações: MS-222 (0.15, 0.25 e 0.35ml L⁻¹), óleo de cravo (0.10, 0.15 e 1.2 ml L⁻¹) e 2-fenoxietanol (0.40, 0.60, 0.80 e 1.00 ml L⁻¹) (Mitjana *et al.*, 2014).

Para *se* determinar a eficácia de cada anestésico foram determinados os tempos de indução, de recuperação e mortalidade. O tempo de indução é normalmente contabilizado a partir do instante em que o peixe entra em contacto com o anestésico até exibir perda total de equilíbrio e tónus muscular, rápida ventilação opercular e reduzida reação a estímulos externos, condição equivalente, condição equivalente ao estágio III de anestesia representado na Tabela I (Chambel *et al.*, 2013; Coyle *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2009).

Tabela I - Estágios de anestesia nos peixes (Weber *et al.*, 2009).

Estágio de anestesia	Descrição
I	Perda parcial de equilíbrio
	O peixe retém alguns movimentos do corpo
II	Perda total de equilíbrio e tónus muscular
	Baixa frequência de movimentos operculares e respostas reflexas fortemente atenuadas
III	Movimentos operculares impercetíveis

	Perda total dos reflexos vertebrais
Estágio de recuperação	Descrição
I	Falta de equilíbrio
	O peixe não mostra quaisquer movimentos corporais
	O peixe começa a recuperar os movimentos operculares
II	Recuperação do equilíbrio e algum movimento corporal
	Recuperação da frequência de movimentos operculares
III	Similar à pré-anestesia
	Frequência opercular ligeiramente superior à pré-anestesia

Para cada concentração de cada anestésico utilizou-se uma amostra de 40 peixes. Cada anestésico foi utilizado em pesagens diferentes durante o decorrer do ensaio das dietas, mas as diferentes concentrações usadas dentro do anestésico em estudo foram todas feitas no mesmo dia. Cada peixe foi anestesiado apenas uma vez e foi monitorizado, individualmente, os tempos de indução e recuperação. Num recipiente de plástico, com 4L de água do sistema de produção das dietas, de forma a manter a mesma temperatura ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), colocou-se a concentração desejada do anestésico que se estava a analisar e registou-se o tempo de indução (Chambel *et al.*, 2013). Sempre que se mudava de concentração de anestésico, esta água era renovada por outra nova, sempre proveniente do sistema das dietas. Para o tempo de recuperação, existia um outro recipiente de plástico com 4L de água do sistema das dietas, registando-se o tempo de recuperação até atingirem o estágio III da Tabela I. Em ambos os recipientes de plástico foi fornecido oxigénio forte através de pedras difusoras assim, como, os tempos foram registados através de cronómetros. Após a recuperação dos indivíduos, estes foram devolvidos aos seus respetivos tanques do sistema de produção das dietas.

2.6 Deteção do desempenho de crescimento

No final do ensaio de alimentação de 11 semanas, os peixes de cada dieta e de cada réplica foram pesados (balança *aeADAM®*, modelo: PGL3002, cap. máx. 3600g) e medidos

individualmente. O desempenho do crescimento foi calculado do seguinte modo (Acar *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2015):

Peso Ganho

$$WG (\%) = \frac{[Peso\ final\ (g) - Peso\ inicial\ (g)]}{Peso\ inicial\ (g)} \times 100$$

Taxa de Crescimento Específico

$$SGR (\% \text{ dia}^{-1}) = \frac{[LN(\text{peso final (g)}) - LN(\text{peso inicial (g)})]}{N^{\circ} \text{ dias da experiência}} \times 100$$

Conversão Alimentar

$$FCR (g/g) = \frac{\text{Consumo de ração seca (g)}}{\text{Peso ganho (g)}}$$

Taxa de Sobrevivência

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de peixes sobreviventes}}{N^{\circ} \text{ inicial de peixes}} \times 100$$

2.7 Análises químicas

Após as medidas morfométricas, 20 indivíduos de cada uma das réplicas das três dietas, selecionados aleatoriamente, foram sacrificados por imersão em água gelada (Middleton *et al.*, 2001), colocados em sacos de congelação (devidamente identificados) e fechados e congelados a -20°C até se fazerem as análises químicas (Jabeen e Chaudhry, 2011).

Para se efetuarem as análises químicas, nomeadamente proteína, lípidos, humidade e cinzas, as amostras foram previamente descongeladas. Cabeças e vísceras foram removidas e os filetes foram triturados numa picadora (*FLAMA, modelo: 1705FL, 700W*) até à formação de uma massa homogênea, que foi utilizada para a análise (Fernandes *et al.*, 2014). Todas as análises foram feitas em triplicado.

2.7.1 Proteína

De acordo com Acar *et al.* (2015), Fasakin *et al.* (2005), Mohammadi *et al.* (2013), Nguyen *et al.* (2010), entende-se por teor de proteína bruta o resultado que se obtém multiplicando por 6.25 o teor de azoto doseado segundo a técnica de Kjeldahl.

Determinação do teor de proteína

Identificaram-se 3 cadinhos 11 tubos de digestão (3 tubos para cada uma das dietas e 2 tubos para o ensaio em branco). Pesou-se (balança Sartorius, modelo: ISO 9001, cap. máx. 220g) para cada cadinho aproximadamente 6g da amostra de pescado homogeneizada. Colocou-se a amostra no tubo de digestão, lavando-se o cadinho com água arrastando as partículas para dentro do tubo de digestão. Em cada tubo de digestão, colocaram-se 2 pastilhas de catalisador e 25mL de ácido sulfúrico. Prepararam-se mais 2 tubos para o ensaio em branco, colocando-se as 2 pastilhas mais os 25mL de ácido.

Programou-se a temperatura do digestor para 220°C (FOSS, Digestor 2006), e quando se atingiu a temperatura desejada, colocaram-se os tubos no digestor e ligou-se a torneira da água. Passados 30 minutos, programou-se o digestor para os 400°C. Ao fim de 90 minutos desligou-se o digestor, deixando a torneira da água aberta até ao arrefecimento dos tubos, por cerca de 60 minutos. Determinou-se que a digestão estava terminada quando se obteve um líquido límpido.

Ligou-se o destilador (FOSS, Kjeltex™ 2100, 1900W), abriu-se a torneira da água e procedeu-se ao seu aquecimento. Colocou-se a água destilada no tubo, sem colocar qualquer líquido no Erlenmeyer, e iniciou-se o ciclo de destilação durante 6 minutos. A temperatura do destilador não ultrapassou os 30°C. Caso isso se sucedesse, dever-se-ia de ter que se abrir mais a torneira da água. Adicionou-se em cada tubo 80mL de água destilada. De seguida realizou-se o ensaio em branco, contendo somente o ácido e o catalisador. No Erlenmeyer adicionaram-se 30mL de solução recetora (solução de ácido bórico) e iniciou-se o ciclo.

Realizou-se a titulação com a solução no Erlenmeyer. O limitante para o titulante gasto (HCl a 0.1M) foi de 0.2mL. Executou-se o mesmo procedimento para cada um dos tubos com a amostra de pescado. Entre cada destilação o tubo que mergulhou no tubo de ensaio e

o tubo que mergulhou na solução recetora foram lavados com água destilada. Durante a titulação, a solução verde atingiu o ponto de viragem quando mudou para uma coloração rosada.

No fim de destilar todas as amostras foi feito um novo ciclo de lavagem tal como se procedeu inicialmente. Colocou-se a água destilada no tubo, não se colocando nada no Erlenmeyer, e iniciou-se um novo ciclo. Desligou-se o equipamento, limpou-se e esgotou-se a água que poderia haver na bomba.

Tratamento dos resultados

Determinou-se a percentagem de teor de azoto total através da seguinte fórmula:

$$(\% \text{ Teor de azoto total}) = \frac{0.14 \times (V_1 - V_0)}{\text{Massa da amostra (g)}}$$

Sendo:

V_1 o volume em mL de ácido 0.1N gastos com a amostra;

V_0 o volume em mL de ácido 0.1N gastos com o branco.

A proteína bruta total obteve-se multiplicando a percentagem anteriormente calculada por um fator de 6.25.

2.7.2 Lípidos

Esta técnica tem como objetivo determinar o teor de gordura existente numa amostra de peixe, através de uma extração com éter de petróleo, utilizando-se o aparelho de Soxhlet (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010; Acar *et al.*, 2015; Jabeen e Chaudhry, 2011; Mohammadi *et al.*, 2013).

Ataque com ácido clorídrico

Pesou-se até à quarta casa decimal 6g de amostra (balança Sartorius, modelo: ISO 9001, cap. máx. 220g) para um Erlenmeyer de 500mL. Na hotte, adicionou-se 50mL de ácido clorídrico a 16% e tapou-se com um funil. Colocou-se o Erlenmeyer sobre uma placa de aquecimento (J.P. SELECTA, AGIMATIC-E, 640W) e manteve-se em ebulição suave

durante aproximadamente 15 minutos ou até não se verificar material por degradar. Filtrou-se o conteúdo do Erlenmeyer através de um filtro de pregas. Lavou-se o Erlenmeyer com 100mL de água destilada quente. Lavou-se o filtro com água destilada quente até que o filtrado deixa-se de ser ácido. Secou-se o filtro numa estufa a baixas temperaturas (*Binder, modelo: ED240, 230V*).

Extração da gordura

Determinou-se a massa de um balão de fundo redondo de 500mL. Encheu-se o balão com 150mL de éter de petróleo. Colocou-se o filtro de pregas no cartuxo de extração. Montou-se o aparelho de extração (*Kühlerabfluss, modelo: KV5M*) e extraiu-se pelo menos duas vezes.

Vaporação do solvente

Evaporou-se o solvente no rotavapor (*Heidolph Instruments, LABOROTA 4000*). Secou-se o balão em estufa (*Binder, modelo: ED240, 230V*) a 100°C até que a diferença de duas pesagens (balança *Startorius, modelo: CPA225D, cap. máx. 220g*) consecutivas não excedesse 0.0005g.

Tratamento dos resultados

Para se calcular a percentagem de gordura no pescado utilizou-se a seguinte fórmula:

$$(\% \text{ Gordura no pesado}) = \frac{\text{Massa da gordura (g)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 100$$

2.7.3 Humidade

Esta técnica tem como objetivo a determinação do teor de humidade em alimentos (Acar *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2014).

Determinação do teor de humidade

Prepararam-se e identificaram-se 9 vidros de relógio e secaram-se na estufa (*Binder, modelo: ED240, 230V*) cerca de 15 minutos. De seguida deixou-se arrefecer 10 minutos no exsiccador. Pesaram-se (balança *Sartorius, modelo: ISO 9001, cap. máx. 220g*) com precisão ao décimo de miligrama. Passou-se para cada um dos vidros de relógio cerca de 6g do músculo de peixe homogeneizado (3 réplicas de músculo por dieta). Pesaram-se com precisão ao décimo de miligrama.

Colocaram-se na estufa (*Binder, modelo: ED240, 230V*) os vidros de relógio durante 6h a 105°C. Após o tempo decorrido, deixou-se os vidros de relógio arrefecerem no exsiccador por 10 minutos e pesaram-se (balança *Sartorius, modelo: ISO 9001, cap. máx. 220g*) com precisão ao décimo de miligrama (m_3).

Tratamento dos resultados

O teor de humidade dos em base húmida foi determinado pela seguinte fórmula:

$$(\% \text{ Teor de humidade}) = \frac{m_2(\text{mg}) - m_3(\text{mg})}{m_2(\text{mg}) - m_1(\text{mg})} \times 100$$

Sendo:

m_1 a massa do vidro de relógio (mg);

m_2 a massa do vidro de relógio com a amostra de peixe homogeneizada (mg);

m_3 a massa do vidro de relógio com a humidade (mg).

2.7.4 Cinzas

Esta técnica destina-se a fixar o processo de determinação do teor de cinza no peixe, derivados e produtos à base de peixe (*Acar et al., 2015; Fernandes et al., 2014; Jabeen e Chaudhry, 2011*).

Determinação do teor de cinzas

Pesaram-se cerca de 6g da amostra de pescado homogeneizado, com o rigor de $\pm 0.0001\text{g}$, para 9 cadinhos previamente pesados (balança *Sartorius*, modelo: *ISO 9001*, cap. máx. 220g) e identificados (3 réplicas para cada uma das dietas).

Colocaram-se os cadinhos, durante 30 minutos, em banho-maria para secagem e em seguida carbonizaram-se numa placa de aquecimento (*J.P. SELECTA, AGIMATIC-E, 640W*). Transferiram-se os cadinhos para a mufla (*Nabertherm Controller*, modelo: *B170, 30-3000°C*) e completou-se a incineração a uma temperatura de 550°C. Retiraram-se os cadinhos da mufla, deixaram-se arrefecer no exsiccador e pesaram-se (balança *Sartorius*, modelo: *ISO 9001*, cap. máx. 220g).

Tratamento dos resultados

O teor de cinzas foi determinado pela seguinte fórmula:

$$(\% \text{ Teor de cinzas}) = \frac{m_3(\text{g}) - m_1(\text{g})}{m_2(\text{g}) - m_1(\text{g})} \times 100$$

Sendo:

m_1 a massa do cadinho (g);

m_2 a massa do cadinho com a amostra de pescado homogeneizada (g);

m_3 a massa do cadinho com a cinza (g).

2.8 Análise estatística dos dados

Para o tratamento estatístico dos resultados obtidos experimentalmente, todos os dados das dietas e das anestésias foram testados relativamente aos pressupostos de ajustamento dos dados à distribuição normal e à homogeneidade de variâncias. Para comparação de mais de dois grupos em estudo, e sempre que não foram detetadas violações aos referidos pressupostos, utilizou-se o método paramétrico de análise de variância com um fator (ANOVA *one-way*). Sempre que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, realizaram-se os testes de comparações múltiplas de *Tukey* (Acar *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2014). Caso contrário, a análise de dados foi realizada com recurso ao método não paramétrico de *Kruskal-Wallis* (Cabral *et al.*, 2013). Todas as diferenças foram consideradas

estatisticamente significativas ao nível de 0,05 (ou seja, sempre que foi observado $P < 0,05$) (Acar *et al.*, 2015). Os valores são expressos em média \pm Desvio Padrão (PD) para cada variável medida. Todos os cálculos foram realizados através do *software* estatístico IBM® *SPSS® Statistics 20*.

3. RESULTADOS

3.1 Reprodução

O período de aclimatização decorreu dentro da normalidade e não se observaram comportamentos que pudessem colocar em dúvida o estado de saúde dos indivíduos. Durante estas duas semanas todos os indivíduos se alimentaram bem e temperatura manteve-se sempre constante nos $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Após a iniciação do período experimental, começou-se a verificar que os machos começavam a manifestar as suas características fisiológicas dominantes (dicromatismo):

mudança da cor do corpo de verde-azeitona escuro para preto, zonas brancas na parte inferior da cabeça (opérculo, face e garganta) e tons avermelhados nas barbatanas dorsal e caudal. É de se salientar que os machos possuíam um tamanho corporal maior que o das fêmeas. No Grupo 3 como existia uma proporção sexual de 2:2 (Tabela III), apenas um dos machos exibiu estas características mostrando e impondo a sua posição dominante em relação ao outro macho. Em todos os Grupos foram construídos ninhos no substrato arenoso. O primeiro ninho a ser registado foi no Grupo 1, ao 3º dia da semana pertencente ao período de aclimatização. Seguindo-se o Grupo 2 com a formação de um *lek* no 1º dia em que se iniciou o período experimental da reprodução. Ao 8º dia surgiu o primeiro ninho no Grupo 3. No Grupo 1, o macho manteve sempre o seu ninho junto às paredes do tanque numa zona que se encontrava mais protegida. Ao contrário do que seria de se esperar, este ninho não era circular mas, sim, apenas um afastamento da areia para trás deixando o fundo do tanque em descoberto em toda a largura do mesmo. Contrariamente ao macho do Grupo 1, o macho do Grupo 2 tinha, por norma, dois ninhos construídos em lados opostos do tanque. Por sua vez, no Grupo 3 existiram 2 ninhos, um para cada macho, em lados opostos dos tanques. No Grupo 3, foi observado e registado em vídeo o macho dominante a construir o seu *lek*. Com o auxílio da boca, removia a areia do centro para a periferia do buraco, resultando numa depressão circular, mantendo-se sempre atento ao outro macho para que o mesmo não se apoderasse do ninho, fazendo investidas sobre o intruso e alterando a sua cor corporal para preto. Em todos os Grupos, viu-se, que durante este período pré-reprodutivo, os machos tinham investidas natatórias rápidas e fortes sobre as fêmeas e, no caso do Grupo 3, também sobre o outro macho. Nesta fase os machos abdicavam de comer e mantinham-se sobre os seus *leks*. No caso das fêmeas, estas quando se encontravam prontas para a reprodução expressavam alteração da coloração corporal, de cinza prateado para tons mais cinza escuro com algumas manchas negras na zona dorsal do corpo. Quando um casal de tilápias se encontrava pronto para a o ato reprodutivo, os machos iniciavam um comportamento nupcial dentro dos seus ninhos, tendo sido observado e registado através de filme no Grupo 1. Observou-se que o macho movia o seu corpo em movimentos ondulatórios, em S, dando com a sua barbatana caudal na cabeça da fêmea e dando algumas mordidas na barbatana caudal da fêmea. A fêmea manteve-se sempre atenta às restantes fêmeas e afastando-as com agressividade. De seguida, o macho parou com os movimentos ondulatórios e iniciou uns movimentos mais lentos e sincronizados, como que num género de espasmos corporais. A fêmea quase que imóvel libertava os ovos no ninho e, logo de seguida, recolhia-os com a

boca. Durante a libertação dos ovos, o macho encostava a boca à zona genital da fêmea estimulando a postura dos ovos. Em seguida, via-se a fêmea a encostar a boca à parte genital do macho de modo a recolher o esperma. Durante o procedimento reprodutivo, o casal adquire movimentos mais lentos e sincronizados e mantém-se uma natação circulatoria em torno um do outro. O registo da primeira fêmea a ter ovos na boca foi no Grupo 2 ao 10º dia; no Grupo 1 foi observada uma fêmea em ciclo de incubação ao 16º dia; e no Grupo 3 só foi observado ao 79º dia.

Ao 3º mês de desenvolvimento do presente trabalho, optou-se por se isolar as fêmeas que estavam em fase de incubação de ovos, de forma, a que as mesmas, pudessem passar este período num ambiente menos stressante, evitando que as fêmeas perdessem as suas posturas e, posteriormente, obter-se um maior número de *fry*, pois costumavam perder-se algumas através de canibalismo por parte dos restantes elementos dos Grupos ou serem arrastadas pela corrente da circulação da água para a *sump*. Também se observou que as fêmeas não-incubadas manifestavam agressividade para com as que se encontravam a incubar.

Tabela II - Quantidade de fêmeas em fase de incubação e de posturas que ocorreram durante o período de estudo da reprodução de *Oreochromis mossambicus*.

	Tempo (meses)					
	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Temp. (°C)	25	25-26	26	26	26-27	25-26
Nº fêmeas em incubação	3	6	7	2	5	0
Nº posturas	2	3	1	2	2	0

De acordo com a Tabela II verifica-se que a partir do mês de Julho o número de fêmeas em fase de incubação aumentou até Agosto, sendo este mês onde se registaram mais fêmeas

em ciclo de incubação. Durante o mês de Outubro este número decresceu apenas para duas fêmeas. Relativamente ao número de posturas que ocorreram por mês, o máximo obtido foram de 3 posturas no decorrer do mês de Agosto. No mês de Dezembro não se registaram quaisquer valores. Ao longo destes 6 meses, a temperatura nunca variou muito, tendo-se mantido nos $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Como os níveis de amónia e nitritos nunca ultrapassaram os $0,25 \text{ mgL}^{-1}$.

Tabela III – Número de fêmeas com ovos e comparação das posturas com sucesso e insucesso na eclosão dos ovos. Número total de *fry* que nasceram durante o ciclo de incubação. Os valores do peso e comprimento dos indivíduos encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão

	Grupo		
	1	2	3
n	4	5	4
Peso (g)	$384,10 \pm 53,82$	$162,30 \pm 19,01$	$127,00 \pm 14,44$
Comprimento (cm)	$25,25 \pm 1,96$	$20,50 \pm 1,05$	$15,73 \pm 1,21$
Proporção sexual (mm:ff)	1:3	1:4	2:2

Nº fêmeas com ovos	9	13	1
Nº de posturas			
Sem sucesso	6	6	1
Com sucesso	3	7	0
Nº <i>fry</i> por postura	117; 65; 233	44; 113; 25; 42; 142, 16; 52	0
Nº total de <i>fry</i>	415	434	0

Como se pode ver através da Tabela III foi no Grupo 2 que se observou mais fêmeas fecundadas, sendo um total de 13 fêmeas. Também foi no neste Grupo que se obteve mais posturas com sucesso na eclosão dos ovos (7 posturas). No entanto, não existiram posturas no Grupo 3 e a única fêmea que ficou fecundada não conseguiu que os seus ovos eclodissem com sucesso. Entre os Grupos 1 e 2, relativamente às posturas que não obtiveram sucesso, foram de igual número para ambos os Grupos. Verificava-se que não existia sucesso nas posturas quando as fêmeas, que se encontravam em ciclo de incubação, começavam novamente a alimentarem-se, concluindo-se que tinham perdido os ovos que incubavam nas suas bocas. Mais uma vez é no Grupo 2 que se obteve um maior número de posturas durante o período experimental. Mas por sua vez a quantidade de *fry* que nasceram por postura foram em menor número; a mais pequena foi de apenas 16 *fry* e a maior de 142 *fry*. No Grupo 1 apenas se registaram 3 posturas com sucesso, em que na menor nasceram 65 *fry* e a maior, também a maior de todo o procedimento reprodutivo, com 233 *fry*. Comparando o número total de *fry* nascidas durante o período de desenvolvimento do presente trabalho no Grupo 1 registou-se 415 *fry*, no Grupo 2 um total de 434 *fry* e, por fim, no Grupo 3 não houve qualquer obtenção de *fry* destas fêmeas.



Figura 1 – Ovos de uma fêmea *Oreochromis mossambicus*.

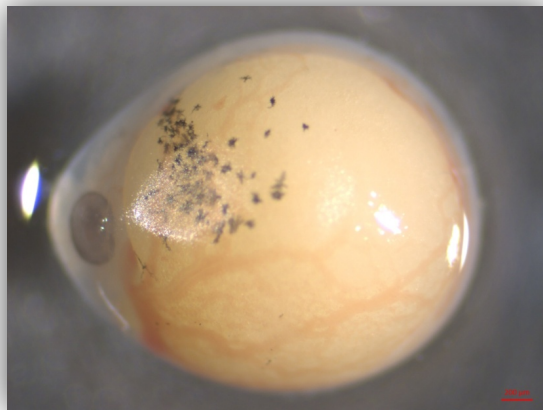


Figura 2 - Embrião de *Oreochromis mossambicus*.



Figura 3 - Larva de *Oreochromis mossambicus*.

As fotografias representadas nas Figuras 1, 2 e 3 pertencem à primeira fêmea que se obteve com ovos, encontrando-se uns em estado de ovo e outros já em estágio de embrião. Estes foram obtidos pela expelição por parte da fêmea e recolhidos para uma caixa de Petri. No curto espaço de tempo de recolha até à tiragem das fotografias, os embriões passaram deste estágio para o estágio seguinte, larvas. São larvas com um tamanho considerável e bem visíveis a olho nu, podendo-se observar, tanto nos embriões como nas larvas, os batimentos cardíacos e a irrigação dos vasos sanguíneos.

O período de incubação bucal teve sempre uma duração de 16 a 20 dias. Após o período de incubação, as progenitoras libertavam as suas *fry* e estas eram contabilizadas individualmente (Tabela III). Por algumas vezes, foi possível observar as fêmeas a recolherem novamente as crias na boca, principalmente quando alguém se aproximava. A taxa de sobrevivência das *fry* foi bastante elevada com uma média de $96,60 \pm 25,36\%$. Assim que eram libertadas para o meio exterior pelas progenitoras, as *fry* eram alimentadas com ração para tilápias moída em pó e foi sempre registada uma ótima aceitabilidade do alimento. Houve sempre um elevado apetite e voracidade pela ração, independentemente das vezes que a mesma era fornecida por dia. Ao longo das semanas as *fry* adquiriam um tamanho e peso corporal notório, atingindo o estágio de alevins muito rapidamente.



Figura 4 - Fry de Tilápia Moçambicana após a sua libertação pela progenitora (dia 0).

3.2 Nutrição

A transferência dos indivíduos do sistema de reprodução para o sistema de nutrição e a distribuição para estes novos tanques decorreu dentro da normalidade e não se registou mortalidade nas seguintes 24h. Todos os indivíduos se adaptaram ao novo sistema sem grande *stress* durante o período de aclimatização. Também foi durante este período que se encontrou a quantidade inicial de ração (0,4050g) com que se iniciaria o ensaio das dietas. A aceitabilidade das três rações por parte dos alevins foi positiva, não se tendo observado rejeição das mesmas. Durante estas duas semanas de aclimatização apenas se registaram 4 mortos (2 peixes dos tanques de RT e 2 peixes dos tanques de RD).

3.2.1 Detecção do desempenho de crescimento

O ensaio iniciou-se com os alevins a pesarem um peso médio de 0.46g e um comprimento médio de 2.80cm (Tabela IV). Sempre aceitaram bem as rações mas era possível distinguir quais delas eram as mais desperdiçadas. Comparando os indivíduos da ração Mix para os indivíduos das restantes rações, estes eram mais vorazes a comerem e raramente deixavam ração no fundo dos tanques. Outra diferença notória é que enquanto os peixes da ração Mix

vinham ao torno da água buscar o alimento quando este era fornecido, os peixes, tanto da RT como da RD, deixavam a ração assentar no fundo dos tanques.

Tabela IV – Performance de crescimento de juvenis de Tilápia moçambicana alimentados com as dietas experimentais. Comparação de valores de pesos e comprimentos efetuados ao longo do período experimental. Os valores encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.

	Dietas		
	RT	RD	Mix
Peso inicial (g)	0,46 \pm 0,26	0,46 \pm 0,26	0,46 \pm 0,26
Peso final (g)	4,53 \pm 2,26	4,91 \pm 3,32	5,17 \pm 3,39
Diferenças entre pesos (g)			
P2 – P1	0,60 \pm 0,67	0,72 \pm 0,70	0,61 \pm 0,72
P3 – P2	2,29 \pm 1,99	2,56 \pm 2,55	2,83 \pm 2,59
P4 – P3	0,89 \pm 2,58	0,90 \pm 4,07	1,06 \pm 3,71
P_{Final} – P_{Inicial}	3,79 \pm 2,29	4,11 \pm 3,28	4,51 \pm 3,39
Comprimento inicial (cm)	2,80 \pm 0,44	2,80 \pm 0,44	2,80 \pm 0,44
Comprimento final (cm)	6,45 \pm 1,24	6,43 \pm 1,67	6,66 \pm 1,72
Diferenças entre comprimentos (cm)			
C2 – C1	0,91 \pm 0,88	0,86 \pm 0,86	0,83 \pm 0,91
C3 – C2	1,72 \pm 1,53	1,80 \pm 1,56	1,93 \pm 1,59
C4 – C3	0,56 \pm 1,51	0,55 \pm 2,10	0,59 \pm 2,02
C_{Final} – C_{Inicial}	3,21 \pm 1,38	3,17 \pm 1,77	3,36 \pm 1,81

RT – Ração de Tilápia.

RD – Ração de Dourada.

Durante o decorrer das 11 semanas de trabalho, todos os indivíduos foram medidos e pesados registrando-se os valores destes parâmetros morfométricos, estando representados na Tabela IV como pesos e comprimentos iniciais/finais e a diferença entre os dados dos pesos e comprimentos apresentados como valores médios. Nas diferenças entre pesos e as diferenças entre comprimentos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos dados. Relativamente ao P2-P1 os alevins alimentados com RD foram os que ganharam um maior peso corporal (0,72g). Entre a RT e a Mix não se obteve uma grande diferença de pesos (0,60g e 0,61g, respetivamente). No P3-P2 alcançou-se um grande incremento de peso em todos os indivíduos das três dietas. É na dieta Mix que se registaram os peixes com o incremento mais significativo, com um ganho de 2,83g. A RT continua a registar os valores mais baixos, 2,29g, seguida da RD com 2,56g. Olhando atentamente para a RD e a Mix nas diferenças entre pesos P2-P1 e P3-P2, a RD que mostrou os indivíduos mais pesados na P2-P1, na P3-P2 os mesmos ganharam menos biomassa em comparação com os alevins da Mix. O mesmo se verificou para o P4-P3, 1,06g para a Mix, 0,90g para a RD e 0,89g para a RT, no entanto, houve uma diminuição do incremento de biomassa nas três dietas em comparação com P3-P2. No $P_{Final} - P_{Inicial}$ é demonstrando que a dieta Mix teve uma maior eficiência no aumento do peso corporal, tendo os seus indivíduos ganho um peso médio de 4,51g, seguida pela dieta RD (4,11g) e, por fim, a dieta RT (3,79g). Em relação à diferença entre comprimentos, no C2-C1 os maiores alevins foram registados na RT com 0,91cm. Tal como no P2-P1, na Mix obtiveram-se os alevins mais pequenos (0,83cm), não diferenciando muito dos peixes alimentados com a RD (0,86cm). No C3-C2, todos os alevins tiveram um crescimento significativo, tal como se verificou no P3-P2, com os peixes mais compridos na dieta Mix (1,93cm). Para a RD e a RT registaram-se 1,80cm e 1,72cm, respetivamente. Exatamente como se sucedeu no P4-P3, no L4-L3 também se apurou um decréscimo no crescimento corporal nas três dietas, sem grandes diferenças entre si (0,59cm para a dieta Mix; 0,56cm para a RT; 0,55cm para a RD). Normalmente era a RT a registar os valores mais baixos mas nesta etapa foi a RD que obteve os indivíduos mais pequenos. Através do $C_{Final} - C_{Inicial}$ que os peixes que adquiriram um maior incremento em comprimento foram os da dieta Mix (3,36cm), seguidos da dieta RT (3,21cm) e, por fim, a dieta RD (3,17cm). Comprando $P_{Final} - P_{Inicial}$ com $C_{Final} - C_{Inicial}$, a dieta Mix concebeu peixes com maior biomassa e maior tamanho corporal. No entanto, na RT os peixes eram magros e compridos, enquanto os peixes alimentados com a dieta RD eram mais pesados mas pequenos. Esta comparação pode ser corroborada com os pesos e comprimentos finais para

as três dietas: na dieta Mix obtiveram-se tilápias com valores médios de 5,17g e 6,66cm; na dieta RT com 4,53g e 6,45cm; e na dieta RD com 4,91g e 6,43cm (Figura 5).



Figura 5 - Tamanhos corporais finais de juvenis de *Oreochromis mossambicus*.

Durante o decorrer do presente ensaio nutricional observou-se que os indivíduos da dieta RD adquiriram hemorragias nas barbatanas dorsal, peitorais, caudal e anal, na boca e nos opérculos, estando representado na Figura 6.



Figura 6 - Juvenil de Tilápia Moçambicana com hemorragias corporais alimentado com RD.

No final do ensaio, todos os indivíduos já tinham atingido o estágio de juvenis e foi possível ao longo das 11 semanas, examinar as mudanças morfológicas e a maturação dos indivíduos. Gradualmente foram ganhando pequenas listagens negras ao longo da zona dorsal do corpo. Os machos começaram a adquirir tons avermelhados nas extremidades das barbatanas caudais, tons verde-azeitona na coloração do corpo, bocas com os lábios mais

salientes e exuberantes em relação às fêmeas e a proeminência de uma pequena curvatura no topo da cabeça. Nas últimas semanas, era visível, em cada um dos tanques das três dietas, a manifestação de, pelo menos, um macho dominante. Contudo, nas fêmeas não era tão perceptível se já se encontravam maturadas mas, quando se procedeu à filetagem das amostras para a recolha de músculos para o ensaio da composição química, observou-se na zona ventral das fêmeas que as mesmas já continham ovos nas suas gónadas (Figura 7). Esta característica foi encontrada nas fêmeas pertencentes às dietas RD e Mix.



Figura 7 - Fêmea juvenil da espécie *Oreochromis mossambicus* com ovos na sua zona ventral.

Tabela V - Eficiência final na utilização das rações e taxa de sobrevivência de juvenis de *Oreochromis mossambicus* alimentados com três rações distintas durante 11 semanas. Os valores encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.

	Dietas		
	RT	RD	Mix
WG (g)	4,07 \pm 0,30	4,46 \pm 0,51	4,71 \pm 0,38
SGR (% dia ⁻¹)	2,97 \pm 0,09	3,08 \pm 0,13	3,14 \pm 0,09
FCR (g/g)	6,25 \pm 3,50	16,44 \pm 11,22	12,45 \pm 5,76
Sobrevivência (%)	93,33 \pm 5,77	86,67 \pm 5,77	95,00 \pm 5,00

RT – Ração de Tilápia.

RD – Ração de Dourada.

Os dados referentes à eficiência final na utilização das rações assim, como, a taxa de sobrevivência para as três dietas encontram-se representados na Tabela V. Durante decorrer do presente ensaio, não se registaram eventos de mortalidade maciços, com uma taxa de sobrevivência bastante elevada (95,00% para a dieta Mix, 93,33% para a RT e 86,67% para a RD). A dieta RT teve os valores mais baixos para os parâmetros WG, SGR e FCR (4,07g, 2,97% dia⁻¹ e 6,25g/g, respetivamente). A dieta Mix foi a que teve os valores máximos nos parâmetros WG (4,71g) e SGR (2,97% dia⁻¹) mas em relação ao fator FCR apenas teve 12,45 g/g, destacando-se a dieta RD com um valor máximo de 16,44g/g. Esta dieta obteve valores intermédios para o WG (4,46g) e o SGR (3,08% dia⁻¹). Não existiram diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros entre as três dietas.

3.2.2 Análises químicas

Tabela VI - Composição química final como % de matéria seca de músculo de juvenis de tilápia moçambicana. Os valores encontram-se representados como média ± Desvio Padrão de determinações em triplicado.

	Dietas		
	RT	RD	Mix
Proteína	18,53 ± 0,04 ^a	18,04 ± 0,03 ^b	17,61 ± 0,07 ^c
Lípidos	1,38 ± 0,26	0,89 ± 0,40	1,01 ± 0,19
Humidade	80,54 ± 0,15 ^a	79,84 ± 0,13 ^b	80,57 ± 0,09 ^a
Cinzas	1,50 ± 0,06	1,47 ± 0,06	1,41 ± 0,21

Valores numa linha com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

RT – Ração de Tilápia.

RD – Ração de Dourada.

A composição química final do músculo dos juvenis de *Oreochromis mossambicus* encontra-se representada na Tabela VI como valores médios de proteína, lípidos, humidade e cinzas. A proteína apresenta diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as três dietas estudadas. Os músculos com maior teor de proteína pertenciam à dieta RT com

18,53% e com menor teor os da Mix (17,61%). RD apresentou 18,04% de proteína nos músculos dos juvenis. Para os lípidos não existiram diferenças estatisticamente significativas, sendo, novamente, a RT com valor máximo (1,38%). No entanto, foi a RD com um valor mínimo (0,89%) seguida da dieta Mix (1,01% de lípidos). Os valores para a humidade apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a RD com as outras duas dietas. A RT e a Mix não variaram muito entre si, 80,54% e 80,57%, respetivamente, e a RD teve o teor mais baixo, 79,84%. Por fim, nas cinzas também não existiram diferenças significativas, com o teor máximo para a RT (1,50%), seguida da RD (1,47%) e a Mix (1,41%).

3.3 Anestésias

3.3.1 Tempos médios para os três anestésicos

Os ensaios executados com os três anestésicos realizaram-se sem qualquer anormalidade e nunca foi registada a mortalidade de algum peixe durante o decorrer das experiências ou nas horas seguintes. Para as três concentrações utilizadas foram determinados os valores médios do Tempo de anestesia vs. Tempo de recuperação, em minutos, expressos como média \pm Desvio Padrão (Tabela VII). O primeiro anestésico a ser utilizado foi o MS-222. Para os 0,15ml L⁻¹ de MS-222 os seus tempos foram de 1,16 \pm 0,46min. vs. 0,65 \pm 0,33min.; para os 0,25ml L⁻¹ os tempos foram de 0,44 \pm 0,15min. vs. 0,30 \pm 0,05min.; e para os 0,35 ml L⁻¹ os tempos foram de 0,26 \pm 0,10min. vs. 1,04 \pm 0,53min. A concentração de MS-222 que demora menos tempo a anestésiar as Tilápias Moçambicanas é a de 0,35ml L⁻¹ e a que leva mais tempo é a concentração mais pequena, 0,15ml L⁻¹. Para o tempo de recuperação, os peixes que recuperaram mais rapidamente foram dos da concentração 0,25ml L⁻¹ de MS-222, enquanto os da concentração 0,35ml L⁻¹ foram os que levaram mais tempo na recuperação. No segundo ensaio foi utilizado o anestésico óleo de cravo com as seguintes concentrações e seus respetivos tempos: para 0,10ml L⁻¹, 0,69 \pm 0,27min. vs. 0,73 \pm 0,48min.; para 0,15ml L⁻¹, 0,25 \pm 0,10min. vs. 1,06 \pm 1,34min.; e para 1,2ml L⁻¹, 0,91 \pm 0,34min. vs. 0,33 \pm 0,10min.. Averiguando os valores verifica-se que para o óleo de cravo a concentração mais rápida a anestésiar foi a de 0,15ml L⁻¹ e a mais demorada a de 1,2ml L⁻¹. E as que proporcionaram um tempo de recuperação mais rápido e mais lento nos juvenis de Tilápia Moçambicana foram a 1,2ml L⁻¹ e 0,15ml L⁻¹, respetivamente. Por

último, utilizou-se o anestésico 2-fenoxietanol analisando-se quatro concentrações. A concentração mais baixa, 0,40ml L⁻¹, apresentou tempos de 3,60 ± 1,17min. vs. 0,86 ± 0,84min.; para 0,60ml L⁻¹, 1,39 ± 0,64min. vs. 0,43 ± 0,29min.; para 0,80ml L⁻¹, 0,59 ± 0,23min. vs. 1,25 ± 0,68min.; e para 1,00ml L⁻¹, 0,55 ± 0,20min. vs. 1,49 ± 0,60min.. Assim sendo, a concentração mais rápida a anestésiar foi o de 1,00ml L⁻¹ de 2-fenoxietanol e o mais demorado foi a concentração mais baixa, 0,40ml L⁻¹. Para o tempo de recuperação deste anestésiante, a concentração que levou os peixes a recuperarem mais rapidamente foi a de 0,60ml L⁻¹ e a que levou mais tempo foi 1,00ml L⁻¹.

Tabela VII - Tempos médios de anestesia e de recuperação, em minutos, para as Diferentes concentrações utilizadas nos anestésicos estudados. Os dados encontram-se representados como média ± Desvio Padrão.

	Concentração (ml L ⁻¹)	Tempo (minutos)	
		Anestesia	Recuperação
Ms-222	0,15	1,16 ± 0,46	0,65 ± 0,33
	0,25	0,44 ± 0,15	0,30 ± 0,05
	0,35	0,26 ± 0,10	1,04 ± 0,53
Óleo de cravo	0,10	0,69 ± 0,27	0,73 ± 0,48
	0,15	0,25 ± 0,10	1,06 ± 1,34
	1,2	0,91 ± 0,34	0,33 ± 0,10
2-Fenoxietanol	0,40	3,60 ± 1,77	0,86 ± 0,84
	0,60	1,39 ± 0,64	0,43 ± 0,29
	0,80	0,59 ± 0,23	1,25 ± 0,68
	1,00	0,55 ± 0,20	1,49 ± 0,60

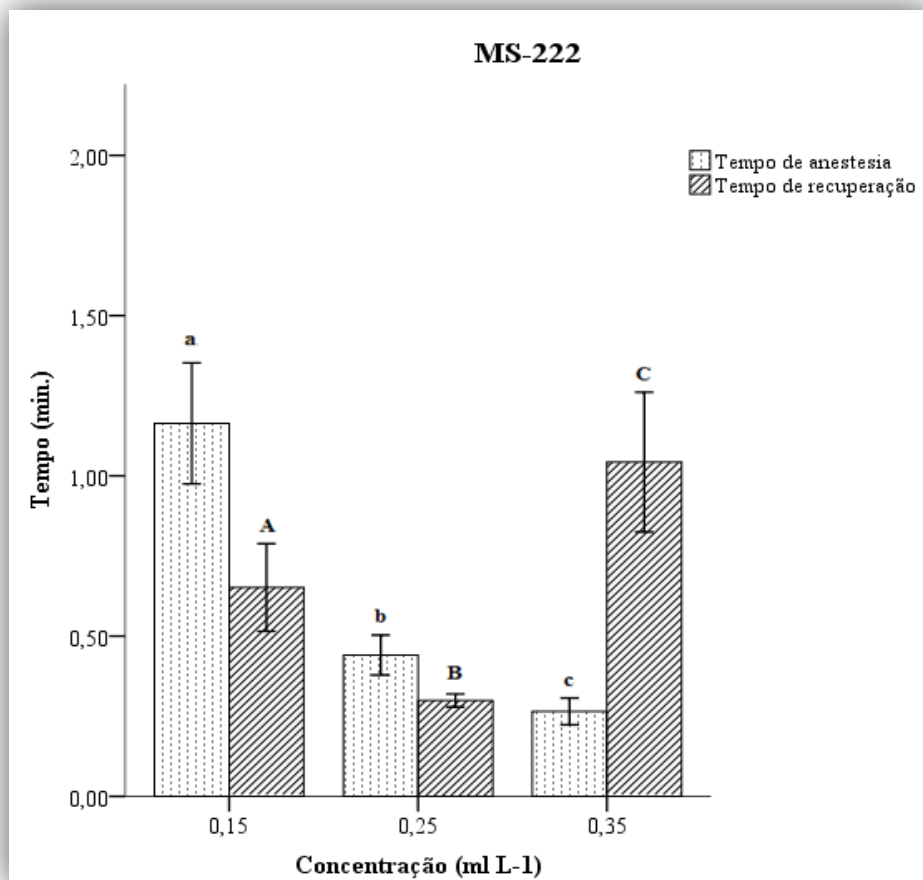


Figura 8 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com três concentrações distintas para o agente anestésico MS-222. Os dados encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.

Na Figura 8 encontram-se representados os tempos de anestesia e de recuperação para o anestésico MS-222 e as comparações entre os tempos para as diferentes concentrações que foram estudadas. Como é possível observar-se, para o tempo de indução da anestesia existem diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as três concentrações. A concentração $0,15 \text{ ml L}^{-1}$ demorou mais tempo a surtir um efeito anestésico sobre os peixes em relação às concentrações de $0,25 \text{ ml L}^{-1}$ e $0,35 \text{ ml L}^{-1}$ de $0,72 \pm 0,10 \text{ min.}$ e $0,90 \pm 0,09 \text{ min.}$, respetivamente. Em relação à concentração $0,25 \text{ ml L}^{-1}$ demorou mais $0,18 \pm 0,04 \text{ min.}$ relativamente à de $0,35 \text{ ml L}^{-1}$. Para os tempos de recuperação, também se verificam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) para as concentrações usadas. Na recuperação dos indivíduos foi a concentração $0,35 \text{ ml L}^{-1}$ a ter um efeito mais demorado, com a diferença de mais $0,39 \pm 0,12 \text{ min.}$ em relação aos $0,15 \text{ ml L}^{-1}$ e mais $0,74 \pm 0,11 \text{ min.}$

que os $0,25\text{ml L}^{-1}$. Comparando a de $0,15\text{ml L}^{-1}$ com a de $0,25\text{ml L}^{-1}$, a primeira levou mais $0,35 \pm 0,07\text{min.}$ que a segunda na recuperação dos juvenis de Tilápia Moçambicana.

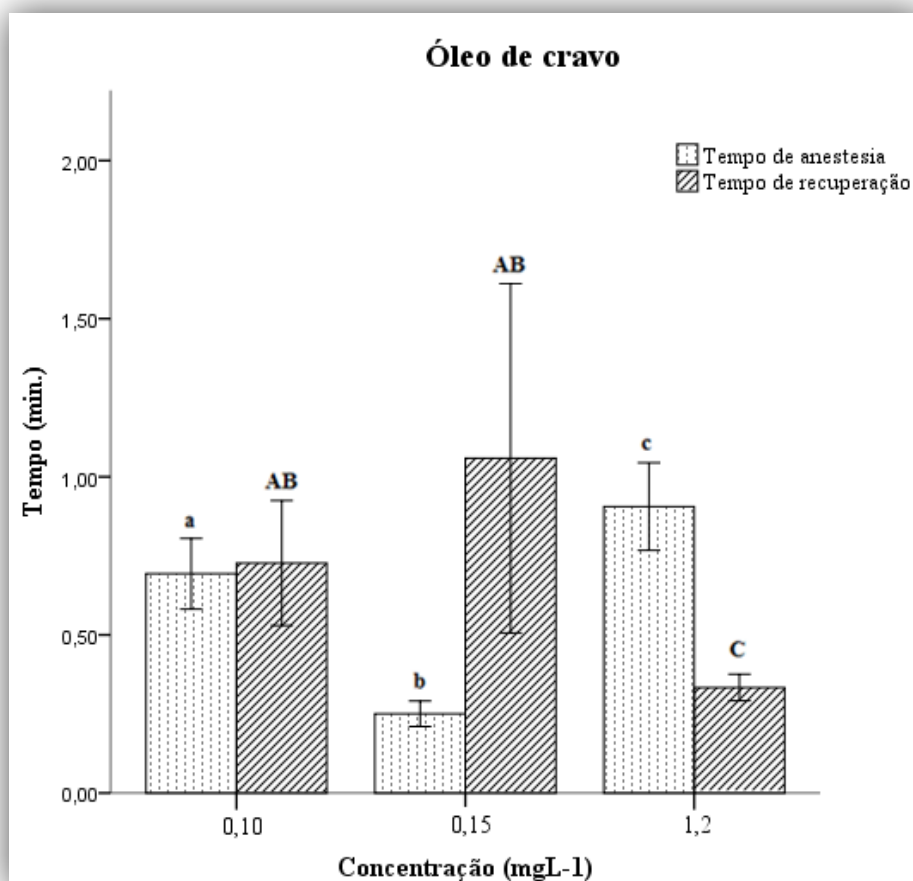


Figura 9 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com três concentrações distintas para o agente anestésico óleo de cravo. Os dados encontram-se representados como média \pm Desvio Padrão.

Para o óleo de cravo foi feita a mesma comparação entre as concentrações usadas para os dois tempos analisados (Figura 9). Entre os tempos de anestesia constatam-se diferenças significativas ($P < 0,05$) para todas as concentrações. Os peixes anestesiados com $1,2\text{ml L}^{-1}$ de óleo de cravo levaram mais tempo a ficarem no estado pretendido em relação às duas outras concentrações, numa de diferença de mais $0,21 \pm 0,09\text{min.}$ relativamente aos $0,10\text{ml L}^{-1}$ e mais $0,66 \pm 0,07\text{min.}$ do que os $0,15\text{ml L}^{-1}$. E a concentração $0,10\text{ml L}^{-1}$ demorou mais

0,44 ± 0,06 min. em relação aos 0,15ml L⁻¹. Contudo, para os tempos de recuperação não se verificam diferenças significativas entre todas as concentrações. A concentração maior, 1,2ml L⁻¹, apresenta diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre as outras duas concentrações mas não existem diferenças significativas entre os 0,10ml L⁻¹ e os 0,15ml L⁻¹. Os 0,15ml L⁻¹ de óleo de cravo proporcionaram um tempo mais demorado na recuperação dos peixes, mais 0,33 ± 0,28min. que os 0,10ml L⁻¹ e mais 0,73 ± 0,27min. que os 1,2ml L⁻¹. E relativamente aos 0,10ml L⁻¹, esta concentração demorou mais 0,39 ± 0,10min. do que a de 1,2ml L⁻¹.

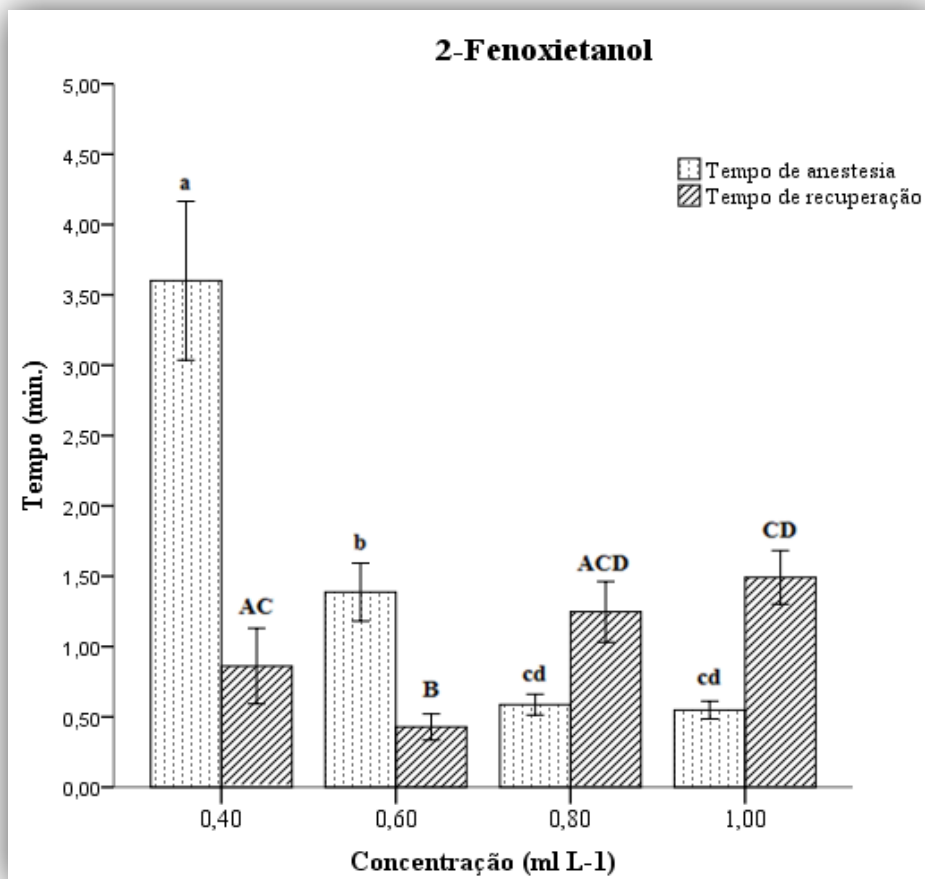


Figura 10 - Tempo de indução da anestesia e tempo de recuperação, em minutos, para juvenis de Tilápia Moçambicana anestesiados com quatro concentrações distintas para o agente anestésico 2-fenoxietanol. Os dados encontram-se representados como média ± Desvio Padrão.

Por fim, o anestésico 2-fenoxietanol apresenta diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre todas as concentrações para o tempo de indução da anestesia, com exceção entre os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$ e os $1,00 \text{ ml L}^{-1}$ (Figura 10). Notoriamente a concentração $0,40 \text{ ml L}^{-1}$ foi a que obrigou os peixes a manterem um maior período de contato com o anestésico, por mais $2,21 \pm 0,30 \text{ min.}$ que os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$; mais $3,01 \pm 0,28 \text{ min.}$ que os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$; e mais $3,05 \pm 0,28 \text{ min.}$ que os $1,00 \text{ ml L}^{-1}$. Os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$ demoraram mais $0,80 \pm 0,11 \text{ min.}$ que os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$ e mais $0,84 \pm 0,11 \text{ min.}$ que os $1,00 \text{ ml L}^{-1}$. Entre as concentrações $0,80 \text{ ml L}^{-1}$ e $1,00 \text{ ml L}^{-1}$ a diferença de tempos é de apenas $0,04 \pm 0,05 \text{ min.}$. Analisando-se os tempos de recuperação desta anestesia, constata-se que a concentração $0,60 \text{ ml L}^{-1}$ difere estatisticamente com todas as outras concentrações ($P < 0,05$); os $0,40 \text{ ml L}^{-1}$ apresenta diferenças significativas ($P < 0,05$) com as concentrações $0,60 \text{ ml L}^{-1}$ e $1,00 \text{ ml L}^{-1}$; os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$ apresenta apenas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) com os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$; assim como os $1,00 \text{ ml L}^{-1}$ apenas possui diferenças significativas ($P < 0,05$) com a concentração $0,60 \text{ ml L}^{-1}$. O que apresenta maior tempo de recuperação em relação às restantes concentrações são os $1,00 \text{ ml L}^{-1}$, com as seguintes diferenças: mais $0,63 \pm 0,16 \text{ min.}$ que os $0,40 \text{ ml L}^{-1}$; mais $1,06 \pm 0,10 \text{ min.}$ que os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$; e mais $0,24 \pm 0,14 \text{ min.}$ que os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$. Os $0,40 \text{ ml L}^{-1}$ demoraram mais $0,43 \pm 0,14 \text{ min.}$ que os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$. E os $0,80 \text{ ml L}^{-1}$ demoraram mais $0,39 \pm 0,17 \text{ min.}$ que os $0,40 \text{ ml L}^{-1}$ e mais $0,82 \pm 0,12 \text{ min.}$ que os $0,60 \text{ ml L}^{-1}$.

4. DISCUSSÃO

4.1 Reprodução

A ocorrência de atos nupciais e de reprodução da espécie *Oreochromis mossambicus* foram observados e estudados durante o período experimental e decorreram dentro do esperado. As características morfológicas dicromáticas características nos machos desta espécie manifestaram-se como Webb e Maughan (2007) descreveram: os machos reprodutores adquiriram uma típica coloração oliveira-escura com modificação para preto, de amarelo para branco nas partes inferiores da cabeça (mais concretamente nos opérculos, face e garganta) e tons avermelhados nas margens das barbatanas dorsal e caudal. A coloração e padrões do corpo são comuns entre os animais e são muitas vezes o resultado da seleção sexual. A coloração nupcial é comumente influenciada por hormonas sexuais. Apesar da coloração nupcial em peixes teleósteos, assim, como em muitos outros animais, geralmente é mais pronunciada nos machos. Contudo, também existem fêmeas de várias espécies de peixes que desenvolvem padrões de cores nupciais, anunciando aos machos que estão sexualmente recetivas (Sköld *et al.*, 2008). De acordo com Korzan *et al.* (2008) os padrões de cores podem ter um significado particular para preferências agonísticas e/ou de acasalamento, como no caso de *Xiphophorus pygmaeus* que 13-25% dos machos são dourados e os restantes são azuis. Nesta espécie, as fêmeas preferem os machos azuis, enquanto os machos dourados dominam as interações agonísticas. Em contraste, nos ciclídeos Midas (*Theraps citrinellum*), os machos dourados (<10% da população) são mais agressivos do que nos machos cinzentos, conferindo-lhes uma vantagem nas interações agonísticas. No entanto, não foi encontrada uma associação na escolha das fêmeas em relação à coloração dos machos. Oliveira e Almada (1995) e Russell *et al.* (2012) afirmam que os machos do género *Oreochromis* apresentam distintivas e conspícuas cores de reprodução: são geralmente maiores do que as fêmeas e em algumas espécies possuem mandíbulas largas e dentes unicúspides quando se encontram maduros; outros machos apresentam um apêndice na papila genital. Oliveira e Almada (1995) referenciam outras características sexualmente dimórficas que são notáveis, tais como: as barbatanas dorsal e anal são pontiagudas em machos maduros e arredondadas nas fêmeas [*Sarotherodon galilaeus* (Linnaeus) e *Oreochromis aureus* (Steindachner)], as barbatanas pélvicas alcançam ou ultrapassam o ânus nos machos mas, no entanto, isto não se sucede nas fêmeas [*Tilapia zillii* (Gervais), *S. galilaeus* e *O. aureus*], os machos possuem uma abertura

urogenital e as fêmeas possuem duas [*T. zillii*, *S. galilaeus*, *O. aureus* e *O. mossambicus* (Peter)], a barbatana dorsal dos machos maduros é mais espessa e contínua enquanto a das fêmeas é retalhada (*O. aureus*) e os machos têm um lábio mais grosso na mandíbula superior (*O. mossambicus*).

Os ninhos observados durante o decorrer do presente estudo vão de acordo com Russell *et al.* (2012) que descrevem os *leks* como ninhos circulares escavados com as bocas dos machos em substratos arenosos ou lamacentos. Ao contrário de outras espécies de tilápias, em que nalgumas fases de construção do ninho são utilizadas as barbatanas peitorais ou a caudal para remoção de substrato (*e.g.* *O. niloticus* e *S. galilaeus*), *Oreochromis mossambicus* utiliza apenas a boca (Oliveira, 1995). A boca para além de ser utilizada na construção do ninho (quanto maior e mais resistente for o macho, mais rapidamente o *lek* é construído e de maiores dimensões), como foi observado no presente trabalho, também desempenha uma função importante nos comportamentos agonísticos (Oliveira e Almada, 1995). Estes autores também defendem que, uma vez que esta espécie é um predador oportunista, alimentando-se ocasionalmente de pequenos animais, uma boca maior poderia ser favorecida pela seleção, facilitando a captura de presas maiores. No entanto, esta hipótese não explica o alargamento diferencial da boca que existe entre os sexos. Se de fato o alargamento da boca tinha sido selecionado para a eficiência de captura de presas, também seria importante que as fêmeas tivessem uma boca tão grande quanto os machos, quando estas são sujeitas a maiores exigências nutricionais para a produção de ovos. A construção de ninhos logo nos primeiros dias de estudo aponta a manifestação de imposições agonísticas e a posse de um território por parte dos machos. Apesar do macho do Grupo 1 não ter criado um ninho circular, não se constatou qualquer influência na atração das fêmeas para o ato reprodutivo. No entanto, também se pode colocar esta situação em dúvida pelo fato de haver apenas um único macho dominante. James e Bruton (1992) que estudaram a espécie *O. mossambicus* em meio selvagem observaram no lago de Bradshaw's Mill Dam, em Cabo Oriental (África do Sul), que muitos ninhos não eram simétricos e não eram claramente definidos, sendo simples escavações feitas em águas muito rasas (30 a 50cm) e estavam muitas vezes cobertos com caules partidos de *Typha capensis* e outros detritos. Contrariamente ao que se sucedeu neste Grupo, no Grupo 2 o macho manteve sempre 2 ninhos construídos e isto pode ter sido devido à proporção sexual existente neste Grupo: 1:4 (macho:fêmea). Estudos feitos em populações selvagens de outros ciclídeos que também constroem ninhos revelaram uma correlação positiva entre o tamanho do ninho e o sucesso

reprodutivo. Em cativeiro *O. mossambicus* demonstrou uma associação positiva entre o domínio, os níveis de androgênio, o tamanho do ninho e o acesso às fêmeas, sendo a preferência das fêmeas os machos que construam ninhos maiores, pois tendem a ter índices gonado-somáticos mais elevados (Amorim *et al.*, 2003; Oliveira e Almada, 1995). Galhardo *et al.* (2008) estudaram se a disponibilidade de substratos poderia afetar os comportamentos e a fisiologia de indivíduos *O. mossambicus* e verificaram que a escavação de *leks* e um comportamento territorial foram mais frequentes nos meios com substrato, embora estes também tenham ocorrido sem esse recurso. Também observaram que o comportamento sexual era superior nos machos dominantes do grupo Macho-Fêmea na presença de um substrato, sugerindo que o substrato pode ser um facilitador ambiental para a exibição de comportamentos sexuais. Estes autores chegaram à conclusão que a falta de substrato afeta o comportamento dos machos, pois existe a redução de certos padrões que são cruciais na sua aptidão no ambiente natural. No caso de machos maduros de tilápias que fazem a reprodução com incubação em substrato (*T. rendalli*), primeiramente estes demarcam e defendem um território ao longo das margens dos rios para nidificação. Posteriormente, as fêmeas juntam-se aos machos e após a corte entre os indivíduos, que pode demorar várias horas a alguns dias, é que os casais ficam formados. Contrariamente à espécie *O. mossambicus* em que apenas o macho participa na construção do ninho, em *T. rendalli* os dois parceiros preparam a escavação de um ninho com uma profundidade variável, podendo abrigar um adulto. No reservatório Lufira, *T. rendalli* estabeleceu os seus territórios a uma profundidade de 20 a 80cm (especialmente 50cm), preferindo terrenos com uma inclinação acentuada e perto da orla marginal com vegetação. No lago Kinneret, Israel, *T. zilli* preferiu fundos com seixos ou areia com vegetação abundante (*Phragmite*) e os territórios são menores em habitats com vegetação densa (2,0 a 2,5m²) do que em águas abertas (5 a 6m²) (Pullin e Lowe-McConnell, 1982). Oliveira (1995) apresenta cinco hipóteses explicativas (que também podem ser interpretadas como vantagens para o sucesso reprodutivo de *O. mossambicus*) para a manutenção do comportamento de construção do ninho: a) a pressão de predação sobre os ovos é muito elevada, de forma que o fato de a reprodução se dar “fora dos olhares” dos machos vizinhos, potenciais predadores de ovos, confere uma dupla proteção: por um lado existe uma maior incerteza para os predadores em relação ao momento da oviposição, obrigando-os a uma exposição prolongada a curta distância, e passível de resposta por parte do macho residente; por outro lado durante o curto período de tempo, entre a oviposição e o apanhar dos ovos pela fêmea, em que os ovos se encontram no substrato, o

ninho confere-lhes proteção visual contra predadores; b) o ninho confere proteção ao par durante a postura, diminuindo o risco de tentativas de fertilização de ovos por outros machos (“*sneaking fertilizations*”), aumentando a certeza de paternidade pelo macho territorial; c) numa arena reprodutora, em substrato móvel, com muitas dezenas ou centenas de machos territoriais, os ninhos podem servir como referências espaciais que marcam as fronteiras dos territórios individuais de cada peixe; d) os ninhos podem ser utilizados pelas fêmeas durante a escolha de parceiro como indicadores da qualidade dos machos; e) por inércia evolutiva, o comportamento de construção de ninho já presente em formas primitivas de incubadores de substrato (*e.g. Paratilapia polleni*), ter-se-ia mantido nos incubadores bucais.

A agressividade dos machos dominantes durante a época reprodutiva sobre as fêmeas ou outros machos subordinados é um comportamento característico desta espécie. Os Ciclídeos em geral e as tilápias utilizam vários meios de comunicação diferentes, existindo pelo menos 4 canais: visual, acústico, químico e tátil. A importância relativa destes quatro canais varia de espécie para espécie e pode estar modulada por variáveis ecológicas do habitat de cada espécie. No caso de *O. mossambicus* o canal visual parece ser o canal de comunicação mais utilizado, sendo também o que se encontra mais bem estudado. Em termos de sinais agonísticos esta espécie apresenta alguns padrões bastante ritualizados que são comuns a todos os Ciclídeos. Nos padrões de ameaça *Oreochromis mossambicus* adota posturas que tendem a maximizar o seu tamanho aparente. Como o caso das exibições frontais e laterais, com ereção das barbatanas ímpares e das pélvicas, e com abertura da boca ou da membrana branquiostegal, respetivamente. No caso das exibições laterais o emissor tenta manter-se perpendicular ao oponente, e no caso de não estarem ao mesmo nível inclina o corpo na direção do adversário. No padrão de submissão, o indivíduo ameaçado adota uma postura que tende a reduzir o seu tamanho aparente, com todas as suas barbatanas recolhidas e com a membrana branquiostegal fechada (Oliveira, 1995). Tal como no presente estudo, também Oliveira (1995) observou comportamentos agonísticos semelhantes aos que aqui foram observados, e distinguindo-os como: aproximação (um indivíduo desloca-se até à vizinhança de outro indivíduo, considerando-se que um peixe se encontra na vizinhança de outro quando se aproxima a uma distância inferior ao comprimento do corpo deste); arranque (impulso único de um indivíduo na direção de outro indivíduo, sem se chegarem a verificar movimentos de natação; podendo ser seguido de investida ou não); investida (deslocação em natação rápida dirigida para um indivíduo); perseguição (após uma investida ou aproximação um peixe pode nadar no encalço de outro que foge); toque (contato físico de um peixe noutro;

após investida, arranque ou aproximação um peixe pode entrar em contato com outro); morder (após investida, perseguição, aproximação ou durante um combate, um indivíduo pode morder outro; as zonas mais frequentes atingidas são a cabeça e o focinho); afastamento (um indivíduo afasta-se de outro em natação lenta). O fato de os tanques serem pequenos para as dimensões dos Grupos podem ter influenciado em vários aspetos o comportamento dos indivíduos. O ideal teria sido tanques grandes e circulares que proporcionassem mais espaço para estes comportamentos agonísticos, como para as distâncias de nidificação, facilitando o estudo e uma interpretação mais detalhada destes comportamentos. Pullin e Lowe-McConnell (1982) afirmam que tanto os reprodutores incubadores em substrato como os incubadores bucais, a agressão territorial é mostrada, principalmente, por exibições e conflitos simbólicos e raramente por verdadeiras lutas que levam a ferimentos. No entanto, os reprodutores incubadores são conhecidos na natureza, por exemplo *O. mossambicus*, em que, de um total de 323 indivíduos territoriais, 10% apresentavam feridas. A agressão individual depende do tamanho do peixe, do tamanho do território (que varia de acordo com o tamanho do macho, da densidade da população bem como da natureza do substrato) e o grau de isolamento visual entre os machos vizinhos (influenciado pelo habitat e a variedade do fundo). Certas espécies podem ser consideradas agressivas (*S. niloticus*); intermediárias (*S. macrochir*); e debilmente agressivas (*S. galilaeus*). O grau de agressividade é um fator importante a ter em consideração no cultivo intensivo de tilápias em gaiolas ou em tanques. No presente estudo observaram-se algumas fêmeas feridas e o macho subordinado do Grupo 3, mas pensa-se que os ferimentos podem advir das fugas dos indivíduos subordinados e de embaterem nas paredes dos tanques devido à falta de espaço, como já foi anteriormente referido. Em peixes teleósteos, a agressão envolvida em disputas territoriais tem-se mostrado dependente dos níveis de androgénio em várias espécies. Em Pomacentrids e Centrarchids, cujos machos reprodutores reivindicam territórios onde, posteriormente cuidam das suas ninhadas, verificou-se que durante a fase parental há uma dissociação entre a defesa do ninho e os níveis de androgénio, que diminuem nesta fase (*Lepomis macrochirus*, *Chromis dispilu* e *Hypsypops rubicundus*). Uma tendência semelhante também é encontrada em Syngnathids, onde machos reprodutores apresentam níveis mais elevados de androgénio do que os que se encontram a cuidar da ninhada. Estes dados sugerem que as defesas territoriais e parentais podem ser diferentes, pelo menos em alguns dos seus aspetos fisiológicos (Oliveira e Almada, 1998c). Em *O. mossambicus* a sinalização da dominância masculina também pode ser demonstrada através da libertação de urina. Ao contrário dos machos subordinados e

fêmeas, os machos dominantes de tilápia usam a urina como veículo de odorantes potentes divulgados ativamente durante as disputas agressivas e no comportamento de acasalamento. As bexigas dos machos dominantes são maiores e mais musculadas do que as dos machos subordinados e das fêmeas, sugerindo uma adaptação na facilidade de armazenar grandes volumes de urina e por mais tempo, sendo excretada em contextos sociais adequados, que pode modular a agressão entre machos oponentes (Huertas *et al.*, 2014).

O comportamento sexual que foi observado e descrito entre um casal do Grupo 1 é fomentado pelo estudo realizado por Oliveira (1995) com *O. mossambicus*. Este autor sequenciou a corte completa desta espécie da seguinte forma: convite (o macho, na vizinhança ou no interior do seu ninho, coloca-se na frente da fêmea e adota uma posição quase vertical com a cabeça para baixo, expondo o seu flanco à fêmea, com as barbatanas ímpares recolhidas); guiar a fêmea para o ninho (quando o convite foi realizado fora do ninho o macho nada numa posição oblíqua com a cabeça para baixo na direção do ninho; se for seguido pela fêmea, continua até ao ninho assumindo gradualmente uma posição horizontal); circundar o ninho (quando o macho entra no ninho seguido pela fêmea, ele executa um semicírculo, que aparentemente serve para cortar o caminho à fêmea; de seguida, e tendo ficado a fêmea colocada no centro do ninho, o macho inicia uma natação lenta em torno da fêmea com a cabeça orientada para o seu lado e com as barbatanas ímpares recolhidas, descrevendo uma trajetória circular); estremecer (o macho estacionário no interior do ninho e numa posição perpendicular à fêmea apresenta ondulações do corpo acompanhadas de batimentos laterais da parte posterior da cauda; as barbatanas ímpares encontram-se recolhidas e as peitorais e pélvicas atuam como travões, de forma a evitar que as ondulações do corpo e cauda propulsionem o peixe; as ondulações do corpo são movimentos de fraca amplitude mas com uma frequência bastante elevada, assemelhando-se a tremuras); recetividade (o sexo feminino tem um papel mais passivo na sequência de corte desta espécie; a fêmea, quando recetiva, limita-se numa fase inicial da corte a manter-se imóvel, não se afastando perante um convite do macho); seguir o macho (perante um convite, seguido de natação orientada para o ninho por parte do macho, a fêmea segue-o a curta distância em natação lenta); pivô (uma vez no interior do ninho a fêmea mantém uma posição central enquanto o macho a circunda numa posição mais periférica; a fêmea mantém a cabeça sempre orientada para o macho pelo que vai rodando sobre o seu próprio corpo, formando o par um T; o macho encontra-se numa posição mais elevada em relação à fêmea pelo que a boca desta fica perto da região ventral do macho); oviposição (no interior do ninho do macho

a fêmea deposita os ovos no substrato, apresentando vibrações que lhe percorrem o corpo; o macho permanece junto da fêmea formando o par uma posição em T; imediatamente após a oviposição a fêmea começa a apanhar os ovos do substrato numa sequência semelhante à alimentação no substrato; o macho por vezes também parece apanhar alguns ovos mas não os incuba, engolindo-os aparentemente); fertilização dos ovos (após a oviposição o macho ejacula esperma na vizinhança dos ovos e a fêmea captura o esperma para a sua cavidade bucal por movimentos de abrir e fechar a boca, devendo-se dar a fertilização dos ovos maioritariamente no interior da boca da fêmea; com os ovos e o esperma na boca a fêmea executa movimentos de mastigação que devem facilitar a fertilização dos ovos); morder a papila genital (no interior do ninho, com o par formando um T, a fêmea numa posição inferior em relação ao corpo do macho aproxima-se da região ventral deste e morde repetidamente a papila genital do macho; embora este comportamento tenha sido observado em algumas ocasiões antes da oviposição, poderá estar relacionado com a fertilização dos ovos; ou os machos ejaculam nesta altura para o interior da boca da fêmea, mesmo antes da oviposição, ou este comportamento serve de estímulo para a posterior ejaculação dos machos); incubação dos ovos (após terem abandonado o ninho com os ovos fertilizados na boca as fêmeas incubam os ovos e os alevins por um período aproximado de 20 dias). Alguns dos atos descritos por este autor, como vibrações do corpo da fêmea durante a oviposição, não foram possíveis de serem observados neste trabalho, uma vez que os indivíduos eram observados a partir do topo dos tanques. Alguns destes comportamentos sexuais teriam sido mais facilmente registados se os tanques tivessem uma das paredes de vidro, ou o género de uma janela, de forma a fornecer uma visão horizontal em relação aos olhos do observador.

As tilápias (como todos os ciclídeos) são únicos nos seus sistemas de reprodução e cuidado parental dos seus descendentes. Por um período de duas semanas após a desova, as larvas são protegidas por um ou ambos os progenitores até se tornarem independentes. Por esta razão as tilápias encontram-se divididas em dois subgrupos com base no seu comportamento reprodutivo. Os reprodutores de substrato (guardiões) são monogâmicos: formam ligações entre os pares por longos períodos de tempo e os seus ovos são adesivos e guardados no ninho até as *fry* apresentarem natação livre. Os reprodutores incubadores bucais são poligâmicos: a reprodução é breve, os ovos são depositados no ninho e as fêmeas afastam-se do território dos machos após a recolha dos ovos nas suas bocas. Em alguns casos raros, ambos os progenitores ou apenas os machos fazem a incubação bucal dos ovos e das larvas. A classificação sistemática introduzida por Trewavas (1983) baseia-se em grande

parte nos padrões de reprodução – *Oreochromis* são incubadores bucais maternos, *Sarotherodon* são incubadores bucais paternos ou biparentais e *Tilapia* são incubadores no substrato (Canonico *et al.*, 2005; Cnnani e Hulata, 2008). Existe uma grande vantagem entre os gêneros *Tilapia* e *Oreochromis*, pois os incubadores bucais não têm exigências rigorosas em relação à escolha de um habitat para a reprodução por transportarem os seus ovos e larvas na boca, podendo, assim, ocupar todo o tipo de habitat disponível para a desova (Canonico *et al.*, 2005). Um aspecto peculiar da biologia reprodutiva das tilápias é o fenômeno de nanismo. Há muitos registros de populações anãs em águas naturais, incluindo espécies como *O. macrochir*, *O. grahami*, *O. leucostictus*, *S. galilaeus*. Isto pode ser considerado como uma adaptação para a sobrevivência sob condições físicas extremas. Populações com nanismo são caracterizadas por um tamanho máximo reduzido e reprodução precoce; estes indivíduos podem amadurecer com 3 meses de idade, em comparação com 2-4 anos em outras populações (Lèveque, 2002). Esta característica já tinha sido registrada por Pullin e McConnell (1982) e afirmam que pode depender, para além de fatores genéticos, de fatores ambientais como temperatura, disponibilidade de alimentos e fatores sociais. Existem outros fatores que integram o sistema de reprodução de *Oreochromis mossambicus* e que não foram avaliados neste trabalho. Uma delas é a acústica em que Russell *et al.* (2012) pensam que o som é usado apenas por machos territoriais para anunciar a sua presença, mostrar a sua prontidão reprodutiva para as fêmeas, ajuda na defesa territorial, auxilia na escolha do parceiro e sincroniza a libertação dos gâmetas. Amorim *et al.* (2003) relataram que a taxa de produção de som foi positivamente correlacionada com a taxa de corte e que continuou durante todas as fases de corte, especialmente, durante a desova e também foi associada a atividades relacionadas com a construção do ninho. Outro fator é a urina do macho que possui uma feromona libertada durante esta fase. Huertas *et al.* (2014) afirmam que os machos podem discriminar o estágio sexual das fêmeas através de sinais olfativos e quando na presença de fêmeas ovuladas, aumentam a taxa de libertação de urina. A potência olfativa da urina masculina depende do *status* social do doador. Estas observações indicam que os machos de tilápia libertam uma feromona através da urina, que influencia a desova das fêmeas. Oliveira (1995) suporta estes dados ao afirmar que os machos de *O. mossambicus* são sensíveis ao estágio de maturação das fêmeas, cortejando mais as fêmeas quando estão ovuladas e diz que este efeito parece ser mediado por feromonas que são libertadas pelas fêmeas. Com base nestes autores, depreende-se que ambos os sexos libertam feromonas que estimulam ambos os sexos no período de escolha de parceiro sexual.

Durante a reprodução verificou-se que as fêmeas tentavam intrometer-se no ato numa tentativa de comerem os ovos da fêmea que estava a desovar. Este comportamento vai de encontro ao que foi descrito por Oliveira (1995), referindo um aumento da atividade dos indivíduos de *O. mossambicus* presentes no tanque durante os acasalamentos de pares e a intromissão de vários indivíduos (machos e fêmeas) nos ninhos na altura da desova para se alimentarem dos ovos. Também relata a intromissão de machos entre o par no momento da postura com tentativas de fertilizações parasitas. Oliveira e Almada (1998d) discutiram evidências que mostram que os machos desta espécie podem assemelhar-se morfológicamente a fêmeas ou juvenis, permitindo-lhes embostarem os ninhos durante episódios de desova e fertilizar os ovos de uma fêmea reprodutora. O “*sneaking*” foi concretizado predominantemente por machos subordinados ou não-territoriais. As fêmeas têm a capacidade de repartirem as suas posturas por ninhos de machos diferentes, em vez de arriscarem todos os seus ovos numa única tentativa de desova (Russell *et al.*, 2012). Esta tática alternativa de reprodução, o “*sneaking*”, é comumente utilizado em várias espécies de Ciclídeos como *Pseudocrenilabrus philander*, *C. eucinostomus*, *Pseudosimochromis curvifrons*, *Lamprologus callipterus*, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis alcalicus alcalicus*, *O. a. grahami* e *A. burtoni* (Oliveira, 1995).

No desenrolar do trabalho decidiu-se isolar as fêmeas que se encontravam a incubar numa tentativa de se obter um maior número de *fry* por postura por fêmea. Contudo, não se obteve o resultado que seria de se esperar. As fêmeas demonstraram um comportamento inativo e continuavam a perder as suas posturas. Assim, concluiu-se que esta opção não se mostrou muito eficaz. Nos meses que decorreu o presente trabalho, o mês com mais fêmeas a incubarem foi Setembro mas, contraditoriamente, foi onde ocorreram menos posturas. O mês que antecedeu Setembro, Agosto, foi o mais produtivo assim como o mês de Novembro. A sazonalidade na reprodução de Ciclídeos africanos pode ter contribuído para esta diferenciação das desovas ao longo dos meses em estudo. Muitas espécies reproduzem-se de forma contínua ao longo do ano, com picos sazonais de reprodução como é o caso de *Lamprologus ornatipinnis* no Lago Tanganyika. Outras espécies de reprodutores contínuos não ostentam qualquer variação sazonal na reprodução. No entanto, outros reprodutores apresentam períodos de desova bem definidos e três espécies de tilápia, no Lago Malawi, produzem apenas uma ninhada por ano (*Tilapia saka*, *T. squamipinnis* e *T. lidole*) (Reardon e Chapman, 2008). Segundo Russell *et al.* (2012), na África do Sul, em lagoas, foi estimado que *O. mossambicus* pode gerar até 5 ninhadas/fêmea durante um período de 133 dias e que

as desovas ocorrem a cada dois meses ou intervalos mais curtos, se houverem condições favoráveis para tal. No Sri Lanka, constataram que esta espécie, num lago artificial, apresentou 4 picos possíveis ao longo do ano para a época de reprodução. Em contraste, o período de reprodução de *O. mossambicus* em Brisbane, sudeste de Queensland, abrangeu um período de 6-7 meses durante o ano, quando as temperaturas da água foram superiores a 23°C. Henriques (1998) diz que embora a reprodução não ocorra todos os meses, mesmo em condições ambientais favoráveis, uma fêmea pode ter 7 a 8 ninhadas por ano. Já Lucas e Southgate (2003) afirmam que as fêmeas de tilápia desovam em múltiplas posturas e, tipicamente, uma fêmea pode ter 8-12 posturas/ano sobre condições de temperatura favoráveis. Foram sugeridas por Russell *et al.* (2010) estímulos ambientais que podem desencadear a atividade reprodutiva em Ciclídeos. Estes incluem a precipitação, disponibilidade de alimento, fotoperíodo e sincronização com a fase lunar. Para *T. niloticus* foi observado uma maior proporção de reprodutores de ambos os sexos durante a fase de lua cheia e para *T. mariae* a maioria das desovas decorreram durante o último quarto ciclo da lua (quarto-minguante). Reardon e Chapman (2008) também observaram uma correlação entre a massa das gonadas e a precipitação total do mês anterior, o que sugere que a precipitação, ou uma correlação da mesma, pode ser um estimulante para a indução da maturação das gonadas. A temperatura, um fator abiótico bastante importante na reprodução, não parece que tenha influenciado a reprodução uma vez que se manteve sempre constante e dentro dos valores ótimos que são referenciados por Webb e Maughan (2007). Segundo estes autores, o limite mínimo de tolerância térmica para o desenvolvimento de zigotos em populações de laboratório de *O. mossambicus* é entre 17 e 20°C, com um desenvolvimento inferior a 60% a 20°C; a gama de temperaturas ótimas para um bom desenvolvimento (> 90%) encontra-se entre os 24 e 34.5°C. Num tratamento feito em *O. niloticus* utilizando baixas temperaturas (22 ± 1,5°C), por um curto período de tempo (6 – 24h), deu-se a indução da desova nas fêmeas em estudo (> 10-20%) do que nas que se encontravam no tratamento de controlo. À mesma temperatura mas expostas a esta temperatura por um período de tempo mais longo, resultou na reabsorção completa dos oócitos (Bhujel, 2000).

Relativamente à proporção sexual, chegou-se à conclusão que a proporção 1:3 (macho:fêmea) é a ideal. De acordo com Bhujel (2000), uma proporção entre sexos de 1:2 (macho:fêmea) de *O. niloticus* foi considerada melhor do que a proporção de 1:3, em termos de descendência $m^{-2} \text{dia}^{-1}$, bem como ovos $g^{-1} \text{fêmea}^{-1} \text{dia}^{-1}$. Uma proporção de 3:1 ofereceu uma produção significativamente mais elevada de *fry* do que a relação de 1:1 devido aos

efeitos benéficos da "pressão do macho". Além disso, uma proporção de 2:1 mostrou-se ser mais produtiva do que 1:1 e 1:2, possivelmente devido a um aumento na frequência da desova de fêmeas individuais. Estes dados fornecidos por Bhujel (2000) para *O. niloticus* não vai de encontro com o que se sucedeu no Grupo 3, onde existia uma proporção de 2:2 e onde nunca se obteve *fry* destas fêmeas. Este autor afirma que a proporção sexual pode não apresentar efeitos significativos sobre a fecundidade (tamanho da postura). O tamanho relativo ou a biomassa de ambos os sexos podem ser mais importantes. No entanto, a proporção sexual que é mais utilizada pela maioria das *hatcheries* comerciais é 1:1 (macho:fêmea), independentemente do peso dos reprodutores. O tamanho corporal bastante distinto entre os Grupos pode ter influenciado a quantidade de fêmeas a incubarem. Os indivíduos do Grupo 2, que apesar de terem um tamanho corporal mais pequeno comparativamente com os do Grupo 1 e serem os mais novos em termos de idade, foi o Grupo que mais vezes teve as fêmeas a incubarem. Coward e Bromage (1999), num estudo feito com *T. zillii* confirmaram que a fecundidade está significativamente relacionada tanto com o peso como com o comprimento dos peixes, uma relação comumente encontrada em teleósteos. Bhujel (2000) afirma que o tamanho da fêmea é mais importante do que a idade relativamente à fecundidade e ao número total de ovos produzidos. As fêmeas de Tilápia-do-Nilo (*O. niloticus*) que possuem um tamanho corporal maior produzem mais ovos e de maiores dimensões e mais *fry* por fêmea, enquanto as fêmeas mais pequenas desovam mais frequentemente. Este comportamento de *O. niloticus* relatado por Bhujel (2000) encontra-se em concordância com o que aconteceu no presente trabalho com as fêmeas de *O. mossambicus*. De acordo com os resultados obtidos, as fêmeas do Grupo 2 tinham um peso médio inferior e desovaram mais vezes mas com posturas mais pequenas, comparativamente com as fêmeas do Grupo 1. Apesar das variações no número de ovos em cada postura e das variações nas suas dimensões, Oliveira (1995) verificou uma relação inversa entre o número de ovos por postura e o tamanho dos ovos. As fêmeas de *Tilapia* têm posturas grandes e ovos de pequenas dimensões (e.g. *T. zillii*, 7000 ovos (1,1-2,0mm) por postura), *Oreochromis* tem posturas pequenas e ovos de grandes dimensões (e.g. *O. niloticus*, até 700 ovos (2,8-4,3mm) por postura) e *Sarotherodon* ocupa em geral uma posição intermédia (e.g. *S. galilaeus*, até 5000 ovos (2,8-3,0mm) por postura). Greiner e Gregg (2008) relatam que as fêmeas de *O. mossambicus* são capazes de produzirem mais de 1200 ovos ano⁻¹ com uma taxa de sobrevivência entre 50-90%, em condições laboratoriais. Em comparação, a carpa (*Cyprinus*

carpio) produz 80.000 a 1,5 milhões de ovos por época reprodutiva, na Austrália, mas com uma elevada taxa de mortalidade nos juvenis.

Os fato de algumas fêmeas não terem apresentado sucesso nas suas posturas pela observação da perda de ovos, expõem-se duas possíveis hipóteses para este comportamento: a) ocorrência de canibalismo filial por parte da fêmea durante o período de incubação bucal, possivelmente como estratégia reprodutora para manter o seu fator de condição; b) mortalidade de ovos e alevins durante a incubação bucal, que são seletivamente removidos pela fêmea (Oliveira, 1995).

Oliveira e Almada (1998c) observaram que as fêmeas *O. mossambicus* que não se encontravam a incubar demonstraram baixos níveis de agressão entre si e para com os machos. No entanto, as fêmeas que se encontravam em processo de incubação tornaram-se cada vez mais agressivas com os outros membros da mesma espécie mas, ao contrário do sexo masculino que defendem um território sobre o substrato, as fêmeas defendiam um espaço móvel entre si. Curiosamente, neste trabalho observou-se precisamente o contrário do que é descrito por estes autores. Tanto no Grupo 1 como no 2, as fêmeas que não tinham ovos eram bastante agressivas para com as que estavam a incubar, tendo chegado uma fêmea do Grupo 1 a saltar do tanque para fora. Notava-se que as fêmeas a incubar mostravam-se calmas e refugiavam-se nos tubos que se encontravam no interior dos tanques. Oliveira e Almada (1998c) também referenciaram a alteração de cor das fêmeas a incubarem, que apresentavam uma coloração cinza claro sobreposta com listas escuras, os olhos possuíam barras horizontais na íris e os lábios como a zona mandibular tornavam-se escuros. Esta descrição também foi constatada nas fêmeas do presente estudo e esta alteração de cor ajudou a perceber quando é que as fêmeas estavam prestes a libertar as suas *fry*, pois tornavam-se cada vez mais escuras, com a cabeça, olhos e restante corpo totalmente cinzentos-escuros. Esta característica tornou-se uma ferramenta muito importante e auxiliar na perceção do fim do período de incubação porque, por algumas vezes, quando se percebia que as fêmeas encontravam-se a incubar ovos, já teriam iniciado este processo há alguns dias. Mas os dias que foram contabilizados, entre 16-20 dias, encontram-se dentro do período que é descrito por vários autores (Amorim *et al.*, 2003; Oliveira, 1995; Oliveira e Almada, 1998d; Russel *et al.*, 2012).

A taxa de mortalidade nas *fry* de *Oreochromis mossambicus* é baixa devido às fêmeas serem incubadoras bucais, protegendo, assim, os ovos e as larvas nas suas bocas até que

tenham uma idade suficiente para viverem efetivamente num ambiente externo. A *Tilapia mariae* reduz a mortalidade juvenil pela defesa vigorosa que faz ao seu ninho onde as ninhadas crescem (Greiner e Gregg, 2008). Assim que o saco vitelino é reabsorvido, as fêmeas de *Oreochromis mossambicus* permitem que as suas fry saiam das suas bocas. Formam uma nuvem que se orienta constantemente em contato com as progenitoras, seguindo os seus movimentos lentos e refugiando-se em suas bocas ao menor sinal de perigo, advertido pelos seus movimentos (Henriques, 1998; Pullin e McConnell, 1982). Quando os alevins atingem um determinado tamanho (9-10mm em *S. mossambicus*), as fêmeas deixam a área de incubação e, por vezes, reúnem-se em grandes cardumes de várias centenas de indivíduos, nomeadamente, da espécie *S. variabilis*, *S. lidole* e *S. mossambicus*. Finalmente, quando os alevins se encontram totalmente independentes, são libertados pelas fêmeas em águas rasas, onde vivem em cardumes e continuam o seu crescimento (Pullin e McConnell, 1982).

A grande preocupação para a aquacultura é melhorar a taxa de produção de tilápias para o *input* de alimentos. Um dos problemas em cultivo é a reprodução excessiva e o pequeno tamanho resultante do peixe produzido. A maioria dos estudos, por conseguinte, têm-se focado em métodos para o controlo da reprodução. Entre várias técnicas disponíveis, uma é a produção de populações monoss sexuadas, exclusivamente do sexo masculino, para evitar a reprodução durante a fase de crescimento. O objetivo de se produzirem populações monoss sexuadas tem sido concretizado através de hibridação ou o uso de hormonas. A alteração do sexo por via hormonal é conseguida pela utilização de um androgénio sintético (17 α -metiltestosterona) fornecido na dieta inicial, por um período de 21-30 dias (Lévêque, 2002; Lucas e Southgate, 2003). Através da hibridação são selecionadas características vantajosas como o crescimento rápido, aumento da robustez, resistência ao frio, tolerância a salinidades, variações na coloração do corpo e resistência a doenças ou na produção de híbridos com uma relação sexual para nascerem apenas machos (*O. niloticus* fêmeas X *O. aureus* machos) ou apenas fêmeas (*O. latipes* fêmeas X *O. curvinotus* machos) (Bhujel, 2000; Devlin e Nagahama, 2002; Lévêque, 2002). Da mesma forma, em híbridos de salmonídeos, a diferenciação sexual e fertilidade têm sido afetadas. Alguns indícios de intersexualidade, esterilidade e grupos do mesmo sexo surgem em híbridos de *Cyprinodon*. O cruzamento entre fêmeas *P. nigrofasciata* X machos *P. caudofasciata*, resultou numa descendência F1 apenas do sexo feminino (Devlin e Nagahama, 2002). Peixes estéreis crescem mais rápido do que os indivíduos férteis e, por isso, são preferidos pelas

aquaculturas. As tilápias investem uma quantidade significativa de energia para a reprodução e a esterilização pode resultar numa maior utilização da energia no crescimento somático e produzir filetes maiores. Além disso, a preocupação com possíveis fugitivos que se propagam na Natureza poderá ser reduzido em grande parte (Pandit *et al.*, 2015). Atualmente, um método de indução da esterilidade em peixes é a triploidia. Tanto nos salmonídeos como nas tilápias, as gónadas de fêmeas triploides têm um fraco desenvolvimento com muitos poucos oócitos desenvolvidos, enquanto nos machos triploides ocorre a espermatogénese mas a esterilidade ocorre devido à segregação aleatória de trivalentes, que produzem esperma aneuploide (Devlin e Nagahama, 2002).

4.2 Nutrição

De acordo com os pesos e comprimentos médios finais dos juvenis de Tilápia Moçambicana obtidos no trabalho desenvolvido com as três dietas distintas, determina-se que a ração que ofereceu uma melhor performance de crescimento foi a Mix. Em termos de biomassa, a que proporcionou uma menor taxa de engorda foi a RT. Relativamente ao comprimento dos peixes não existe grande diferença entre as dietas RT e RD. A boa aceitabilidade das três dietas demonstra que a Tilápia Moçambicana se adapta a vários tipos de alimentos. A característica mais importante na alimentação de tilápias é o seu baixo nível trófico na cadeia alimentar e os seus hábitos alimentares omnívoros (Cnaani e Hulata, 2008; Mjoun *et al.*, 2010), contrariamente ao que é observado noutros peixes, como o salmão, que requer dietas ricas em proteínas e lípidos com base em fontes de proteína extremamente caras, como farinha de peixe (Mjoun *et al.*, 2010). No cultivo de tilápias, podem ser administrados alimentos baratos (em grande parte com base em plantas ou componentes de origem vegetal), opostamente ao que se sucede com espécies carnívoras que requerem grandes quantidades de proteína animal e gordura (Cnaani e Hulata, 2008). O crescimento das tilápias também depende muito do tipo de regime de crescimento que se escolhe para a sua produção. Em regimes de produção semi-intensiva, com fornecimento de alimentação natural e suplementar, a alimentação natural é responsável por 50 a 70% do crescimento. A alimentação natural fornece uma quantidade significativa de nutrientes essenciais ao crescimento do peixe. Em condições de produção intensiva, como em jaulas e tanques, com recurso a alimentos compostos, dietas comerciais de carpas e peixe-gato mostraram bons resultados de crescimento, desde que contenham os nutrientes essenciais (Henriques, 1998).

O baixo incremento de peso, assim como a redução da taxa de crescimento, registado nos passos P4-P3 e C4-C3, para as dietas RT e Mix, poderá dever-se ao direcionamento da energia metabólica para a maturação das gónadas dos juvenis de *Oreochromis mossambicus* em vez de para o seu crescimento. Pressupõem-se esta hipótese pela observação de ovos nas fêmeas quando se procedeu à filetagem dos indivíduos para a análise bioquímica. Como já foi referenciado anteriormente, se proporcionarem condições ótimas para o crescimento de *Oreochromis mossambicus*, como temperatura ótima e disponibilidade de alimento, podem surgir populações anãs que apresentam amadurecimento das gónadas e reprodução precoce aos 3 meses de idade (Lêveque, 2002). O que foi observado no presente trabalho corrobora a razão pela qual as aquaculturas optam por produzir populações de tilápias monossexuais ou por indivíduos híbridos que sejam estéreis ou deem origem ao nascimento de peixes apenas de um sexo (Bhujel, 2000; Devlin e Nagahama, 2002; Lévêque, 2002). No entanto, o mesmo decréscimo no crescimento e engorda dos indivíduos que foram alimentados com a dieta RD pode-se presumir que terá tido origem no surgimento das hemorragias que foram observadas nas várias partes do corpo dos peixes. De acordo com os sintomas apresentados (hemorragias nas barbatanas dorsal, peitorais, caudal e anal, na boca e nos opérculos) poderão ter surgido de algum agente patogénico ou de algum ingrediente da dieta RD que pudesse causar esta sintomatologia nos juvenis de *Oreochromis mossambicus*. As tilápias são mais resistentes a agentes patogénicos em comparação com outras espécies utilizadas em aquacultura. No entanto, se se encontram em *stress* devido a elevada densidade, temperaturas baixas ou salinidade elevada, tornam-se suscetíveis a agentes patogénicos mas são poucos os agentes infecciosos que são específicos para as tilápias (Henriques, 1998; Lucas e Southgate, 2003). Lucas e Southgate (2003) salientam que as tilápias são severamente afetadas por doenças provocadas por bactérias, nomeadamente, streptococcosis do género *Streptococcus* (*S. iniae*, *S. faecalis*, *S. facium*, *S. difficile* e *S. agalactia*). Streptococcosis normalmente surge a elevadas salinidades ou baixas temperaturas. A *Aeromonas* (*A. hydrophila*) também é muito comum em tilápias e ocorre em água doce de baixa qualidade e baixas temperaturas. Outras infeções bactericidas incluem a vibriose (*Vibrio* sp.), a edwardsiellosis (*Edwardsiella tarda*) e a columnaris (*Flavobacterium columnae*). Entre outras doenças virais (linfocistos e a infeção da necrose pancreática), fúngicas (*Saprolegnia parasitica*, um problema comum nas *hatcheries* que afetam os ovos e reduzem a taxa de eclosão) e parasitárias (protozoários: *Trichodina*, *Chilodonella*, *Apiosoma*, *Ambiphrya* e *Epistylis*; trematóides monogenéticos: *Dactylogyrus* e *Gyrodactylus*; crustáceos: *Lernaea*,

Ergasilus e *Argulus*). As deficiências alimentares também podem provocar alterações morfológicas, designadamente cataratas, deformações esqueléticas, aflatoxicoses, bem como uma maior sensibilidade a infeções e ataques de parasitas (Henriques, 1998). O uso de antibióticos é comumente usado no controlo de doenças em peixes, estimulação do sistema imunológico e promotores no crescimento. Contudo, é restrito o seu uso em alguns países devido à resistência adquirida pelas bactérias e os resíduos que podem ficar nos produtos aquáticos. Assim, tem sido dada muita atenção a produtos naturais, a fim de substituir os antibióticos em aquacultura. Uma possibilidade de produtos naturais são os óleos essenciais. Estes podem ser obtidos a partir de diversas matérias vegetais como flores, brotos, sementes, folhas e frutos (Acar *et al.*, 2015; Gabriel *et al.*, 2015). Alguns compostos bioativos estão presentes em plantas medicinais como *Acalypha indica*, *Phyllanthus niruri*, *Azadirachta indica*, *Piper bettle*, *Mentha piperita*, *Allium sativum* e *Astragalus membranaceus* (Gabriel *et al.*, 2015). Acar *et al.* (2015), num estudo feito com óleos essenciais de casca de laranja (*Citrus sinensis*) como suplemento numa dieta, verificaram que as características imunológicas, hematológicas e bioquímicas de Tilápia Moçambicana infetadas com *S. iniae*, aumentaram significativamente. Todos os tratamentos apresentaram uma elevada taxa de sobrevivência em comparação com a dieta controlo. Estes autores propuseram, de acordo com os seus resultados obtidos, que os óleos essenciais deste citrino poderiam aumentar o desempenho de crescimento e valorizar a resposta imune inata das tilápias. Também afirmaram que o tratamento com outros óleos essenciais aumentou a taxa de sobrevivência de peixes que se encontravam infetados: uma dieta com óleo de canela (*Cinnamomum verum*) fornecida a Tilápia-do-Nilo infetada com *S. iniae* reduziu a sua mortalidade; também foram relatados resultados semelhantes na Tilápia-do-Nilo infetada com *Lactococcus garviea* e tratada com óleo de cravo (*Syzygium aromaticum*). Gabriel *et al.* (2015) estudaram uma dieta para Tilápia-do-Nilo (GIFT) com extratos de *Aloe vera* e verificaram que teve efeitos positivos sobre o crescimento e o desempenho de resistência contra *S. iniae* em comparação com a dieta controlo.

Os melhores resultados obtidos nos parâmetros WG, SGR e FCR foram os da dieta Mix, onde se obtiveram os indivíduos com maior tamanho corporal e peso. De acordo com Daudpota *et al.* (2014), estes autores afirmaram que o desempenho do crescimento de juvenis de Tilápia-do-Nilo foi significativamente afetada pelo nível de proteína na dieta. WG e SGR dos peixes alimentados com dietas ricas em 35 e 40% de proteína foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que nos que foram alimentados com as dietas com 25 e 30% de

proteína. Com base no peso máximo ganho (1,0g para 5,8g), estimaram que o requerimento ótimo de proteína foi 35%. Acar *et al.* (2015), num estudo feito com dietas suplementadas com óleos essenciais de casca de laranja (OE1g, OE3g e OE5g de *Citrus sinensis*) para *Oreochromis mossambicus* obtiveram melhores resultados nos parâmetros WG, SGR e FCR em relação à dieta controlo. Todas as dietas tinham cerca de 40% de proteína. Os resultados indicaram que todos os grupos com OE tiveram um incremento de peso, com o melhor resultado a ser obtido na dieta OE1g. Como também já tinha sido referido as suas capacidades em valorizar a resposta imune inata das tilápias. Comparando os dados obtidos no parâmetro FCR com o teor de proteína das dietas em estudo (Tabelas V e VI), nota-se que com o aumento do teor de proteína encontrado nos músculos dos juvenis de Tilápia Moçambicana, há a diminuição dos outros parâmetros referidos. Este resultado encontra-se em concordância com resultados obtidos em outras espécies de tilápia feitos por vários autores (Daudpota *et al.*, 2014; Fasakin *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2014). A temperatura da água é um fator que influencia a digestibilidade dos alimentos nos peixes. Elevadas temperaturas contribuem para o aumento da ingestão alimentar e da utilização alimentar, assim, como, uma melhor eficiência na digestão e absorção ao nível dos intestinos (Qiang *et al.*, 2013). Estes autores verificaram no seu estudo com juvenis de Tilápia-do-Nilo GIFT, que a temperatura da água afeta significativamente o SGR, obtendo 2,01-2,38% dia⁻¹ a 27,5°C e 0,59% dia⁻¹ a 18°C.

É bem conhecido que o conteúdo proteico e lipídico são os componentes principais para avaliar a qualidade da carne do peixe (Daudpota *et al.*, 2014). Com base nos dados conseguidos no presente trabalho, repara-se que para as dietas Mix e RD com o aumento do teor de proteína no músculo o teor de lípidos diminuiu. Daudpota *et al.* (2014) obtiveram resultados opostos num estudo feito com a Tilápia-do-Nilo e propuseram que poderia ser devido à presença de uma elevada percentagem de hidratos de carbono e um baixo teor de proteínas na composição da dieta. O excesso de hidratos de carbono na dieta pode ser convertido em gordura corporal (Daudpota *et al.*, 2014; Ng e Romano, 2013). Isto aplica-se em peixes como o robalo, a tilápia, a carpa capim e os guppies. Os níveis de inclusão de lípidos na dieta são considerações importantes desde a sua deficiência ou o seu excesso que podem reduzir o crescimento ou produzir peixes excessivamente gordos, respetivamente (Ng e Romano, 2013). Isto parece justificar a razão pela qual a RT apresentou os valores mais elevados, pois no final do ensaio foi nesta dieta que se registaram os indivíduos mais pequenos. Não se observou a acumulação de gordura no músculo dos peixes mas, talvez, se

pudesse vir a constatar este resultado se os indivíduos fossem alimentados por mais tempo. Também se verificou uma relação entre a proteína e as cinzas, constatando-se que ambas são diretamente proporcionais, o aumento de uma levou ao aumento da outra. Segundo (Cnaani e Hulata, 2008), a humidade do corpo do peixe varia entre 69,2-74,6%; as proteínas 49,3-52,5%; os lípidos 34,3-37,1%; e as cinzas 11,0-12,5%, numa porção de 100g. Comparando as três dietas estudadas, a dieta Mix parece ser a mais indicada para o crescimento de juvenis de *Oreochromis mossambicus*. Contudo, economicamente talvez não seja a melhor opção por ser necessário fazer uma combinação de 50 – 50% das rações RT e RD. Seria importante fazer-se uma avaliação custo/Kg. Caso não seja economicamente rentável, a segunda melhor opção seria a RT, uma vez que a RD causou hemorragias nos peixes e uma maior taxa de mortalidade. A falta de informação dos ingredientes e composição química das dietas também dificulta a avaliação e a interpretação dos resultados finais. A carne de tilápia é branca e bastante delicada. Tem um sabor doce e suave quando cozida e é consideravelmente mais magra que o salmão de viveiro. Contém apenas 1g de gordura (0,4g de gorduras saturadas) em uma porção de 100g. O rendimento do filete de tilápia é de cerca de 40% do peso corporal total. A zona comestível da carcaça do macho e da fêmea de tilápia consiste, aproximadamente, em 53% e 51%, respetivamente (Cnaani e Hulata, 2008).

Como na maioria das espécies de peixes, as tilápias requerem uma elevada concentração de proteínas nas suas dietas enquanto são juvenis (Lucas e Southgate, 2003). As proteínas são compostas por aminoácidos e representam geralmente o ingrediente mais caro nas dietas para peixes. O requisito total de proteínas pode ser influenciado pela espécie, pela digestibilidade e perfil dos aminoácidos da fonte de proteína e o estágio de vida (Ng e Romano, 2013). As tilápias requerem os mesmos 10 aminoácidos essenciais como os outros peixes: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Halver e Hardy, 2002; Ng e Romano, 2013). De modo a maximizar o crescimento beneficiando das proteínas, e minimizando os custos, o conceito de proteína ideal é a utilização dos aminoácidos fornecidos nas dietas apresentarem-se na mesma proporção que é exigida pelo animal. As fontes de proteína mais comumente utilizadas nas dietas de peixes são a farinha de penas, farinha de ossos e subprodutos de pescas e animais terrestres (Ng e Romano, 2013). Subprodutos aquáticos como farinha de camarão, farinha de krill e farinha de lulas têm sido pouco avaliados como fontes parciais ou total de proteína para as tilápias. Farinha de camarão (com 50% de proteína bruta) pode ser utilizada em alevins de Tilápia Vermelha (*O. niloticus* X *O. hornorum*) e Tilápia-do-Nilo sem uma perda

significativa do WG e eficiência alimentar (El-Sayed, 1999). A farinha de peixe é considerada melhor fonte de proteína para a tilápia do que uma proteína vegetal. No entanto, muitas têm sido as tentativas de substituir parcial ou totalmente a proteína animal por outras fontes de origem vegetal como soja, sementes de algodão, sementes de girassol, sementes de colza bem como de subprodutos agroindustriais (Halver e Hardy, 2002; Henriques, 1998; Ng e Romano, 2013). A exigência do teor de proteína para as dietas de tilápia diminui com a idade e o tamanho, com elevadas concentrações de proteína bruta para as *fry* (30-56%) e juvenis (30-40%) mas níveis inferiores para os adultos (28-30%) (Mjoun *et al.*, 2010). Ng e Romano (2013) afirmam que, geralmente, as *fry* e as fêmeas em desova requerem uma exigência maior de proteínas (30-40%) e os alevins e juvenis cerca de 20-30% de proteína. Daudpota *et al* (2014), para a Tilápia-do-Nilo estabelecem um teor de proteína entre 32-50% para os juvenis e 25-30% para os adultos. Lucas e Southgate (2003) recomendam 40-45% de proteína para as *fry*, 25-30% para os juvenis e 25-35% para os reprodutores que requerem um pouco mais de proteína do que os restantes adultos.

Nas dietas para peixes, os lípidos são adicionados como uma fonte de energia altamente digerível e concentrada por ser componentes importantes para as membranas celulares, precursores de hormonas e ajudarem na absorção de vitaminas. Além disso, a qualidade da dieta é melhorada quando os *pellets* são revestidos com óleo, melhorando a palatabilidade e o aspeto aos olhos do peixe (Ng e Romano, 2013). Segundo Lucas e Southgate (2003), as tilápias parecem não utilizar eficazmente os lípidos como fonte de energia. Sugerem um valor máximo de lípidos nas dietas de tilápia entre 5 a 12%. Mjoun *et al.* (2010) propõem 5,2% de lípidos para as tilápias com 2,5g e um teor menor, 4,4%, para peixes com mais de 7,5g. Ng e Romano (2013) recomendam um requerimento mínimo e ótimo, 5% e 12% de lípidos, respetivamente, para os híbridos. Óleos vegetais, tais como óleo de milho e óleo de soja, são excelentes fontes de lípidos em comparação com as gorduras animais, incluindo o óleo de peixe (Lucas e Southgate, 2003).

Como já foi referido, *Oreochromis mossambicus* é uma espécie eurialina e tolera salinidades de 0 a 120%. Juvenis desta espécie apresentam melhor crescimento em águas salobras em comparação com águas com elevada ou baixa salinidade ou água doce (Webb e Maughan, 2007). Qiang *et al.* (2013), observaram que a salinidade afeta o crescimento e a utilização alimentar. A performance de crescimento em juvenis de Tilápia GIFT, a uma

temperatura de 27,5°C, foi melhor a salinidades entre 4 – 8‰, do que a salinidades > 8‰ ou < 4‰.

4.3 Anestésias

A anestesia é utilizada para tranquilizar peixes quando é necessário recorrer a procedimentos como pesagem e medição do comprimento dos indivíduos, injeção ou marcação com etiquetas, estudo da fisiologia e etologia, cicatrização de feridas, desova artificial, administração de vacinas e antibióticos, transporte de animais vivos e minimização de *stress* (Park *et al.*, 2008). Um anestésico ideal para peixes deve induzir a anestesia em menos de 3 a 5 minutos, com perda total de equilíbrio e firmeza muscular, permitindo uma recuperação rápida e sem intercorrências (ou seja, em menos de 10 minutos) (Tsantilas *et al.*, 2006).

De acordo com a gama de tempos de indução e recuperação ótimos para se considerar um anestésico ideal descritos por Neiffer e Stamper (2009), Park *et al.* (2008), Tsantilas *et al.* (2006), os três anestésicos estudados no presente trabalho mostraram-se dentro destas normas. Para os resultados obtidos para o anestésico MS-222 nota-se que com o aumento da concentração da anestesia, o tempo de indução nos juvenis de Tilápia Moçambicana diminuiu, tal, como os seus respetivos tempos de recuperação diminuíram. Contudo, na concentração 0,35ml L⁻¹ o tempo de recuperação foi bastante superior ao tempo de indução, tendo sido, também, o valor máximo registado nos tempos de recuperação. Considera-se que a concentração 0,25ml L⁻¹ é a dosagem ideal de MS-222 para anestésiar *Oreochromis mossambicus*. Chambel *et al.* (2013) testaram o MS-222 em quatro espécies de peixes ornamentais de água doce, Peixe-Zebra (*Danio rerio*), guppy (*Poecilia reticulata*), Peixe-Discus (*Symphysodon discus*) e o espada (*Xiphophorus helleri*). Verificaram para as diferentes espécies que com o aumento da concentração de MS-222 o tempo de indução de anestesia também diminuía. No entanto, os tempos de recuperação dependeram da espécie, por exemplo, para o Peixe-Discus o tempo de recuperação aumentou significativamente com o aumento da concentração do anestésico, enquanto para o Peixe-Zebra para as diferentes concentrações de MS-222 os tempos de recuperação foram semelhantes. Mitjana *et al.* (2014) estudaram MS-222 em juvenis de escalares (*Pterophyllum scalare*), em concentrações de 120, 140, 160 e 180 mgL⁻¹, e registaram a diminuição do tempo de indução

da anestesia nos peixes com o aumento das concentrações do anestésico mas os tempos de recuperação aumentaram, principalmente, para as concentrações 160 e 180 mgL⁻¹. O que foi observado pelos autores referidos anteriormente para os tempos de indução do anestésico MS-222 encontra-se em concordância com os resultados obtidos neste trabalho com os juvenis de Tilápia Moçambicana mas entram em conflito referentemente aos tempos de indução. Após a comparação das três concentrações estudadas, considera-se que a concentração 0,25ml L⁻¹ é a dosagem ideal de MS-222 para anestésiar juvenis de *Oreochromis mossambicus*. Mitjana *et al.* (2014) determinou 140mgL⁻¹ como a dosagem ótima para os juvenis de escalares e Chambel *et al.* (2013) estipularam as dosagens ótimas consoante as espécies: 75, 100 e 125mgL⁻¹ para o Peixe-Zebra; 125, 150 e 200mgL⁻¹ para o guppy; 75 e 100mgL⁻¹ para o Peixe-Discus; e 125 e 150mgL⁻¹ para o espada. As dosagens ideais variam consoante as espécies: 65mgL⁻¹ para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*); 80mgL⁻¹ para o alabote (*Hippoglossus hippoglossus*); e 60mgL⁻¹ para o bacalhau (*Gadus morhua*) (Sneddon, 2012).

Para o óleo de cravo viu-se que os tempos de indução diminuíram da concentração 0,10ml L⁻¹ para os 0,15ml L⁻¹. O tempo máximo registado foi nos 1,2ml L⁻¹. Em relação aos tempos de recuperação, aumentaram nas primeiras duas dosagens referenciadas e diminuiu para os 1,2ml L⁻¹. Isto encontra-se em concordância com os resultados obtidos por Park *et al.* (2008) que utilizou concentrações entre 50 - 300mgL⁻¹ a três temperaturas diferentes (18, 22 e 26°C) em juvenis de garoupa (*Epinephelus bruneus*). Estes autores encontraram relações significativas ($P < 0,05$) entre a temperatura da água, a concentração do anestésico, o tempo de anestesia e o de recuperação. Em cada temperatura da água, com o aumento da concentração do óleo de cravo, o tempo de anestesia diminuiu. O tempo de recuperação aumentou significativamente ($P < 0,05$) com o aumento da concentração do óleo de cravo mas, com o aumento da temperatura da água, o tempo de recuperação diminuiu significativamente ($P < 0,05$). As concentrações de anestesia ideais, que apresentaram tempo de anestesia dentro de 1 minuto e um rápido tempo de recuperação, para a garoupa foram 250 e 300mgL⁻¹ a 18°C, 150 e 200mgL⁻¹ a 22°C e 50 e 100mgL⁻¹ a 26°C. Mitjana *et al.* (2014) também testaram nos juvenis de escalares o anestésico óleo de cravo em concentrações de 20, 60, 80 e 100mgL⁻¹ e tanto para os tempos de indução como de recuperação, estes diminuíram com o aumento da concentração do anestésico. Tal como se sucedeu para o MS-222, os resultados destes autores estão em concordância com os do presente trabalho para o tempo de indução mas em desacordo para o tempo de recuperação.

Estes autores estabeleceram como dosagem ótima para o escalar 100mgL^{-1} de óleo de cravo. Assim, se determina que a melhor concentração de óleo de cravo para anestésiar juvenis de Tilápia Moçambicana é $0,10\text{ml L}^{-1}$. É um anestésico eficaz para a carpa (*Cyprinus carpio*) a $40\text{-}120\text{mgL}^{-1}$ e para a Truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em dosagens entre $40\text{-}60\text{mgL}^{-1}$ (Coyle *et al.*, 2004).

Em relação ao 2-fenoxietanol, verifica-se, comum aos anestésicos referidos anteriormente, que o tempo de indução diminui com o aumento da concentração do anestésico. Weber *et al.* (2009) que estudaram os mesmos anestésicos em juvenis de *Solea senegalensis* também observaram que, com todos os anestésicos, os tempos de indução diminuíram significativamente à medida que as doses eram aumentadas. O tempo de recuperação do 2-fenoxietanol é semelhante ao do óleo de cravo, que também aumentou com o aumento da sua concentração. Estes dados encontram-se em concordância com Mitjana *et al.* (2014) e Tsantilas *et al.* (2006) que estudaram o efeito do 2-fenoxietanol em indivíduos de 30 e 60g de *Diplodus sargus* e em indivíduos de 15 e 30g de *Diplodus puntazzo*. No entanto, os resultados obtidos nos tempos de recuperação com o 2-fenoxietanol por Weber *et al.* (2009) estão em discordância com os resultados alcançados no presente trabalho assim, como, com os autores referidos anteriormente. Weber *et al.* (2009) obtiveram uma diminuição dos tempos de recuperação com doses crescentes de 2-fenoxietanol. Tsantilas *et al.* (2006) afirmam que as concentrações eficazes deste anestésico para várias espécies de peixes variam entre $0,2$ a $0,6\text{ml L}^{-1}$. Estes autores estabeleceram $0,167\text{ml L}^{-1}$ como concentração mínima que produz efeitos anestésicos desejáveis para as duas espécies que estudaram, mas é preferível uma concentração de $0,2\text{ml L}^{-1}$ quando é necessário executar procedimentos mais dolorosos. No presente trabalho chegou-se à conclusão que as melhores concentrações de 2-fenoxietanol foram $0,80\text{ml L}^{-1}$ e $1,00\text{ml L}^{-1}$.

Comparando os tempos de indução e de recuperação das 4 concentrações estipuladas como melhores dosagens para os juvenis de *Oreochromis mossambicus*, destaca-se a dosagem $0,25\text{ml L}^{-1}$ de MS-222 ($0,44\text{min.}$ de indução; $0,30\text{ min.}$ de recuperação) como o melhor anestésico de entre os 3 anestésicos estudados. Gholipour kanani *et al.* (2013) que avaliaram óleo de cravo, MS-222 e anestesia elétrica em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) verificaram que o MS-222 foi mais eficaz do que o óleo de cravo, estando em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho. Mas de entre os três métodos de anestesia, foi a anestesia-elétrica que induziu um efeito mais rápido sobre os peixes assim

como a sua recuperação. Contudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os tempos de indução e recuperação dos anestésicos. No geral, obteve-se uma dependência entre a dose e o tempo de indução dos três anestésicos: quando se aumenta a dosagem dos anestésicos, os tempos de indução diminuíram, com exceção dos 1,2ml L⁻¹ de óleo de cravo. Isto já tinha sido observado por outros autores (Grush *et al.*, 2004; Mitjana *et al.*, 2014; Tsantilas *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2009). Mas esta dependência para o tempo de recuperação apenas se verificou com o MS-222 e Weber *et al.* (2009) propõem uma possível explicação: a utilização de dosagens mais elevadas expõe os animais em contacto com o anestésico por menos tempo, o que permitirá uma recuperação mais rápida. Uma variedade de fatores, incluindo espécie, tamanho e peso corporal, área de superfície branquial em relação à biomassa, teor de lípidos, sexo, maturação sexual, condição física, estado de saúde e densidade do *stock*, assim como a temperatura, pH, salinidade, conteúdo mineral e oxigénio podem afetar o processo de anestesia em peixes (Tsantilas *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2010).

O tratamento com anestésias em concentrações excessivas é muito stressante para os peixes, causando uma taxa metabólica anormal, o aumento do consumo de oxigénio, aumento da pressão arterial e respostas fisiológicas no sangue. Além disso, estes efeitos colaterais podem durar horas após os peixes recuperarem da anestesia. Concentrações anestésicas ótimas podem minimizar o impacto negativo e, assim, reduzir o *stress* nos peixes (Park *et al.*, 2008). Neiffer e Stamper (2009) sugerem as seguintes dosagens ótimas para ciclídeos: para o anestésico MS-222, 60mgL⁻¹ para manutenção e 150mgL⁻¹ para indução da anestesia; e para o 2-fenoxietanol, 600mgL⁻¹. Para o caso do óleo de cravo não apresentam dosagens ótimas para os ciclídeos, mas sugerem para os peixes em geral uma variação entre 20-100 mgL⁻¹. Coyle *et al.* (2004) apresentam dosagens especificamente para a Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): MS-222 deve encontrar-se entre 100-200mgL⁻¹ mas acrescentam que não deve ultrapassar os 250mgL⁻¹ para peixes de águas quentes; para o 2-fenoxietanol as dosagens deverão concentrar-se entre os 400-600mgL⁻¹; para o óleo de cravo não referiram qualquer dosagem. E sugeriram mais dois anestésicos, benzocaína e quinaldina, 25-100mgL⁻¹ e 25-50mgL⁻¹, respetivamente.

Para se escolher o anestésico mais apropriado para peixes, vários fatores importantes devem de ser considerados: indução e recuperação rápidas, baixa toxicidade (para o peixe, os usuários e o ambiente), baixos níveis de resíduos nos tecidos, facilidade no uso,

disponibilidade e tipos de procedimentos laborais e baixo custo (Chambel *et al.*, 2013; Mitjana *et al.*, 2014; Tsantilas *et al.*, 2006). Tal como qualquer produto, existem vantagens e desvantagens, que o classificam como bom ou mau e auxiliam na escolha por parte do consumidor. O MS-222 é descrito como um anestésico eficaz e seguro em várias espécies assim como em juvenis. É excretado pela urina do peixe dentro de 24h os níveis nos tecidos diminui quase para zero dentro do mesmo espaço de tempo. O MS-222 é 250 vezes mais solúvel em água do que o seu análogo, benzocaína, sendo fácil de manusear. No entanto, as desvantagens são o seu preço elevado, alguns efeitos negativos, como efeito imuno-depressivo, hipoxia, hiperglicemia, incremento dos níveis de lactose no sangue, afeta a função cardíaca em peixes-zebra. Provoca toxicidade na retina dos usuários após a exposição crónica sem luvas (Coyle *et al.*, 2004; Mitjana *et al.*, 2014; Ortuño *et al.*, 2002). O óleo de cravo é um anestésico de baixo custo, baixa toxicidade nos peixes e no ambiente, tem poucas reações adversas (fotossensibilidade em peixes e anfíbios), rápida indução em comparação com outros anestésicos. O principal componente do óleo de cravo é o eugenol e é considerado como seguro para os humanos por ser utilizado como um aditivo nos alimentos e usado como analgésico e desinfetante nos dentistas. Mas apresenta um efeito acumulativo nos tecidos de algumas espécies, como escalares (*Pterophyllum scalare*), dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*), devido à sua natureza lipofílica (Mitjana *et al.*, 2014; Neiffer e Stamper, 2009; Park *et al.*, 2008). Por fim, o 2-fenoxietanol apresenta tempos de indução e de recuperação rápidos, baixo preço, fácil preparação e não altera o pH da água salgada. É recomendado por alguns autores como o anestésico ideal para juvenis de espécies como *Sparus sarba* ou *S. senegalensis*. Mas apresenta como desvantagens fraca capacidade analgésica, estreita margem de segurança, irritante para as mucosas, diminui o pH do sangue, aumenta os níveis de adrenalina e glicose, é um imuno-depressivo, diminui a taxa cardíaca e a pressão arterial e provoca depressão respiratória. Além disso, foi relatado que uma exposição prolongada e regular por parte dos usuários pode provocar uma síndrome neuropsicológica (Mitjana *et al.*, 2014; Neiffer e Stamper, 2009; Ortuño *et al.*, 2002). Uma alternativa interessante às anestésias químicas é o uso de energia elétrica. A eletro-anestesia é, principalmente, utilizada para mobilizar peixes adultos para etiquetagem de *stocks* ou em reprodutores. Existem três tipos de corrente elétrica para imobilizar os peixes: a corrente alternada, a corrente direta e formas pulsantes entre as duas correntes referidas anteriormente, em ondas senoidais, triangulares e quadradas. As principais vantagens deste tipo de anestesia é que não são utilizados produtos químicos, não deixa resíduos nos peixes

nem no ambiente, rápida indução e recuperação e apresenta baixos custos operacionais (Gholipour kanani *et al.*, 2013).

5. CONCLUSÕES

Assim, no final do presente estudo, conclui-se que *Oreochromis mossambicus* é uma espécie que se reproduz facilmente, quando em condições favoráveis, sendo a temperatura um dos fatores mais importantes. Os machos mostraram o seu comportamento agonístico e a presença de um substrato é essencial para que ocorram a construção de *leks* e a determinação de um território. A proporção sexual ideal é 1:3 (macho:fêmea). As fêmeas incubam os seus ovos na boca por um período, aproximadamente, de 20 dias e o tamanho e peso das fêmeas são determinantes na dimensão das posturas. As *fry* de *Oreochromis mossambicus* têm uma elevada taxa de sobrevivência por as progenitoras terem a capacidade de incubar as suas ninhadas na boca, protegendo-as de eventuais predadores ou outros perigos. Nas indústrias de aquacultura são preferidos peixes estéreis ou grupos monossexuais por direcionarem a sua energia somática no crescimento, dando filetes de peixe muito maiores.

Para a parte referente às três dietas estudadas, conclui-se que a dieta Mix presenteou juvenis de Tilápia Moçambicana com um melhor crescimento e biomassa corporal, assim, como se obtiveram melhores resultados no WG, SGR e FCR. Contudo, seria essencial avaliar o seu custo e determinar-se se economicamente é rentável. A dieta RD mostrou-se desadequada para esta espécie devido causar hemorragias corporais.

Por fim, conclui-se que o anestésico mais eficaz para anestésiar juvenis de *Oreochromis mossambicus* é o MS-222 na concentração 0,25ml L⁻¹. Contudo, seria essencial realizar mais estudos com anestésicos para esta espécie.

PERSPETIVAS FUTURAS

Relativamente à maturação dos indivíduos de *Oreochromis mossambicus* existem muitos poucos dados, pelo que seria interessante estudar mais pormenorizadamente a maturação das gónadas e identificar os diferentes estágios de maturação. Assim, como seria interessante fazer a fertilização e incubação *in vitro* de ovos desta espécie e registrar em imagens o processo de embriogénese até ao estágio *fry* com o saco vitelino totalmente reabsorvido.

Para as dietas que foram selecionadas para a concretização deste trabalho seria interessante testar estas mesmas dietas mas com o acrescento de se sujeitarem os indivíduos a salinidades distintas, como salinidades a 0, 10, 20, 35 e 50‰, e registrar-se a influência das salinidades sobre o crescimento dos juvenis de Tilápia Moçambicana. Assim, como se poderia acrescentar outro fator importante, a temperatura. Uma vez que as tilápias são peixes que têm uma alimentação tão diversificada, poder-se-ia testar rações como de cão, gato, carpa, salmão e registarem-se com os efeitos sobre esta espécie.

Finalizando com os anestésicos, deveriam de ser testadas mais concentrações para os três anestésicos que foram estudados, assim como outros que são utilizados em aquacultura, e estabelecerem as concentrações mínimas, ótimas e letais de indução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yilmaz, S., Gültepe, N., Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*. 437: 282 – 286.
- Amorim, M.C.P.A., Fonseca, P.J., Almada, V.C. (2003). Sound production during courtship and spawning of *Oreochromis mossambicus*: male – female and male – male interactions. *Journal of Fish Biology*. 62: 658 – 672.
- Bhujel, R.C. (2000). A review of strategies for the management of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodfish in seed production systems, especially hapa-based systems. *Aquaculture*. 181: 37 – 59.
- Breves, J.P., Seale, A.P., Moorman, B.P., Lerner, D.T., Moriyama, S., Hopkins, K.D., Grau, E.G. (2014). Pituitary control of branchial NCC, NKCC and Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Comp. Physiol. B*. 184: 513 – 523.
- Canonico, G.C., Arthington, A., McCary, J.K., Thieme, M.L. (2005). The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosystm*. 15: 463 – 483.
- Chambel, J., Pinho, R., Sousa, R., Ferreira, T., Baptista, T., Severiano, V., Mendes, S., Pedrosa, R. (2013). The efficacy of MS-222 as anaesthetic agente in four freshwater aquarium fish species. *Aquaculture Research*. pp. 1 – 8.
- Cnaani, A. e Hulata, G. (2008). Genome Mapping and Genomics in Animals, Chapter 4, Volume 2 in: Kocher, T.D. e Kole, C. (2008). Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals. *Springer-Verlag*. Berlin, Heidelberg. pp. 101 – 116.
- Coyle, S.D., Durborow, R.M., Tidwell, J.H. (2004). Anesthetics in Aquaculture. *Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication*, No. 3900.

- Coward, K. e Bromage, N.R. (1999). Spawning periodicity, fecundity and egg size in laboratory-held stocks of a substrate-spawning tilapiine, *Tilapia zillii* (Gervais). *Aquaculture*. 171: 251 – 267.
- Davis, L.K., Bradley, K.F., Lim, C., Lerner, D.T., Hirano, T., Grau, E.G. (2010). Effects of 11-ketotestosterone and fishmeal in the feed on growth of juvenil tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*. 305: 143 – 149.
- Daupota, A.M., Siddiqui, P.J.A., Abbas, G., Narejo, N.T., Shah, S.S.A., Khan, N., Dastagir, G. (2014). Effect of Dietary Protein Level on Growth Performance, Protein Utilization and Body Composition of Nile Tilapia Cultured in Low Salinity Water. *International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies*. Vol. 2, No. 2, 135 – 147.
- Devlin, R.H. e Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish:an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191 – 364.
- El-Sayed, A-F.M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture*. 179: 149 – 168.
- Fasakin, E.A., Serwata, R.D., Davies, S.J. (2005). Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mossambicus*) diets. *Aquaculture*. 249: 329 – 338.
- Gabriel, N.N., Qiang, J., He, J., Ma, X.Y., Kpundeh, M.D., Xu, P. (2015). Dietary *Aloe vera* supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish & Shellfish Immunology*. Acedido em 13 de Março de 2015: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>.
- Galhardo, L., Correia, J., Oliveira, RF. (2008). The effect of substrate availability on behavioural and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*). *Animal Welfare*. 17: xxx-xxx.

- Gholipour kanani, H., Soltani, M., Mirzargar, S.S. (2013). Effect of tricainemethanesulfonate (MS222), clove oil and electro-anaesthesia respiratory burst activity in whole blood and resum alternative complemente response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), during the narcosis stage. *Fish & Shellfish Immunology*. 34: 692 – 696.
- Greiner, R. e Gregg, D. (2008). Tilapia in north Queensland waterways: Risks and potential economic impacts. *Australian Centre for Tropical Freshwater Research*. James Cook University. Townsville. pp. 4.
- Grush, J., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D. (2004). The Efficacy of Clove Oil As An Anesthetic for the Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*. 1: 46 – 53.
- Halver, J.E. e Hardy, R.W. (2002). Fish Nutrition – Third Edition. *Academic Press*. California, USA. pp. 732 – 737.
- Henriques, M.A.R. (1998). Manual de Aquacultura – ostras, amêijoas, camarão, truta, salmão, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado. *Marca-Artes Gráficas*. Porto, Portugal. pp. 13 – 27.
- Huertas, M., Almeida, O.G., Canário, A.V.M., Hubbard, P.C. (2014). Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *General and Comparative Endocrinology*. 196: 106 – 111.
- Kolanczyk, R.C., Fitzsimmons, P.N., McKim, J.M., Sr, Erickson, R.J., Schmieder, P.K. (2003). Effects of anesthesia (tricaine methanesulfonate, MS222) on liver biotransformation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 64: 177 – 184.
- Korzan, W.J., Robison, R.R., Zhao, S., Fernald, R.D. (2008). Color change as a potential behavioral strategy. *Hormones and Behavior*. 54: 463 – 470.
- Lèveque, C. (2002). Out of Africa: the sucess story of tilapias. *Environmental Biology of Fishes*. 64: 461 – 464.

- Liang, J.Y. e Chien, Y.H. (2013). Effects of feeding frequency and photoperiod on water quality and crop production in a tilapia – water spinach raft aquaponics system. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 85: 693 – 700.
- Lucas, J.S. e Southgate, P.C. (2003). Aquaculture – Farming Aquatic Animals and Plants. *Fishing News Books, Blackwell Publishing*. Iowa, USA. pp. 328.
- Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., Li, L., Tan, H. (2014). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture*. 422 – 423: 1 – 7.
- Middleton, T.F., Ferket, P.R., Boyd, L.C., Daniels, H.V., Gallagher, M.L. (2001). An evaluation of co-extruded poultry silage and culled jewel sweet potatoes as a feed ingredient for hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. mossambicus*). *Aquaculture*. 198: 269 – 280.
- Mitjana, O., Bonastre, C., Insua, D., Falceto, M.V., Esteban, J., Josa, A., Espinosa, E. (2014). The efficacy and effect of repeated exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil and tricaine methanesulphonate as anesthetic agents on juvenile Angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Aquaculture*. 433: 491 – 495.
- Mjoun, K., Rosentrater, K.A., Brown, M.L. (2010). TILAPIA: Environmental Biology and Nutritional Requirements. *South Dakota Cooperative Extension Service*. South Dakota, Estados Unidos da América. pp. 2.
- Neiffer, D.L. e Stamper, M.A. (2009). Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *ILAR Journal*. Vol. 50, No. 4. pp. 343 – 360.
- Oliveira, R.F.N.P. (1995). Etologia Social e Endocrinologia Comportamental da Tilápia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae) – Dissertação de tese de Doutorado. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*. Lisboa, Portugal. pp. 23.

- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1995). Sexual dimorphism and allometry of external morphology in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*. 46: 1055 – 1064.
- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1998a). Androgenization of Dominant Males in a Cichlid Fish: Androgens Mediate the Social Modulation of Sexually Dimorphic Traits. *Ethology*. 104: 841 – 858.
- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1998b). Dynamics of social interactions during group formation in males of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Acta Ethologica*. Vol.1 (1-2), pp. 57 – 70.
- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1998c). Maternal Aggression During the Mouthbrooding Cycle in the Cichlid Fish, *Oreochromis mossambicus*. *Aggressive Behavior*. 24: 187 – 196.
- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1998d). Mating tactics and male – male courtship in the lek-breeding cichlid *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*. 52: 1115 – 1129.
- Oliveira, R.F. e Almada, V.C. (1999). Male display characters, gonadal maturation and androgens in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Acta Ethol.* 2: 67 – 70.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 12: 49 – 59.
- Pandit, N.P., Bhandari, R.K., Kobayashi, Y., Nakamura, M. (2015). High temperature-induced sterility in the female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *General and Comparative Endocrinology*. Acedido em 9 de Março de 2015: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.028>
- Pandiyan, P., Balaraman, D., Thirunavukkarasu, R., George, W.G.J., Subaramaniyan, K., Manikkam, S., Sadayappan, B. (2013). Probiotics in aquaculture. Review Article. *Drug Invention Today*. 5: 55 – 59.
- Park, M.O., Hur, W.J., Im, S.Y., Seol, D.W., Lee, J., Park, I.S. (2008). Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquaculture Research*. 39: 877 – 884.

- Pullin, R.S.V. e Lowe-McConnell, R.H. (1982). *The Biology and Culture of Tilapias*. ICLARM. Manila, Philippines.
- Qiang, J., Wang, H., Kpundeh, M.D., He, J., Xu, P. (2013). Effect of water temperature, salinity, and their interaction on growth, plasma osmolality, and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in juvenile GIFT tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of Thermal Biology*. 38: 331 – 338.
- Reardon, E.E. e Chapman, L.J. (2008). Reproductive seasonality in a swamp-locked African cichlid. *Ecology of Freshwater Fish*. 17: 20 – 29..
- Russell, D.J., Thuesen, P.A., Small, F.E. (2010). Tilapia in Australia – Development of management strategies for the control and eradication of feral tilapia populations in Australia. PESTSMART. *Invasive Animals Cooperative Research Centre*. Cairns, Queensland. pp. 3.
- Russell, D.J., Thuesen, P.A., Thomson, F.E. (2012). A review of the biology, ecology, distribution and control of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters 1852) (Pisces: Cichlidae) with particular emphasis on invasive Australian populations. *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 22: 533 – 554.
- Seale, A.P., Stagg, J.J., Yamaguchi, Y., Breves, J.P., Soma, S., Watanabe, S., Kaneko, T., Cnaani, A., Harpaz, S., Lerner, D.T., Grau, E.G. (2014). Effects of salinity and prolactin on gene transcript levels of ion transporters, ion pumps and prolactin receptors in Mozambique tilapia intestine. *Genral and Comparative Endocrinology*. 206: 146 – 154.
- Sköld, H.N., Amundsen, T., Svensson, P.A., Mayer, I., Bjelvenmark, J., Forsgren, E. (2008). Hormonal regulation of female nuptial coloration in a fish. *Hormones and Behavior*. 549 – 556.
- Sneddon, L.U. (2012). Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 21: 32 – 43.
- Toufique, K.A. e Belton, B. (2014). Is Aquaculture Pro-Poo? Empirical Evidence of Impacts on Fish Consumption in Bangladesh. *World Development*. Vol. 64, pp. 609 – 620.

- Tsantilas, H., Galatos, A.D., Athanassopoulou, F., Prassinou, N.N., Kousoulaki, K. (2006). Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture*. 253: 64 – 70.
- Vera, L.M., Ros-Sánchez, G., García-Mateos, G., Sánchez-Vázquez, F.J. (2010). MS-222 toxicity in juvenile seabream correlates with diurnal activity, as measured by a novel video-tracking method. *Aquaculture*. 307: 29 – 34..
- Webb, A. e Maughan, M. (2007). Pest Fish Profiles: *Oreochromis mossambicus* – Mozambique tilapia. *ACTFR*. James Cook Iniversity. Townsville.
- Weber, R.A., Peleteiro, J.B., Martín, L.O.G., Aldegunde, M. (2009). The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*. 288: 147 – 150.