

Efeitos do oxigênio dissolvido e densidade  
no cultivo de dourada (*Sparus aurata*)

Ravi Luna Araújo

Tese de Mestrado em Biologia Marinha

**Mestrado em Biologia Marinha**

**ORIENTADOR(ES):** Prof. Dr. Rui Cabral e Silva

Investigador: Dr. Pedro Pousão Ferreira

2014

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**



Efeitos do oxigênio dissolvido e densidade  
no cultivo de dourada (*Sparus aurata*)

Ravi Luna Araújo

Tese de Mestrado em Biologia Marinha

**Mestrado em Biologia Marinha**

**ORIENTADOR(ES):** Prof. Dr. Rui Cabral e Silva

Investigador: Dr. Pedro Pousão Ferreira

2014

**Título:** *Efeitos do oxigênio dissolvido e densidade no cultivo de dourada (Sparus aurata)*

**Autor:** Ravi Luna Araújo

**Orientação científica do trabalho:** Prof. Dr. Rui Cabral e Silva

Investigador: Dr. Pedro Pousão Ferreira

**Contacto do autor:** rasiluna@hotmail.com

**Local:** Faro

**Ano:** 2014

**“Copyright” – Ravi Luna Araújo, nº 44374, UAlg, FCT**

*A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o 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.*

**O conteúdo desta dissertação de mestrado é da exclusiva responsabilidade deste autor**

---

(Ravi Luna Araújo)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a DEUS, por toda força e paz que ele me proporciona nos momentos essenciais da minha vida e principalmente nesta jornada de 3 anos longe das pessoas que amo.

Preciso também agradecer a minha família que mesmo longe, sempre se fez presente e sempre me auxiliou de todas as formas possíveis para que eu pudesse ter este crescimento profissional e pessoal. Nomeadamente, agradeço ao meu pai Fernando Barros e a minha mãe Maria das Mercês, por todos os valores que hoje tenho e devo a eles. Agradeço aos meus irmãos, Camilla Luna e Fernando Netto que me apoiaram nesta nova vida longe da família e sempre me deram o suporte que precisei.

Agradeço de forma especial ao Professor Investigador Dr. Pedro Pousão que me deu a oportunidade de estagiar no IPMA, onde tenho aprendido muito e tenho muito para aprender. Obrigado pela atenção que sempre teve comigo e pela confiança que depositou em mim.

Ao Prof. Dr. Rui Cabral e Silva por aceitar ser meu orientador e ter disponibilidade sempre que preciso para me atender e constantemente num tom muito cordial.

À Professora Laura Ribeiro pela atenção e dedicação em me auxiliar e guiar nos ensaios deste mestrado. Agradeço também a Professora Florbela Soares pela disponibilidade nos trabalhos dos ensaios. Agradeço a todos os funcionários do IPMA – EPPO e Sede. Ressaltando os mais próximos como Marisa Barata que sempre me apoiou no estágio e ensaio de uma forma muito atenciosa e responsável. Iguais agradecimentos aos demais funcionários que convivi todo tempo de estágio como: Joana Alves que dividiu parte dos trabalhos dos ensaios comigo e Hugo Ferreira sempre disposto a ajudar nos trabalhos realizados.

Agradecimento a Ana Carneiro por estar sempre disposta na manutenção e melhorias do sistema Sinergia®.



## RESUMO

O sucesso de uma aquicultura depende de um ambiente controlado para um rápido crescimento dos organismos, com o mínimo de custo possível. O crescimento e bem estar dos organismos em uma cultura são afetados por parâmetros físicos, biológicos e químicos. Entre esses fatores pode-se destacar como críticos: densidade, pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido (OD) e nutrientes (nitrogênio, fósforo e etc). A relação entre a densidade de peixes e nível de oxigênio ótimos são ferramentas essenciais para desenhar a performance de cada espécie. Além disto é necessário obter mais conhecimento no aspecto de estresse e as respostas fisiológicas. Este trabalho foi realizado através de 2 ensaios, sendo o primeiro com diferentes densidades de dourada ( $5\text{kg}/\text{m}^3$ ,  $10\text{kg}/\text{m}^3$  e  $20\text{kg}/\text{m}^3$ ), durante 60 dias ( $326,2\text{g} \pm 0,85$ ). E o segundo com diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%), durante 30 dias ( $316,3\text{g} \pm 1,73$ ). Foram analisados parâmetros de crescimento e fisiologia, além da verificação da qualidade da água em ambos experimentos. Nos resultados obtidos para o primeiro experimento destaca-se uma melhor tendência nas taxas de crescimento para o tratamento  $10\text{kg}/\text{m}^3$ . Para o segundo ensaio existem relações significativas entre a taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar com o oxigênio dissolvido. Também verificou-se significativamente adaptações em relação ao hematócrito, aumentando com a diminuição dos níveis de oxigênio.

Palavras chave: *Sparus aurata*. performance e stress.

## ABSTRACT

Aquaculture's success highly depends on a controlled rapid growth of organisms with minimal costs associated. Growth and welfare of reared organisms are affected by physical, chemical and biological parameters. Following factors can be highlighted as crucial: density, pH, salinity, temperature, dissolved oxygen (DO) and nutrients (nitrogen, phosphorus, etc.) Relationship between fish density and oxygen's optimum levels is essential for designing the performance of each species. Furthermore it is also necessary to study fish stress factors and physiological responses. Two rearing experiments with gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) were performed, in order to test different densities (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> and 20kg/m<sup>3</sup>) for 60 days ( $326.2 \pm 0.85$  g) and to test different levels of oxygen (40-60%, 60-80% and 80-100%) for 30 days ( $316.3 \pm 1.73$  g). In both experiments, physiology and growth parameters were analyzed, as well as water quality. Data of the first experiment suggests a better result for growth rates obtained by the 10kg/m<sup>3</sup> treatment while for the second experiment there seems to be significant values considering the specific growth rate and the feed conversion ratio with dissolved oxygen. There were also significant adjustments in the hematocrit, which increased when dissolved oxygen levels dropped.

Keywords: *Sparus aurata*, performance and stress.

## **INDICE**

1. Introdução .....	1
1.1 Estresse e respostas fisiológicas.....	4
1.2 Oxigênio Dissolvido (OD).....	6
1.2.1 Efeitos da variação do oxigênio dissolvido .....	8
1.2.1.1 Baixos níveis de oxigênio (Hipóxia).....	9
1.2.1.2 Altos níveis de oxigênio (Hiperóxia).....	11
2. Materiais e métodos.....	12
2.1 Desenho experimental Ensaio 1: Diferentes densidades de dourada.....	12
2.2 Desenho experimental Ensaio 2: Diferentes níveis de oxigênio.....	14
2.3 Componente analítica.....	15
2.3.1 Parâmetros zootécnicos.....	15
2.3.2 Qualidade da água.....	15
2.3.3 Coleta de sangue.....	16
2.3.4 Análises hematológicas.....	16
2.3.5 Parâmetros plasmáticos.....	16
2.3.6 Histologia da brânquia.....	17
2.3.7 Análise estatística .....	17
3. Resultados.....	18
3.1 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m <sup>3</sup> , 10kg/m <sup>3</sup> e 20kg/m <sup>3</sup> ).....	18
3.1.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água.....	18
3.1.2 Parâmetros Zootécnicos.....	23
3.1.3 Qualidade da água.....	25
3.1.4 Análises sanguíneas.....	27
3.1.5 Parâmetros plasmáticos.....	29
3.1.6 Histologia: brânquia.....	31
3.2 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%).....	32
3.2.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água.....	32
3.2.2 Parâmetros Zootécnicos.....	33
3.2.3 Qualidade da água.....	35
3.2.4 Análises sanguíneas.....	36
3.2.5 Parâmetros plasmáticos.....	38
3.2.6 Histologia: brânquia.....	41

4.	Discussão.....	42
4.1	Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m <sup>3</sup> , 10kg/m <sup>3</sup> e 20kg/m <sup>3</sup> ).....	42
4.1.1	Taxas de crescimento.....	42
4.1.2	Parâmetros sanguíneos.....	43
4.1.3	Histologia: brânquia.....	44
4.2	Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%).....	44
4.1.1	Taxas de crescimento.....	44
4.1.2	Parâmetros sanguíneos.....	45
4.1.3	Histologia: brânquia.....	46
5.	Conclusão.....	47
6.	Referências bibliográficas.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Morfologia do <i>Sparus aurata</i> .....	3
Fig. 2 - Percepção do estresse e respostas primária, secundária e terciária.....	5
Fig. 3 - Respostas fisiológicas ao estresse durante o tempo.....	6
Fig. 4 - Variação do oxigênio em aquicultura com influência de sistema aberto.....	7
Fig. 5 - Variação da solubilidade do oxigênio em água em relação à temperatura e salinidade.....	7
Fig. 6 - Efeito do nível de oxigênio no crescimento, taxa de conversão e mortalidade.....	9
Fig. 7 - Dependência da atividade animal em relação com a concentração de oxigênio.....	10
Fig. 8 - Tanque de fibra de vidro com 1,5m <sup>3</sup> em sistema aberto de circulação de água.....	12
Fig. 9 - Sistema de Synergia <sup>®</sup> .....	13
Fig. 10 - Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 60 dias de ensaio, em diferentes densidades de dourada.....	19
Fig. 11 - Variação de oxigênio e temperatura durante 24 horas no dia mais frio (A) e mais quente, (B) do experimento com diferentes densidades de douradas.....	19
Fig. 12 - Frequência da concentração do oxigênio dissolvido nos tanques de diferentes densidades de dourada, num período de 60 dias.....	20
Fig. 13 - Percentagem de ativação do sistema de injeção de oxigênio, acionado quando os níveis de oxigênio dissolvido encontravam-se no limite (35%).....	22
Fig. 14 - Variação do oxigênio dissolvido e temperatura, durante os procedimentos cotidianos (alimentação e limpeza dos filtros), nas diferentes densidades de douradas .....	23
Fig. 15 - Média da taxa de crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades, num período de 60 dias.....	25
Fig. 16 - Variação da amônia total nos tanques de diferentes densidades de dourada, num período de 60 dias.....	26
Fig. 17 - Variação da amônia não ionizada, nos tanques de diferentes densidades de dourada, num período de 60 dias.....	26

Fig. 18 - Valores de hematócrito em sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades), após 60 dias.....	27
Fig. 19 - Valores de cortisol no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades, amostragem inicial, intermediária e final.....	29
Fig. 20 - Valores de glicose no plasma de douradas cultivadas em diferentes, amostragem inicial, intermediária e final.....	29
Fig. 21 - Valores de lactato no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades, amostragem inicial, intermediária e final.....	30
Fig. 22 - Valores de proteína do plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades, amostragem inicial, intermediária e final.....	30
Fig. 23 - Histologia (H&E) das brânquias de dourada em diferentes tratamentos de densidade.....	31
Fig. 24 - Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 30 dias de ensaio, em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%).....	32
Fig. 25 - Relação da taxa de crescimento com o oxigênio dissolvido. (B) Relação do TCA com o oxigênio dissolvido. Experimento com douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), durante 30 dias.....	34
Fig. 26 - Variação da amônia total nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.....	35
Fig. 27 - Variação da amônia não ionizada nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.....	36
Fig. 28 - Valores de hematócrito em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.....	37
Fig. 29 - Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), após 30 dias.....	38
Fig. 30 - Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.....	38

Fig. 31 - Valores de glicose em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.....39

Fig. 32 - Valores de lactato em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.....39

Fig. 33 - Valores de proteína do plasma em douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.....40

Fig. 33 - Histologia (H&E) das brânquias de douradas em diferentes tratamentos. Tratamentos: (1 – 2) 40-60%, (3 – 4) 60-80% e (5 – 6) 80-100%.....41

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Produção e utilização mundial de pesca e aquicultura.....1

Tabela 2 - Distribuição das densidades e os códigos dos tanques.....18

Tabela 3 - Perfil do crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias de experimento. ....24

Tabela 4 - Relação entre oxigênio dissolvido e a amônia nos tanques de diferentes densidades.....27

Tabela 5 - Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias.....28

Tabela 6 - Distribuição das concentrações de oxigênio e os códigos dos tanques. ....32

Tabela 7 - Perfil da dourada em diferentes níveis de oxigênio após 30 dias de experimento.....33

Tabela 8 - TCA baseado na média das concentrações de oxigênio dissolvido, por tanque de diferentes tratamentos.....35

Tabela 9 - Relação entre oxigênio dissolvido e amônia total nos diferentes tratamentos.....36

Tabela 10 - Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio, após 30 dias.....37

## **1. INTRODUÇÃO**

Aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, répteis, batráquios, equinodermos, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas. Existem várias vertentes deste tipo de cultivo: produção de alimentos, iscas para pesca, pesca esportiva e aquarofilia. A conservação também é uma importante abordagem da aquicultura, através do repovoamento de espécies em estado crítico e cultivos de subsistência com sustentabilidade de pequenas comunidades (FAO, 2007).

Por muito tempo no Mediterrâneo, a criação de peixes marinhos foi exclusivamente para consumo local, baseado na captura de juvenis selvagens do mar, aproveitando a migração trófica natural para lagoas costeiras à procura de refúgio e alimento. Com o aperfeiçoamento dos alimentos artificiais (estabilidade na água e composição nutricional) e o melhoramento das técnicas de arejamento artificial, a aquicultura desenvolveu-se mundialmente (Moretti et al., 1999; Landau, 1992; White et al., 2004).

A produção atual da aquicultura marinha (18,3 milhões de toneladas) é composta de moluscos (75,5%, 13,9 milhões de toneladas), peixes (18,7%, 3,4 milhões de toneladas), crustáceos (3,8%) e outros animais aquáticos (2,1 %) como: pepinos e ouriços do mar (FAO, 2011). Nos últimos anos foi destacada a importância dos nutrientes essenciais e proteínas presentes nos peixes e derivados.

Em 2009, os peixes representaram 16,6% do consumo da população mundial de proteína animal e 6,5% de todas as proteínas. O consumo de peixes está em crescimento com o decorrer dos anos, sendo em 2010, 128,2 milhões de toneladas e em 2011, 131,2 milhões de toneladas e o estimado para 2012, 136,2 milhões de toneladas (FAO, 2014) (Tabela 1). É preciso uma produção de peixes que consiga suprir a necessidade do consumo. Segundo estimativas da FAO, em 2018 a produção em aquicultura de peixes para consumo humano irá superar a produção por captura (FAO, 2013).

Tabela 1. Produção e utilização mundial de pesca e aquicultura (Adaptado: FAO, 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	Milhões de toneladas					
<b>PRODUÇÃO</b>						
<b>Captura</b>						
Lagos	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Mar	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
<b>Total de captura</b>	<b>90.8</b>	<b>90.1</b>	<b>90.1</b>	<b>89.1</b>	<b>93.7</b>	<b>91.3</b>
<b>Aquicultura</b>						
Lagos	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Mar	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
<b>Total aquicultura</b>	<b>49.9</b>	<b>52.9</b>	<b>55.7</b>	<b>59.0</b>	<b>62.0</b>	<b>66.6</b>
<b>Total de pesca no mundo</b>	<b>140.7</b>	<b>143.1</b>	<b>145.8</b>	<b>148.1</b>	<b>155.7</b>	<b>158.0</b>
<b>UTILIZAÇÃO</b>						
<b>Consumo humano</b>	<b>117.3</b>	<b>120.9</b>	<b>123.7</b>	<b>128.2</b>	<b>131.2</b>	<b>136.2</b>
<b>Não alimentar</b>	<b>23.4</b>	<b>22.2</b>	<b>22.1</b>	<b>19.9</b>	<b>24.5</b>	<b>21.7</b>
<b>População (Biliões)</b>	<b>6.7</b>	<b>6.8</b>	<b>6.8</b>	<b>6.9</b>	<b>7.0</b>	<b>7.1</b>
<b>Fornecimento de peixe per capita (kg)</b>	<b>17.6</b>	<b>17.9</b>	<b>18.1</b>	<b>18.5</b>	<b>18.7</b>	<b>19.2</b>

As espécies de peixes marinhos em destaque na aquicultura na Europa do sul são: *Dicentrarchus labrax* (robalo) e *Sparus aurata* (dourada), com produção mundial de 265 100 toneladas (FAO, 2012). A dourada teve uma produção estimada em 172.830 toneladas para 2012, de acordo com estatísticas da FAO. Este valor é 13,9% maior do que em 2011 (151.746 toneladas). A produção atual de douradas ocorre em 19 países, sendo os principais: Grécia, com cerca de 68 mil toneladas (representando 39,3% da produção total); Turquia com 40.000 toneladas (23,1%) e Espanha, com 19.430 toneladas (11,2%). O cultivo também acontece em menor escala na Itália, Egito, França, Chipre, Portugal, Croácia, Malta, Tunísia e Marrocos (Eurofish Magazine, 2013).

O sucesso de uma aquicultura depende de um ambiente controlado para um rápido crescimento dos organismos, com o mínimo de custo possível. O crescimento e bem estar dos organismos em uma cultura são afetados por parâmetros físicos, biológicos e químicos sendo

de destacar como críticos o pH, a salinidade, a temperatura, o oxigênio dissolvido e os nutrientes (nitrogênio, fósforo e etc.) (Mallya, 2007).

O objetivo deste estudo foi compreender a influência da densidade e níveis de oxigênio no cultivo de douradas em tanques de terra, com a finalidade de obter uma produção mais rentável, assegurando bons níveis de bem estar animal.

O conhecimento sobre o estresse causado pela densidade dos peixes e níveis de oxigênio é essencial para relacionar com as taxas de crescimento e bem estar animal (Ashley, 2006). Compreender os níveis de estresse e suas respostas fisiológicas são informações que contribuem para traçar um modelo de cultivo ideal a custo mais reduzido.

Os habitats da dourada são os fundos arenosos e rochosos com algas, próximos da costa com profundidade entre 15-30m podendo os adultos chegarem até 150m. Geralmente possuem um comportamento sedentário, podendo ser solitário ou frequentar pequenos grupos. A temperatura é tolerável entre 5-32°C, a salinidade entre 15-40‰ e os valores mínimos de oxigênio dissolvido de 2 mg O<sub>2</sub>/L, sendo estes parâmetros ideais para o cultivo desta espécie (FAO, 2007; Santinha, 1998).

A dourada é carnívora e muito raramente herbívora, destaca-se como alimento os moluscos bivalves, crustáceos e peixes. A dieta é variável ao longo da idade do peixe: os juvenis alimentam-se de poliquetas e crustáceos e os adultos principalmente de moluscos (lamelibrânquios e gastrópodes), crustáceos, equinodermas e ascidáceos (Garcia, 2008).

Como características morfológicas principais estão o corpo oval, profundo e comprimido, perfil da cabeça regularmente curvo com olhos pequenos e boca terminal e ligeiramente oblíqua com lábios pouco protráteis e grossos (Figura 1). Possuem quatro a seis caninos anteriores em cada maxila e 2 a 4 fiadas molares. A barbatana dorsal é formada por 11 raios duros e 13 a 14 moles, a anal com 3 raios duros e 11 ou 12 moles. Parte da cabeça é escamosa, mas o pré-opérculo não possui escamas. As escamas estão presentes ao longo da linha lateral 73-85. A cor predominante é cinza prateada, existindo uma mancha negra na origem da linha lateral que se estende na margem superior do opérculo. Entre os olhos existe

uma faixa dourada frontal, uma faixa escura na barbatana dorsal e barbatana caudal com cor preta predominantemente (FAO, 2007).

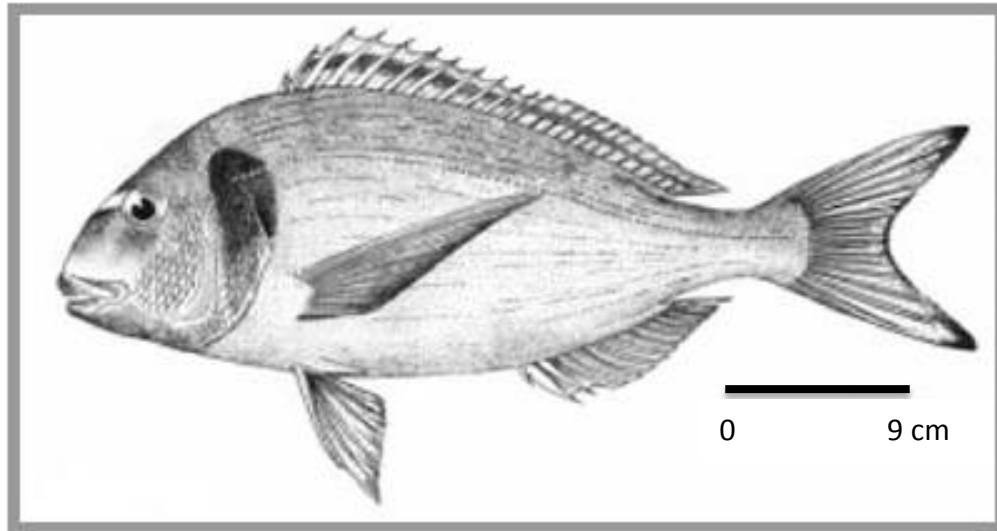


Figura 1 - Morfologia do *Sparus aurata*. (Adaptado: FAO- Database)

### 1.1 Estresse e respostas fisiológicas

Altas densidades em aquicultura podem ser responsáveis por causar estresse crônico (Ashley, 2006). As respostas fisiológicas aos estresses ambientais se dividem em três níveis: primária, secundária e terciária (Stickney, 2000; Barton et al, 2008) (Figura 2). A resposta primária (neuroendócrina) está relacionada com um significativo aumento dos hormônios corticosteroides (cortisol) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). A resposta secundária é iniciada pela estimulação dos hormônios, realizando a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando a glucose no sangue e diminuição da proteína muscular. As respostas terciárias estão relacionadas a saúde (crescimento, reprodução e imunidade) e alterações comportamentais.

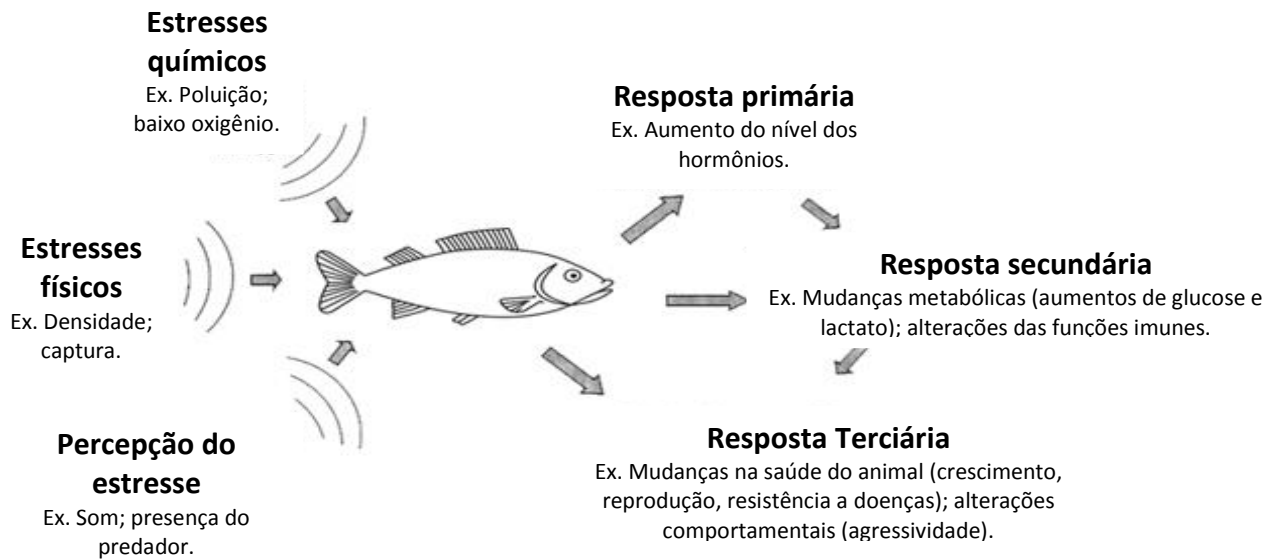


Figura 2 – Percepção do estresse e respostas primária, secundária e terciária. (Adaptado: Barton, 2008)

A resposta dos parâmetros bioquímicos ao estresse crônico em peixes é variável de acordo com o tempo (Figura 3). Após o estresse inicial, existe uma regulação dos processos bioquímicos afim de restaurar a homeostase através de reservas energéticas (Glucose). Em alguns experimentos de estresse crônico, o cortisol teve um aumento pouco expressivo (Barton *et al.* 2008, Fast *et al.* 2008), provavelmente por apresentar um sistema endócrino sobrecarregado por uma longa atividade (Hontela *et al.* 2006) ou por uma adaptação para as condições de estresse. Uma destas adaptações, após um tempo longo de estresse seria a diminuição do cortisol por perda da sensibilidade do tecido interrenal a ação do ACTH ou hormônios pituitários (Vijanyan e Mommsen *et al.* 1999). Para manter o cortisol é necessário uma grande produção de glucose através da glicogênese e glicogenólises.

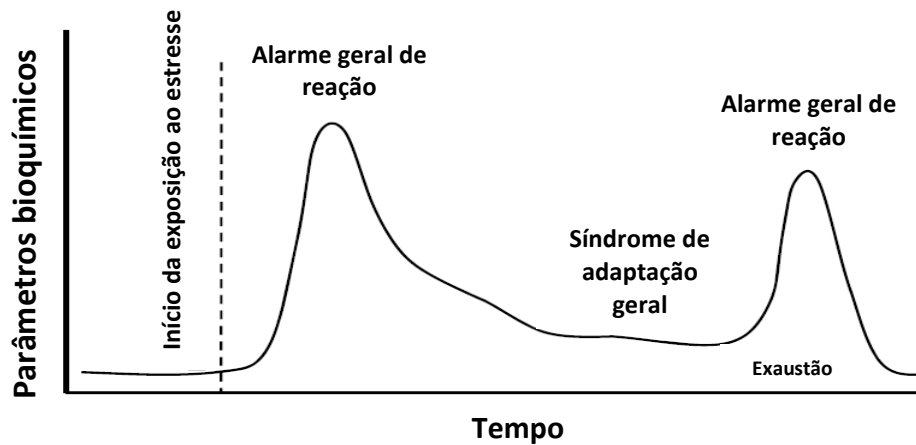


Figura 3 – Respostas fisiológicas ao estresse durante o tempo. (Adaptado: Porchas, 2009)

### 1.2 Oxigênio Dissolvido (OD)

A qualidade da água é um fator essencial na produção em aquicultura, seus efeitos são determinantes para a saúde e condições de crescimento dos peixes. O DO é um parâmetro crítico determinante que deve ser controlado e monitorado diariamente (Timmons et al. 2001).

O Oxigênio é dissolvido na água por difusão a partir da atmosfera e por meio de plantas aquáticas que liberam esse subproduto da fotossíntese. A atmosfera contém cerca de 20% de oxigênio, porém a fração na água é muito pequena (ex: 20°C, 35 salinidade corresponde 7,4ppm ou seja cerca de 0,0074%, Timmons & Ebeling 2010). A difusão do oxigênio da atmosfera para água aumenta quando ocorrem turbulências. Desta forma, em tempos com mais ventos a área da superfície da água é maior que quando em tempos calmos (Stickney, 2000; Landau, 1992).

Em sistemas com algas e fitoplânctons, esses organismos podem produzir seu próprio oxigênio, se tiver alta disponibilidade de luz ao longo do dia e CO<sub>2</sub> para realizar fotossíntese. Mesmo durante o dia as algas podem fornecer e utilizar oxigênio, na noite elas utilizam o oxigênio na respiração (Landau, 1992). Desta forma, na aquicultura, os níveis de oxigênio pela manhã sempre são mais baixo que no final do dia (Figura 4). A remoção de oxigênio da água

deve-se por reações inorgânicas químicas e decomposição de matéria orgânica por microrganismos.

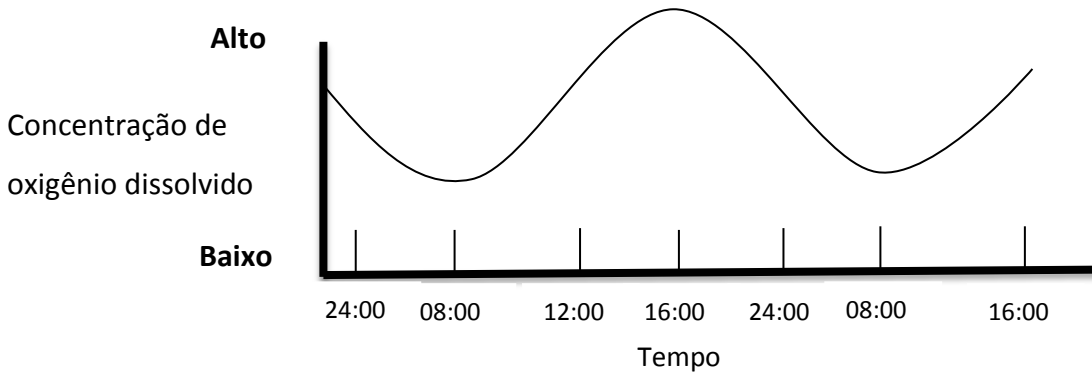


Figura 4 - Variação do oxigênio em aquicultura com influência de sistema aberto. (Adaptado: Stickney, 2009)

O nível de DO está diretamente relacionado com a temperatura, salinidade, pressão atmosférica, quantidade de matéria orgânica e presença de vegetais na água. Quando a água é aquecida ocorre uma redução na capacidade de armazenar oxigênio e a salinidade aumenta (Figura 5). A capacidade de utilização de oxigênio é afetada pelo pH, quanto menor o pH, menor é a utilização do oxigênio. O consumo de  $O_2$  é variável de acordo com a biologia do organismo incluindo a espécie, tamanho, idade, peso, consumo energético, alimentação, temperatura e etc (Morales, 1983).

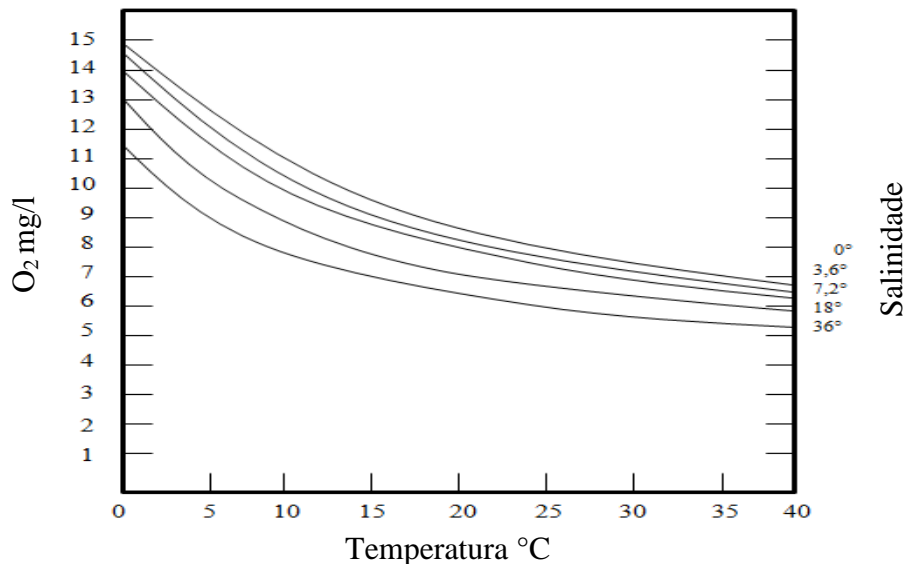


Figura 5 - Variação da solubilidade do oxigênio em água em relação à temperatura e salinidade.  
(Adaptado: Morales, 1983)

### 1.2.1 Efeitos da variação do oxigênio dissolvido

Em sistemas de aquicultura o crescimento depende de um conhecimento das peculiaridades de cada espécie. Para conseguir se aproximar do crescimento ótimo algumas variáveis devem ser controladas como: temperatura, regimes de luz, qualidade da água e os tipos de nutrientes contidos nas rações (Weatherley & Gill, 1989).

A procura por alimento e assimilação de nutrientes está diretamente ligada com a disponibilidade de oxigênio canalizada para o metabolismo. Com concentrações baixas de oxigênio dissolvido, o resultado é a redução na taxa de crescimento e a possibilidade de aumento de doenças (Figura 6) (Tom, 1998). Estudos defendem que quando se mantem os níveis baixos de DO ocorre um grande efeito no crescimento do peixe e aumento de estresse (variações de cortisol e glucose), diminuição de atividades natatórias e redução do sistema imunitário.

Randolph e Clemens (1976) estudaram a variação de temperatura e oxigênio em peixes gatos. Quando o oxigênio diminuía abaixo de 59% os peixes começavam a perder o apetite. Para Jobling (1995) a espécie *Oncorhynchus mykiss* reduz seu apetite abaixo de 60%. Outros estudos mostram resultados semelhantes como: *Dicentrarchus labrax* (Thetmeyer *et al.* 1999), *Oreochromis aureus* (Papoutsoglou e Tziha, 1996), *Ictalurus punctatus* (Buentello *et al.* 2000), *Cyprinus carpio*. (Pichavant *et al.* 2001).

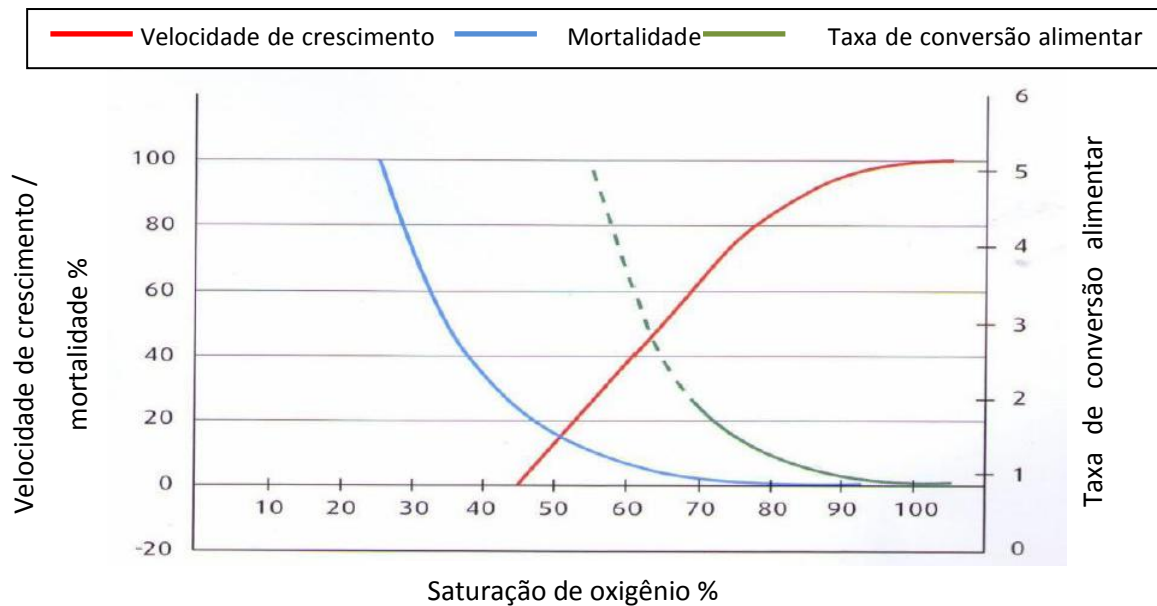


Figura 6 - Efeito do nível de oxigênio no crescimento, taxa de conversão e mortalidade. (Adaptado: Mallaya, 2007)

### 1.2.1.1 Baixos níveis de oxigênio (Hipóxia)

Um déficit na concentração de oxigênio reduz a atividade metabólica para níveis básicos de sobrevivência (Figura 7). Pequenas reduções no DO, abaixo do mínimo limite para a espécie, pode diminuir a eficiência da conversão alimentar e a taxa de crescimento (Morales, 1983; Stickney, 2000). Quando ocorre uma redução da concentração do oxigênio dissolvido a ponto de afetar as funções de osmorregulação denomina-se hipóxia.

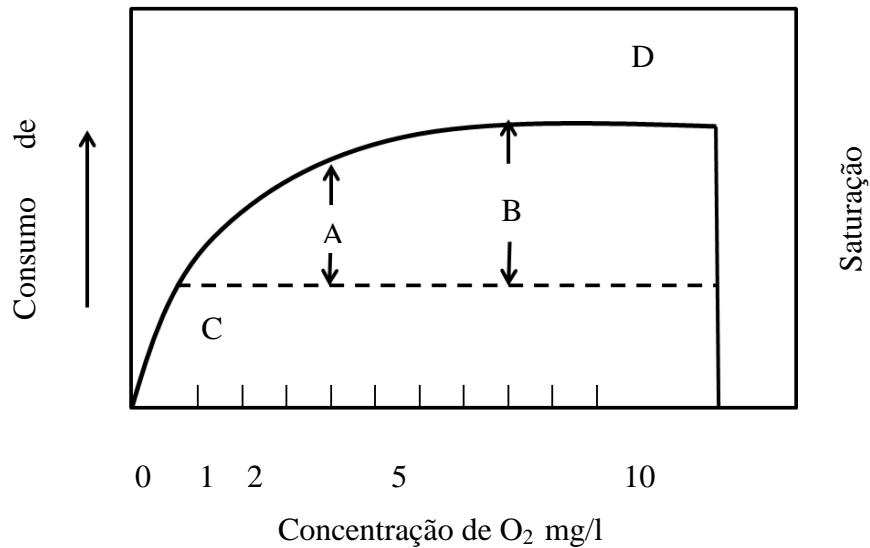


Figura 7 - Dependência da atividade animal em relação com a concentração de oxigênio. (A) Nível de atividade restringida. (B) Nível de completa atividade. (C) Nível de mínima atividade. (D) Nível de saturação a partir dele é possível acontecer doenças das bolhas. (Adaptado: Morales, 1983).

Existem várias formas do peixe responder a uma diminuição significativa do nível de oxigênio. O fluxo de sangue pode ser aumentado através da abertura adicional das lamelas secundárias para aumentar a área respiratória efetiva. Assim pode ocorrer o aumento da concentração de glóbulos vermelhos e uma maior capacidade de transporte de oxigênio do sangue. Outra forma é através da redução do tamanho do plasma (Ex. Aumento do fluxo de urina) em curto prazo, e em longo prazo é liberado glóbulos adicionais do baço (Svobodova et al. 1993). Enquanto isso ocorre, o peixe aumenta a taxa de ventilação a fim de trazer mais água em contato com as guelras. Contudo uma ventilação aumentada ocorrerá em um aumento das substâncias tóxicas na água e conseqüentemente nas brânquias, onde podem ser absorvidas (Boyd e Tucker, 1998). Estudos ainda mostram que a hipóxia prolongada pode induzir a redução de energia e a demanda de oxigênio. Isto deve-se a alterações morfológicas nas brânquias, nomeadamente a hiperplasia.

Referente ao comportamento dos peixes, ocorre uma redução na alimentação, ficam concentrados na superfície da água ou próximo dos aeradores, podem saltar para fora da água, ficam sem reação a estímulos. Com a diminuição da alimentação ocorre um comprometimento do crescimento, desta forma a reprodução é inibida. Para a redução de energia, o peixe procura áreas com temperatura mais baixa, reduzindo o metabolismo.

#### *1.2.1.2 Altos níveis de oxigênio (Hiperóxia)*

Altos níveis de oxigênio também podem ser observados em sistemas de aquicultura, este fenômeno dá-se quando a saturação do oxigênio dissolvido é muito alto, acima de 80%. Este tipo de aumento pode ser promovido por uma biomassa significativa de plantas (algas e macrófitas) deixando os níveis maiores que os da atmosfera. Outra forma de acontecer a hiperóxia seria por injeção de oxigênio em sistemas intensivos, com altas densidades (Stickney, 2000).

Uma resposta comum a grande disponibilidade de oxigênio é a hipercapnia, um estresse comum em tanques com altas densidades. Com a respiração acelerada dos peixes ocorre uma excreção de  $\text{CO}_2$ , esse é hidratado resultando em ácido carbônico que em parte se dissocia para  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}^{-3}$  diminuindo o pH da água. Em longo prazo ocorrem implicações fisiológicas entre a regulação das concentrações iônicas e os ácidos bases associados com a hipercapnia (Mallaya, 2007).

Os peixes que são expostos a baixas pressões atmosféricas, o sangue equilibra-se com o excesso de pressão na água. Bolhas são formadas no sangue, podendo bloquear a circulação em capilares e nadadeiras dorsal e caudal (Mallya, 2007).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho experimental

#### *Ensaio 1: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)*

O ensaio foi realizado com o cultivo de dourada em três densidades: 5 kg/m<sup>-3</sup>, 10 kg/m<sup>-3</sup> e 20 kg/m<sup>-3</sup>, durante 60 dias. Os peixes foram distribuídos, de acordo com as densidades, em tanques de fibra de vidro circulares de 1,5 m<sup>3</sup> (Figura 8). Cada tratamento foi realizado em duplicado (n = 2), num sistema aberto de circulação com água captada da Ria Formosa e filtrada por um filtro de areia.

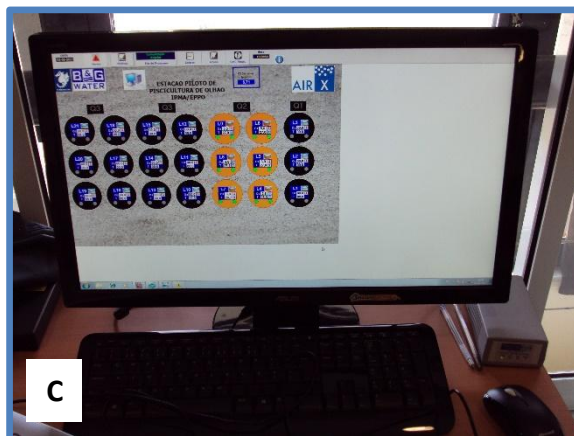
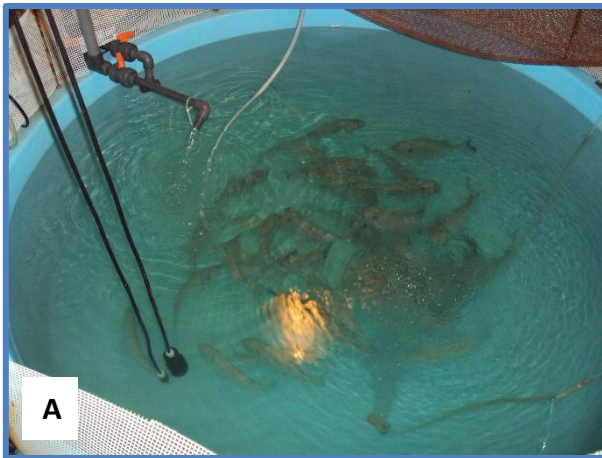


Figura 8 – Tanque de fibra de vidro com 1,5m<sup>3</sup> em sistema aberto de circulação de água.

Os peixes foram alimentados três vezes por dia com a dieta Sorgal<sup>®</sup> (Aquasoja Balance 5mm). Para ter certeza de que a alimentação não foi um fator limitante, os peixes foram alimentados em 1,1 a 1,4% do peso corporal, seguindo a tabela de alimentação do fabricante,

além de um acréscimo de até 50% (por exemplo: de acordo com tabela de 100 g, portanto 100g + 50 g = 150 g).

O oxigênio e temperatura foram registrados automaticamente a cada hora, através do sistema Synergia® (Figura 9). Este sistema é composto por sondas de temperatura e oxigênio, eletroválvulas, caudalímetros, quadro com os dados atuais e um programa de computador. Através do programa, no computador pode-se definir limites de injeção e pausa de oxigênio, transferir os dados para o Excel e visualizar gráficos entre outras funções. O sistema foi programado para injetar oxigênio puro quando o limite atingia os 35 % e parava ao chegar nos 50%, de modo a evitar a mortalidade dos peixes. Foram recolhidas amostras de água 2 semanas após o início do ensaio, posteriormente foram coletadas todas as semanas para controlar as concentrações de amônia, nitritos e nitratos. A salinidade permaneceu em torno de 36. Os peixes foram mantidos em fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas escuro durante todo o período do



experimento.

Figura 9 – Sistema de Synergia<sup>®</sup>: (A) Sondas de temperature e oxigênio, (B) quadro com medições em tempo real e controle de injeção de oxigênio, (C) programa de registro dos dados.

Procedeu-se amostragens inicial, intermediária e final para acompanhar as taxas de crescimento, saúde e mortalidade. Também foram coletadas amostras de sangue dos peixes para fins hematológicos (hematócrito e esfregaço) e determinações plasmáticas (glicose, cortisol, proteína e lactato). Na amostragem final, o segundo arco branquial foi coletado para análises histológicas.

## *2.2 Desenho experimental*

*Ensaio 2: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)*

Três níveis de oxigênio dissolvido foram testados (em duplicado  $n = 2$ ): 40-60 %, 60-80 % e 80-100 % em tanques de fibra de vidro de  $1,5 \text{ m}^3$  com peixes em densidade de  $10 \text{ kg/m}^3$ , durante 30 dias. Foi utilizado o sistema de circulação aberta de água no tanques. Os níveis de oxigênio foram mantidos através da combinação da renovação da água, aeração (com pedras de ar) e, eventualmente, a injeção de oxigênio puro para manter condições de criação idênticas entre os tratamentos. Os peixes foram alimentados três vezes por dia, com uma dieta, Alpis® (5 mm), de 1,1 a 1,4% de peso corporal de acordo com a tabela de alimentação do fabricante.

O oxigênio e temperatura foram registrados automaticamente a cada hora através do sistema Synergia®, utilizado também para injetar oxigênio puro quando o tratamento encontrava-se no limite de oxigênio dissolvido. Foram recolhidas amostras de água 2 semanas após o início do ensaio, posteriormente foram coletadas todas as semanas para controlar as concentrações de amônia, nitritos e nitratos. A salinidade permaneceu em torno de 36‰. Os peixes foram mantidos em fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas escuro durante todo o período do experimento.

Procedeu-se amostragens inicial e final para verificar as taxas de crescimento, saúde e mortalidade. Também foram coletadas amostras de sangue dos peixes para fins hematológicos (hematócrito, esfregaço e hemoglobina) e determinações plasmáticas (glicose, cortisol, proteína e lactato). Na amostragem final, o segundo arco branquial foi coletado para análises histológicas.

## *2.3 Componente analítica*

### *2.3.1 Parâmetros zootécnicos*

O crescimento da dourada foi avaliado pela determinação da taxa de crescimento específico (TCE), o índice de crescimento diário (ICD), crescimento com unidade térmica (CUT) e taxa de conversão alimentar (TCA), com base nas seguintes fórmulas:

$$TCE = \frac{(\ln wf - \ln wi)}{tf - ti} \times 100$$

$$ICD = \frac{wf^{\frac{1}{3}} - wi^{\frac{1}{3}}}{tf - ti} \times 100$$

$$TGC = \frac{wf^{\frac{1}{3}} - wi^{\frac{1}{3}}}{\sum TD} \times 100 \quad \text{CUT}$$

$$TCA = \frac{\text{Ração}}{\text{Ganho da}}$$

*Lnwf= Logarítimo do peso final*

*Lnwi= Logarítimo do peso inicial*

*Wf= Peso final*

*Wi= Peso inicial*

*Tf= Temperatura final*

*Ti= Temperatura inicial*

*∑TD= Somatório das temperaturas diárias*

### 2.3.2 Qualidade da água

A temperatura da água e pH foram registrados quando as amostras de água foram coletadas. O nutrientes (amônia, nitritos e nitratos) foram analisados por reações colorimétricas baseadas no método desenvolvido por Grasshoff (1976), usando um SKALAR Autoanalyser 6250.

### 2.3.3 Coleta de sangue

Os peixes foram profundamente anestesiados com fenoxietanol (300 ppm), o sangue foi coletado por punção na veia caudal com agulha e seringa heparinizada. A coleta de sangue foi realizada em dez indivíduos por tratamento no ensaio de densidades dos peixes e doze indivíduos por tratamento no ensaio dos níveis de oxigênio.

### 2.3.4 Análises hematológicas

Uma gota de sangue foi utilizada para o esfregaço, que foi posteriormente fixada com álcool metílico e corada com Giemsa para uma identificação qualitativa das células sanguíneas (vermelha e branca), sob um microscópio binocular de 400x seco ao ar. Cinco áreas aleatórias do esfregaço foram analisadas para cada peixe sob um microscópio para determinar a proporção de glóbulos vermelhos e brancos para cada indivíduo. Valores foram apresentados como percentagem do número total de células contadas. Valor hematócrito também foi determinado por carregar amostra de sangue em tubos de micro-hematócrito (tubos capilares lisas, 75 mm, Super Rior, W. - Alemanha), que foram centrifugados (5 000 g, 5 min) com centrífuga (EBA 21 Hettich, Alemanha).

#### *2.3.5 Parâmetros plasmáticos*

O sangue restante foi centrifugado para se obter o plasma a 2500 g durante 10 minutos e posteriormente congelado a -20 ° C até à análise. Foi feito um “pool” do plasma de 2 (1° ensaio) e 3 (2° ensaio) peixes para aumentar o volume do plasma e permitir a determinação dos diferentes parâmetros plasmáticos.

O cortisol foi determinado com o teste VIDAS, um ensaio de enzima fluorescente desenhada para o sistema miniVIDAS. A glicose e hemoglobina foram determinados com kits de QCA. O lactato foi determinado com um kit de SPINREACT. A proteína total foi determinada pelo kit BCA do método Bio-Rad. Todos os parâmetros plasmáticos foram determinados com triplicados analíticos, através de leituras de reações colorimétricas em um leitor de microplacas (Thermo Scientific) no comprimento de onda específico, exceto o cortisol.

#### *2.3.6 Histologia da brânquia*

As brânquias foram fixadas em formol tamponado a 4% por 24 horas. Após este período os tecidos foram lavados 3 x 15 min com tampão fosfato salina, água e armazenadas em etanol a 70% até a incorporação da parafina. Quando necessário, os tecidos foram descalcificados com

uma solução de ácido de HCl 8 % e ácido fórmico a 8 % (1:1). Cortes de 6-7µm foram corados com hematoxilina-eosina.

### 2.3.7 Análise estatística

Os dados das taxas de crescimento e parâmetros sanguíneos foram expressos em três replicados  $\pm$  desvio padrão, enquanto os dados hematológicos são baseados em seis determinações. Dados associados à ao crescimento, hematologia e parâmetros sanguíneos foram analisados por ANOVA (one-way), com densidade de peixes como variável. Parâmetros expressos em porcentagem foram submetidos à transformação do arco seno da raiz quadrada. A significância estatística foi testada em 0,05 de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS (v21, IBM , EUA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)

Tabela 2 – Distribuição das densidades e os códigos dos tanques.

Tratamento	5kg/m <sup>3</sup>		10kg/m <sup>3</sup>		20kg/m <sup>3</sup>	
Código/Tanque	L5	L6	L4	L8	L7	L9

#### 3.1.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água

A amplitude térmica da água foi de 8 °C, variando de 17 °C (30 de abril) a 25 °C (14 de junho), de forma similar em todos os tratamentos (Figura 10). O valor da média da temperatura em todos os tratamentos foi  $21,6 \pm 2.0$  °C, com uma variação maior nos vinte primeiros dias de experimento.

Existe influência da temperatura da água no oxigênio dissolvido, visível em todos os tratamentos. Há um padrão na variação de oxigênio, porém com diferenças entre as densidades de peixe. Os tratamentos com  $5\text{kg/m}^3$  e  $10\text{kg/m}^3$  possuem valores de oxigênio similares quando comparados ao de  $20\text{kg/m}^3$ . A maior diferença na variação de oxigênio ocorreu entre os tratamentos de  $5\text{kg/m}^3$  e  $20\text{kg/m}^3$ , respectivamente com 60% a 78% e 50% a 70%. A diferença entre estes tratamentos se manteve em 10%, excedendo os 10% em junho, devido ao aumento da temperatura e biomassa.

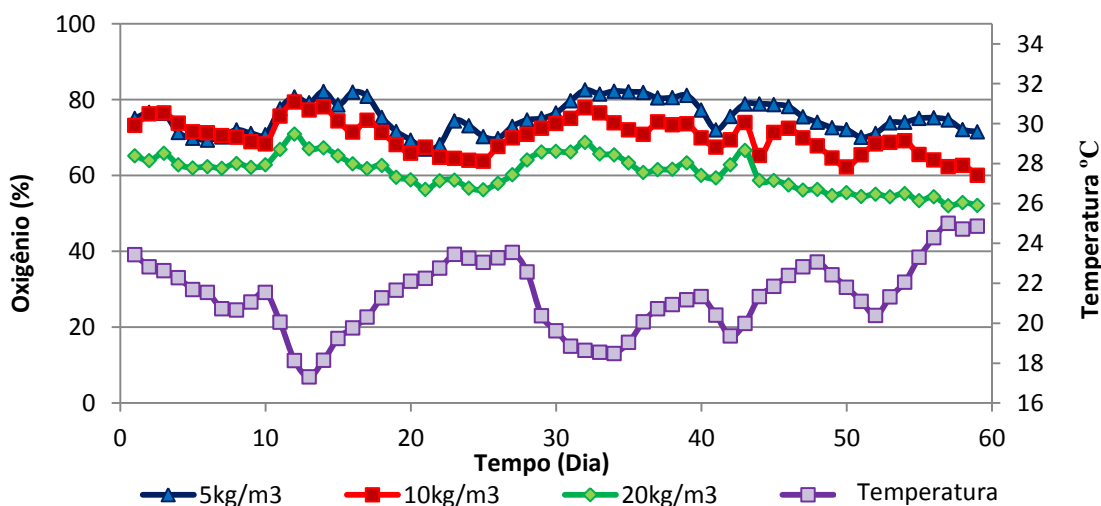


Figura 10 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 60 dias de ensaio, em diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20  $\text{Kg.m}^{-3}$ ).

Os dias de menor (17 °C) e maior temperatura da água (25 °C) foram escolhidos para a análise da variação de oxigênio e temperatura (Figura 11).

O valor mais baixo de temperatura da água (17 °C) ocorreu duas semanas após o início do experimento. O padrão de variação, durante o dia, foi idêntico em todos os tratamentos,

com uma diminuição de oxigênio até cerca de metade do dia, seguido de um aumento até as 20 horas quando se estabiliza. Os valores de oxigênio do tratamento 20kg/m<sup>3</sup> são 10% menores que os tratamentos de 5kg/m<sup>3</sup> e 10kg/m<sup>3</sup>. As médias de oxigênio são respectivamente 79.2 ± 2.2%, 77.3 ± 0.6%, 67.1 ± 0.6%, para 5, 10 e 20 kg/m<sup>-3</sup>.

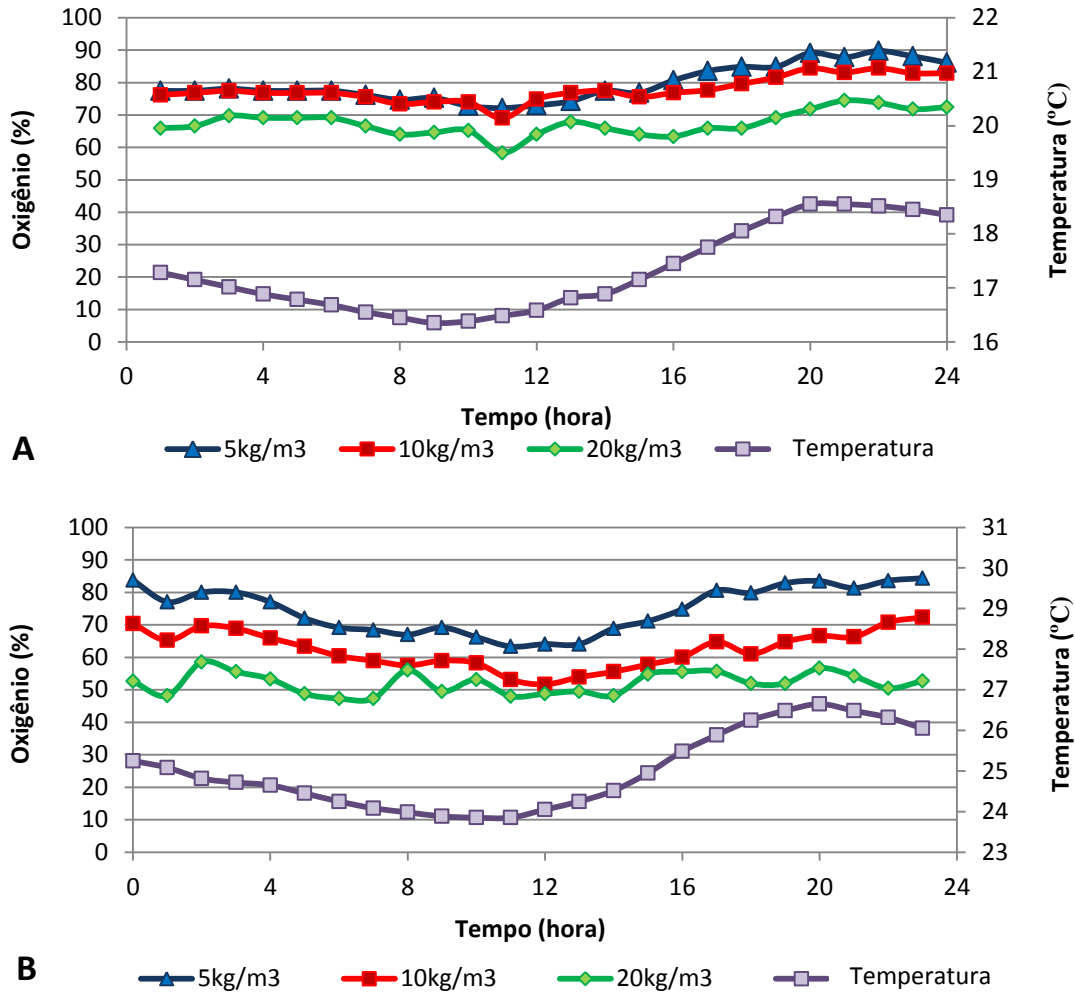
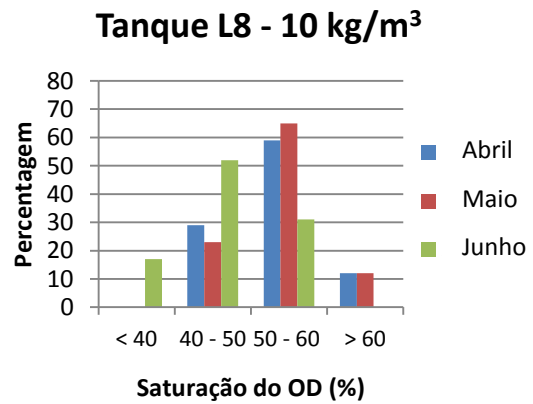
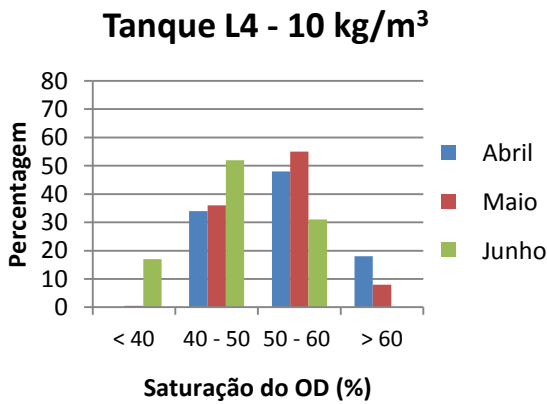
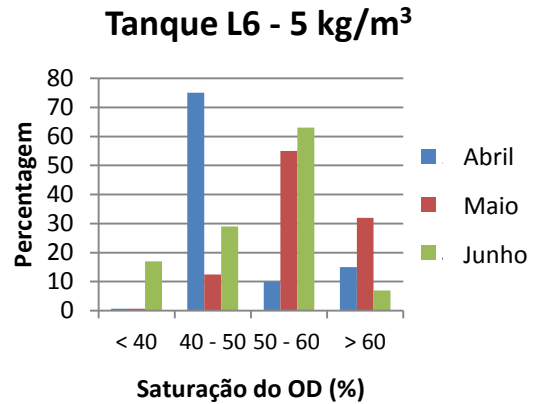
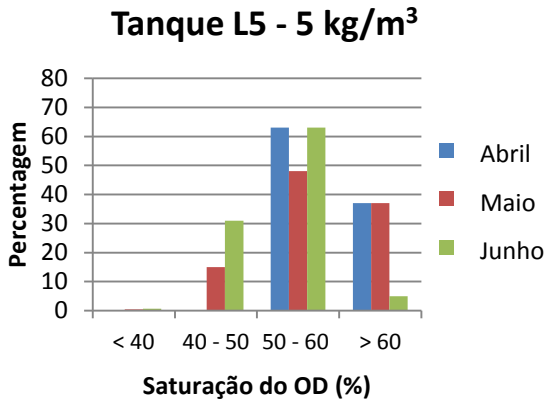


Figura 11 – Variação de oxigênio e temperatura durante 24 horas no dia mais frio (A) (30 de abril - 17 °C) e mais quente (B) (14 de junho - 25 °C) do experimento com diferentes densidades de douradas (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>).

No registro mais alto da temperatura da água, o oxigênio variou de acordo com a densidade dos peixes. O tratamento de maior densidade (20 kg/m<sup>-3</sup>), manteve seus níveis de oxigênio de forma estável, durante o ciclo de 24 horas. Nos demais tratamentos (5 e 10 kg/m<sup>-3</sup>)

existe uma diminuição do oxigênio dissolvido nas primeiras 12 horas, seguido por um aumento. As médias dos tratamentos são respectivamente  $74.7 \pm 1.53\%$ ,  $62.3 \pm 0.17\%$ ,  $52.1 \pm 1.53\%$  para baixa, média e alta densidades.



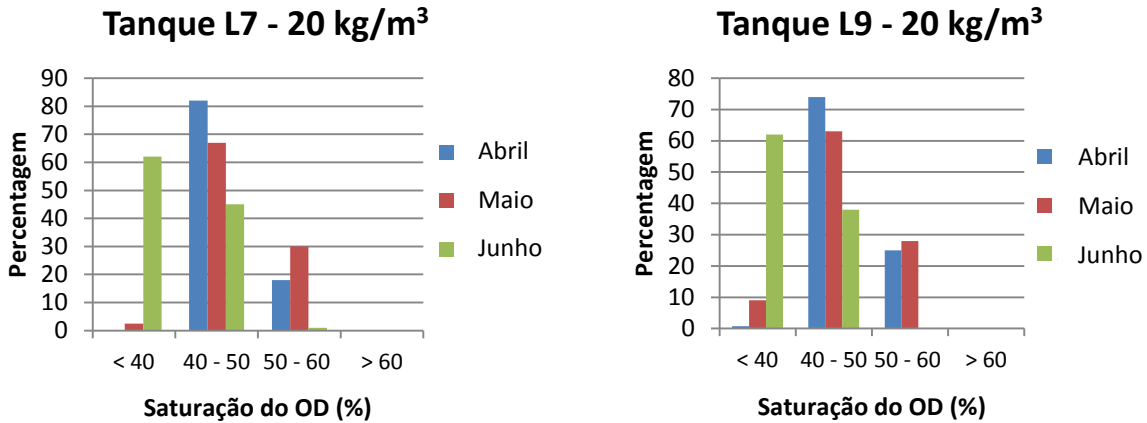


Figura 12– Frequência da concentração do oxigênio dissolvido nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

A concentração do oxigênio dissolvido é muito baixa durante as duas últimas semanas de (junho), com ponto mais crítico no tratamento 20kg/m<sup>3</sup> (Tanques L7 e L9). Neste período 62% dos registros estão na classe 30-40% de oxigênio dissolvido (Figura 12).

Para manter os níveis de segurança (acima de 35%), foram utilizadas garrafas 4 garrafas de 180 L de oxigênio puro. Não houve nenhuma utilização deste recurso no tratamento de baixa densidade, cerca de 90% do oxigênio puro, foi consumido pelo tratamento de maior densidade (Figura 13).

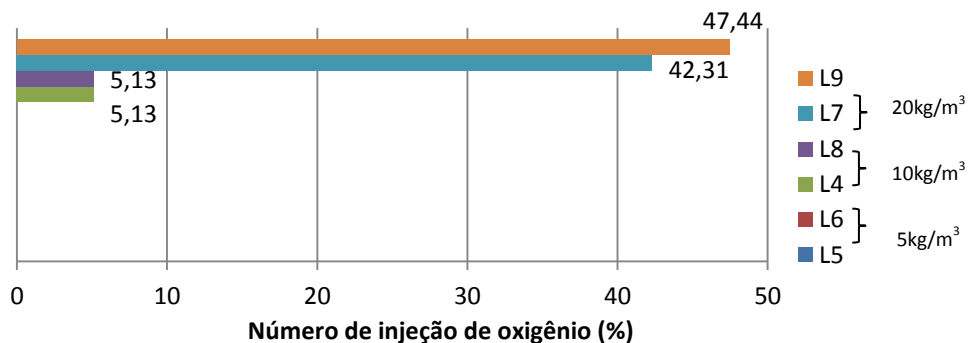


Figura 13 – Percentagem de ativação do sistema de injeção de oxigênio, acionado quando os níveis de oxigênio dissolvido encontravam-se no limite (35%).

A variação do oxigênio dissolvido acompanha a densidade dos tratamentos, porém com uma pequena exceção entre as densidades 20kg/m<sup>3</sup> (tanque L7) e 10kg/m<sup>3</sup> (tanque L4) após a limpeza dos filtros. Em geral os níveis de oxigênio dissolvido reduzem após a alimentação e a pausa de água para limpeza dos filtros. No tratamento de maior densidade, a diminuição de oxigênio após estes eventos acontece de forma mais abrupta (Figura 14).

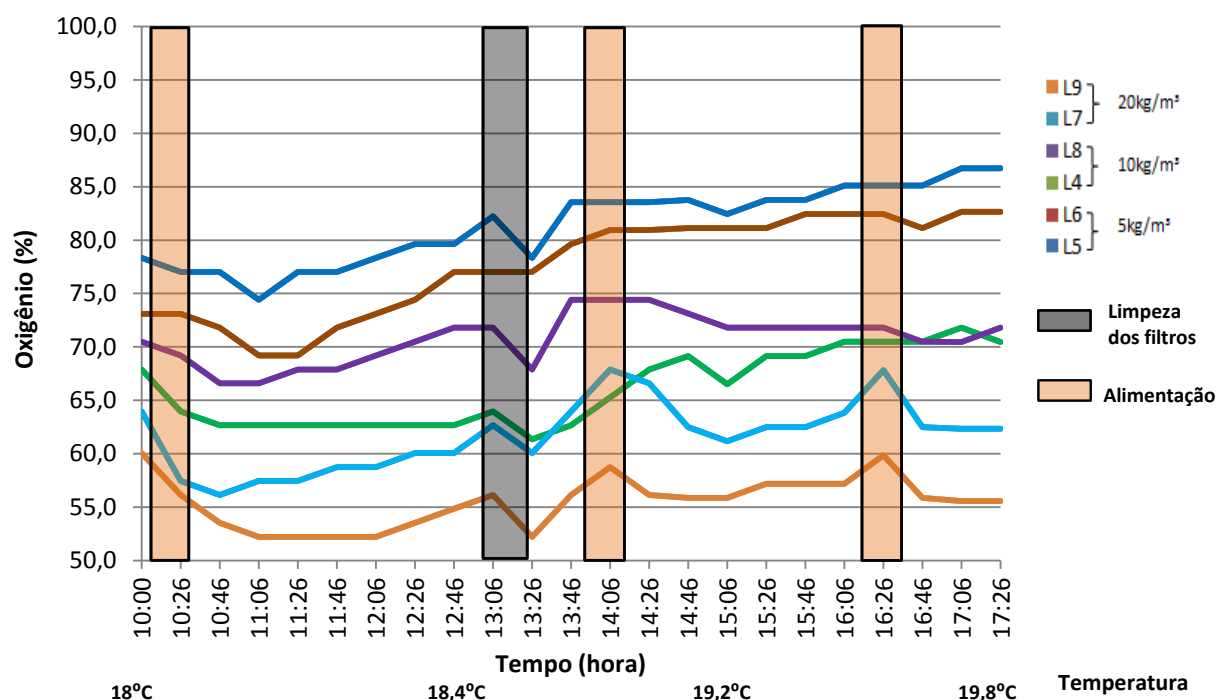


Figura 14 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura, durante os procedimentos cotidianos (alimentação e limpeza dos filtros), nas diferentes densidades de douradas (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>).

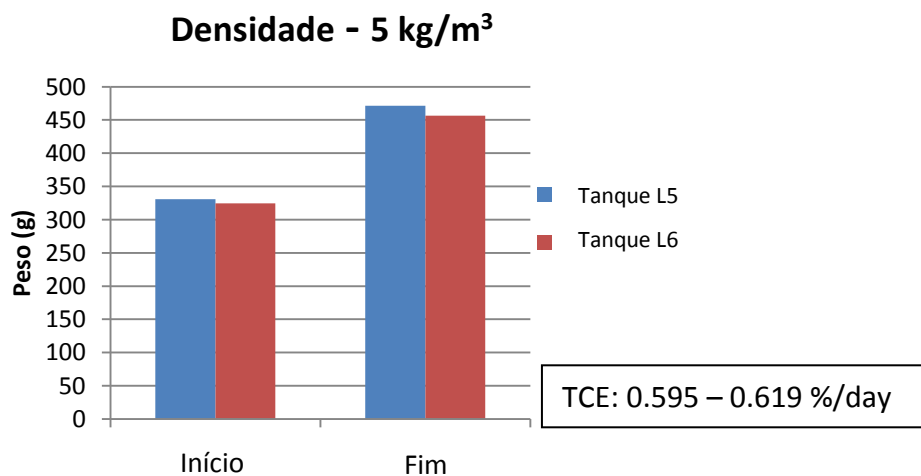
### 3.1.2 Parâmetros Zootécnicos

Durante o período de experimento apenas 2 peixes do tratamento de maior densidade morreram. Estes valores foram subtraídos da biomassa inicial para obter o TCA e ganho mais reais. No início do experimento, as médias de peso entre os tratamentos foram entre 325 e

327g (tabela 3), com uma variação de 4% por tanque. O ganho final foi respectivamente de 41, 44% e 40% para baixa, média e alta densidade. A dispersão dos pesos aumentou 7% de forma semelhante em todos os tratamentos.

Tabela 3 – Perfil do crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias de experimento.

Parâmetro	5 kg/m <sup>-3</sup>	10 kg/m <sup>-3</sup>	20 kg/m <sup>-3</sup>
Peso inicial (g)	325.4± 7.3	327.4 ± 0.2	326.9± 0.6
Peso final (g)	459.3 ± 17.0	470.8 ± 5.0	458.9 ± 3.3
n de peixe	23	46	93
Ganho (kg)	3.1 ± 0.2	6.6± 0.2	11.8 ± 0.4
TCE (%.dia <sup>-1</sup> )	0.57 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.01
ICD	0.74 ± 0.05	0.80 ± 0.03	0.73 ± 0.01
CUT	6.4 ± 0.5	6.8 ± 0.3	6.2 ± 0.1
TCA	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.0



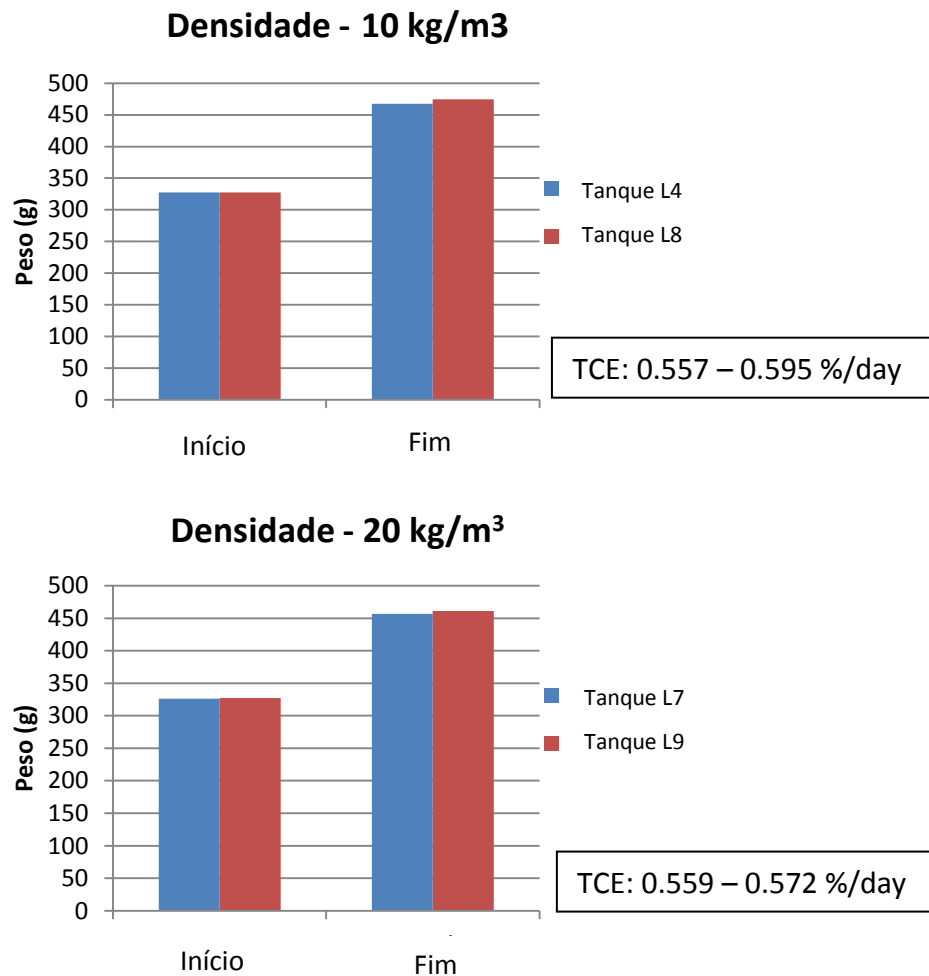


Figura 15 – Média da taxa de crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

### 3.1.3 Qualidade da água

A amônia total possui um padrão similar para todos os tratamentos durante todo experimento, porém os valores estão diretamente relacionados com a densidade dos peixes por tanque (Figura 16).

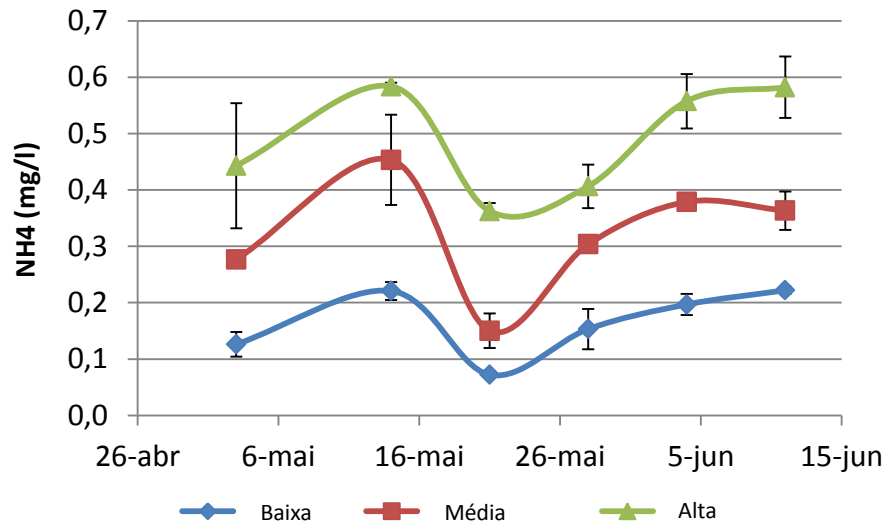


Figura 16 – Variação da amônia total nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

A temperatura da água e o pH afetam a forma predominante da amônia, ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou não ionizada (NH<sub>3</sub>), forma mais tóxica. Para determinar a amônia não ionizada (Figura 17), além da coleta de água, foi medido o pH (variou entre 7,7 e 8,2) e a temperatura (variou entre 19-23 °C).

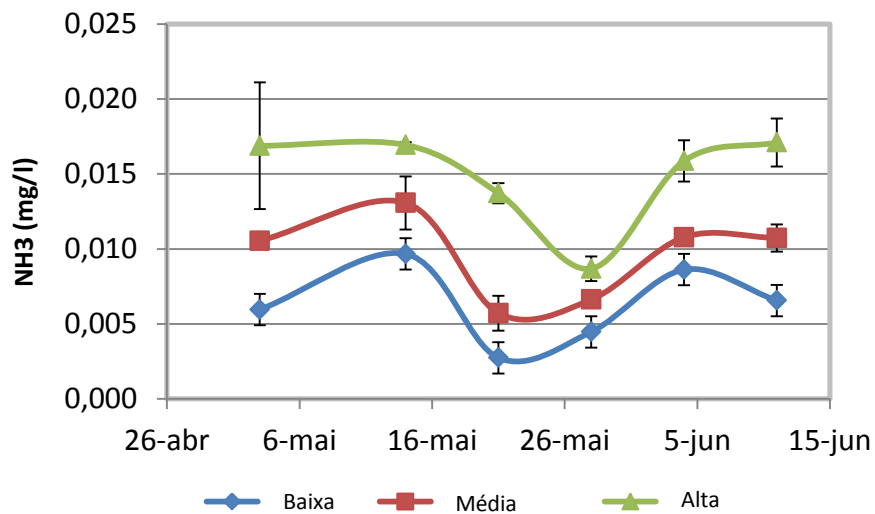


Figura 17 – Variação da amônia não ionizada, nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

Os valores de NH<sub>3</sub> tiveram um padrão semelhante ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com valores altos em relação ao aumento da densidade. Os valores obtidos são considerados aceitáveis (máximo 0,016 mg/l<sup>-1</sup>), abaixo de 0,05 mg/l<sup>-1</sup>, valor considerado tóxico que podem danificar as brânquias.

Tabela 4 - Relação entre oxigênio dissolvido e a amônia nos tanques de diferentes densidades.

Tratamento	Equação
<i>Baixa densidade</i>	$y = -0.0745x + 0.5858; R^2 = 0.6597$
<i>Média densidade</i>	$y = -0.1509x + 1.102; R^2 = 0.629$
<i>Alta densidade</i>	$y = -0.118x + 1.0106; R^2 = 0.5279$

### 3.1.4 Análises sanguíneas

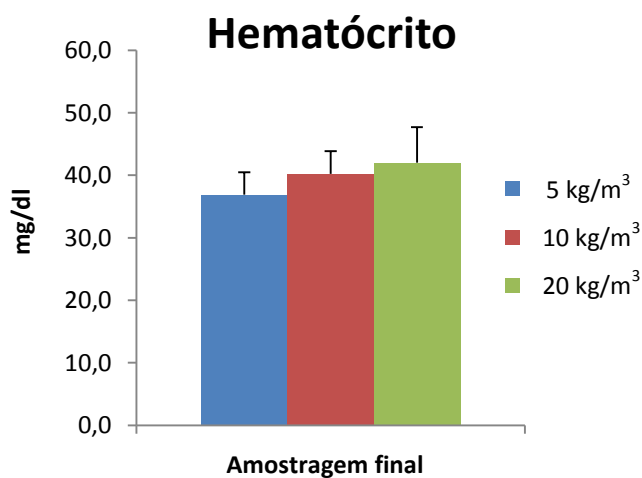


Figura 18 – Valores de hematócrito em sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias.

Apesar de não existir nenhuma diferença significativa, existe uma tendência do quanto maior a densidade, maior quantidade de hematócrito.

Tabela 5 – Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias.

<b>Células sanguíneas</b>	<b>5 Kg/m<sup>-3</sup></b>	<b>10 Kg/m<sup>-3</sup></b>	<b>20 Kg/m<sup>-3</sup></b>
<b>Vermelho (%)</b>	94.2 ± 2.7	91.6 ± 3.1	93.9 ± 2.4
<b>Branco (%)</b>	5.8 ± 2.7	8.4 ± 3.1	6.1 ± 2.4

Percentagens muito semelhantes de células vermelhas e brancas foram observadas nas diferentes densidades (Tabela 5). Um alto número de células brancas estão relacionadas com o sistema de defesa dos peixes.

### *3.1.5 Parâmetros plasmáticos*

Após um mês de experimento os níveis de cortisol em todos os tratamentos aumentaram, porém sem diferenças significativas entre as diferentes densidades e com alta variabilidade. Na amostragem final verifica-se um padrão em que os níveis de cortisol tendem a diminuir, sugerindo uma adaptação ao stress (Figura 19).

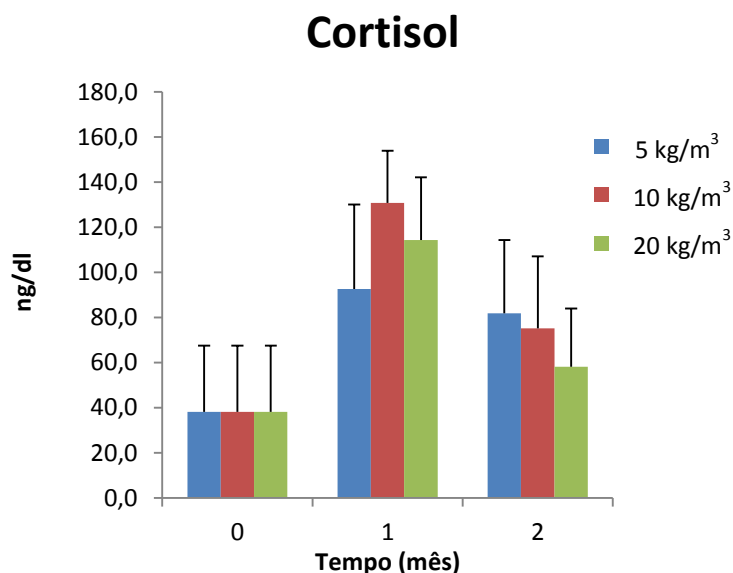


Figura 19 – Valores de cortisol no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

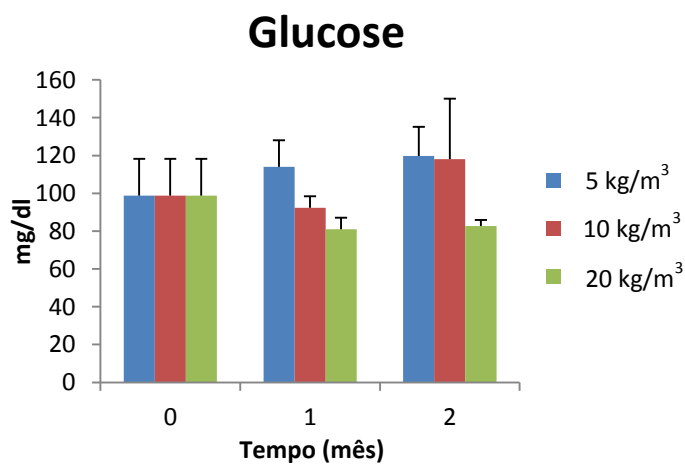


Figura 20 - Valores de glucose no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

A amostragem após um mês de experimento indica uma relação inversamente proporcional entre a glucose e a densidade dos peixes. Após dois meses de experimento, os valores de glucose dos tratamentos de densidade 5 e 20 kg/m<sup>3</sup> se mantiveram e o tratamento de densidade intermediária aumentou (Figura 20).

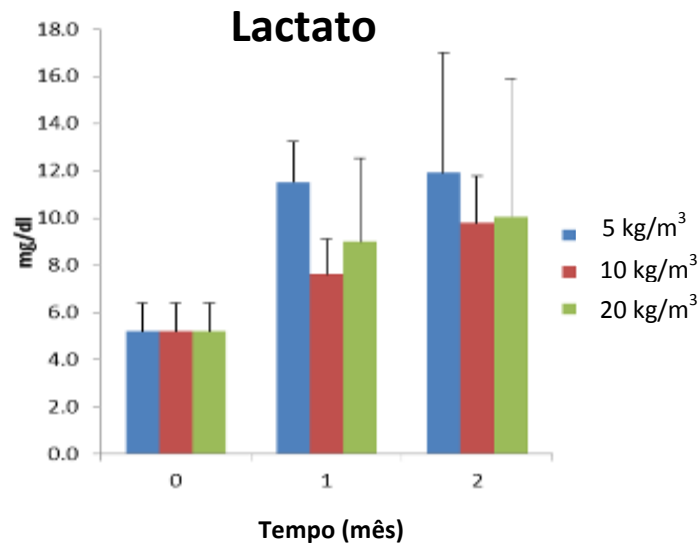


Figura 21 – Valores de lactato no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

A concentração de lactato é semelhante nos diferentes tratamentos, aumentando no primeiro mês de experimento e se tornando constante para o segundo mês (Figura 21).

As douradas de diferentes tratamentos exibem valores similares de proteína plasmática, em todas as amostragens realizadas durante o experimento (Figura 22).

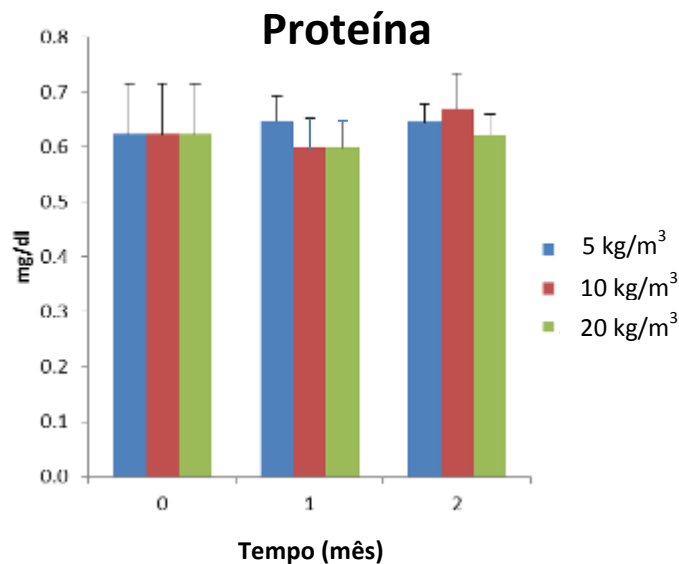


Figura 22 – Valores de proteína do plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

### 3.1.6 Histologia: Brânquia

A análise histológica das brânquias dos peixes em tratamento de densidade baixa mostram lâmelas primárias e secundárias saudáveis (Figura 23, 1 e 2). Danos graduais são notáveis a partir dos peixes de tratamento intermediário (23, 3 e 4). É possível notar danos no epitélio da lâmela secundária (leve congestão e hemorragia). Os peixes de alta densidade exibem lesões mais severas na lâmela secundária (Figura 23, 5 e 6).

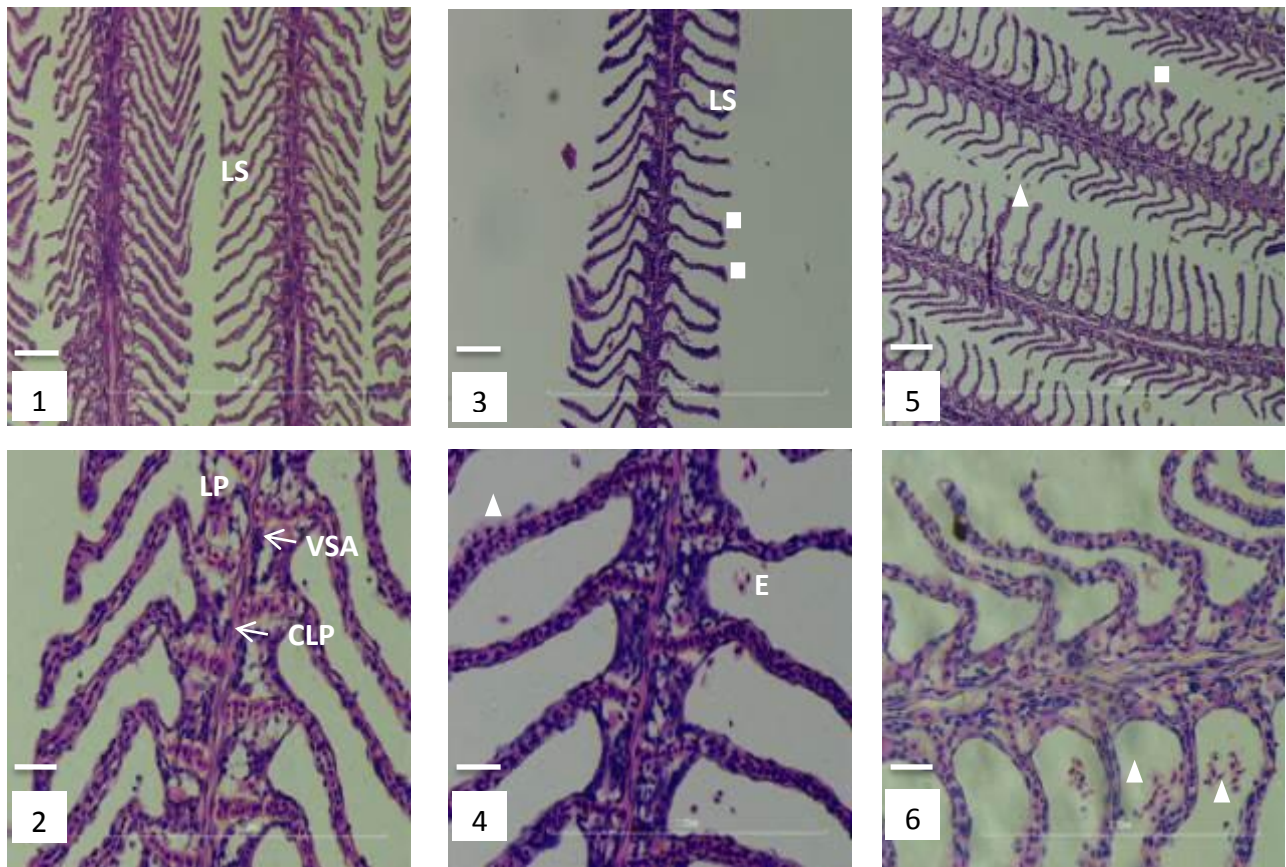


Figura 23 – Histologia (H&E) das brânquias de dourada em diferentes tratamentos de densidade. Tratamento:  $5\text{kg/m}^3$  (1 – 2),  $10\text{kg/m}^3$  (3 – 4) e  $20\text{kg/m}^3$  (5 – 6). Aumento: (10x - Barra =  $90.2\ \mu\text{m}$ ) 1, 3 e 5; (40x - Barra =  $16.7\ \mu\text{m}$ ) 2, 4 e 6. LP = Lâmelas primárias, LS = Lâmelas secundárias, VSA = Vaso sanguíneo aferente, CLP = Cartilagem da lâmela primária,  $\square$  = Eritrócito,  $\blacksquare$  = Congestão da lâmela secundária,  $\Delta$  = Lâmelas secundárias hemorrágicas.

### 3.2 Ensaio: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)

Tabela 6 – Distribuição das concentrações de oxigênio e os códigos dos tanques.

Tratamento	40-60%		60-80%		80-100%	
Código/Tanque	L4	L7	L5	L8	L6	L9

#### 3.2.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água

A média da temperatura da água se manteve em  $26 \pm 0.8$  °C durante todo experimento, para todos os tratamentos (Figura 24). Os níveis de oxigênio são estáveis durante ao longo do ensaio, sendo o tratamento 60-80% com um pouco mais de variação.

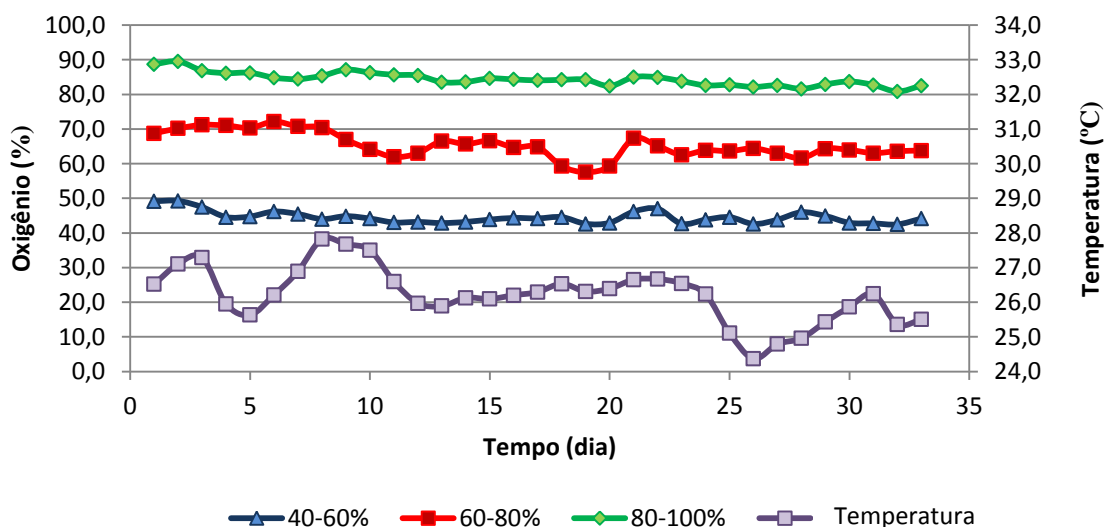


Figura 24 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 30 dias de ensaio, em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%).

### 3.2.2 Parâmetros zootécnicos

O peso inicial das douradas foi entre 313 e 319 g (Tabela 7) com variação entre 7 e 8% entre todos os tratamentos. A amostragem final mostrou um ganho de 36, 38 e 40% de peso, respectivamente para os tratamentos 40-60%, 60-80% e 80-100%. A dispersão final é semelhante a encontrada na amostragem inicial.

Tabela 7 – Perfil da dourada em diferentes níveis de oxigênio após 30 dias de experimento.

<b>Parâmetro</b>	<b>40-60%</b>	<b>60-80%</b>	<b>80-100%</b>
Peso inicial (g)	317.1 ± 2.5	317.9 ± 7.0	313.9 ± 0.4
Peso final (g)	432.7 ± 1.3	445.1 ± 3.7	440.2 ± 5.5
n de peixe	48	48	48
Ganho (kg)	5.5 ± 0.1	5.7 ± 0.3	6.1 ± 0.2
TCE (%.dia <sup>-1</sup> )	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0
ICD	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
CUT	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2
TCA	1.52 ± 0.0	1.49 ± 0.1	1.40 ± 0.1

Os parâmetros de crescimento aumentam com maior disponibilidade de oxigênio dissolvido. Existe uma correlação de significância entre o oxigênio dissolvido e o TCE ( $y = 0.0235x + 1.0127$ ;  $R^2 = 0.6785$ ) (Figura 24).

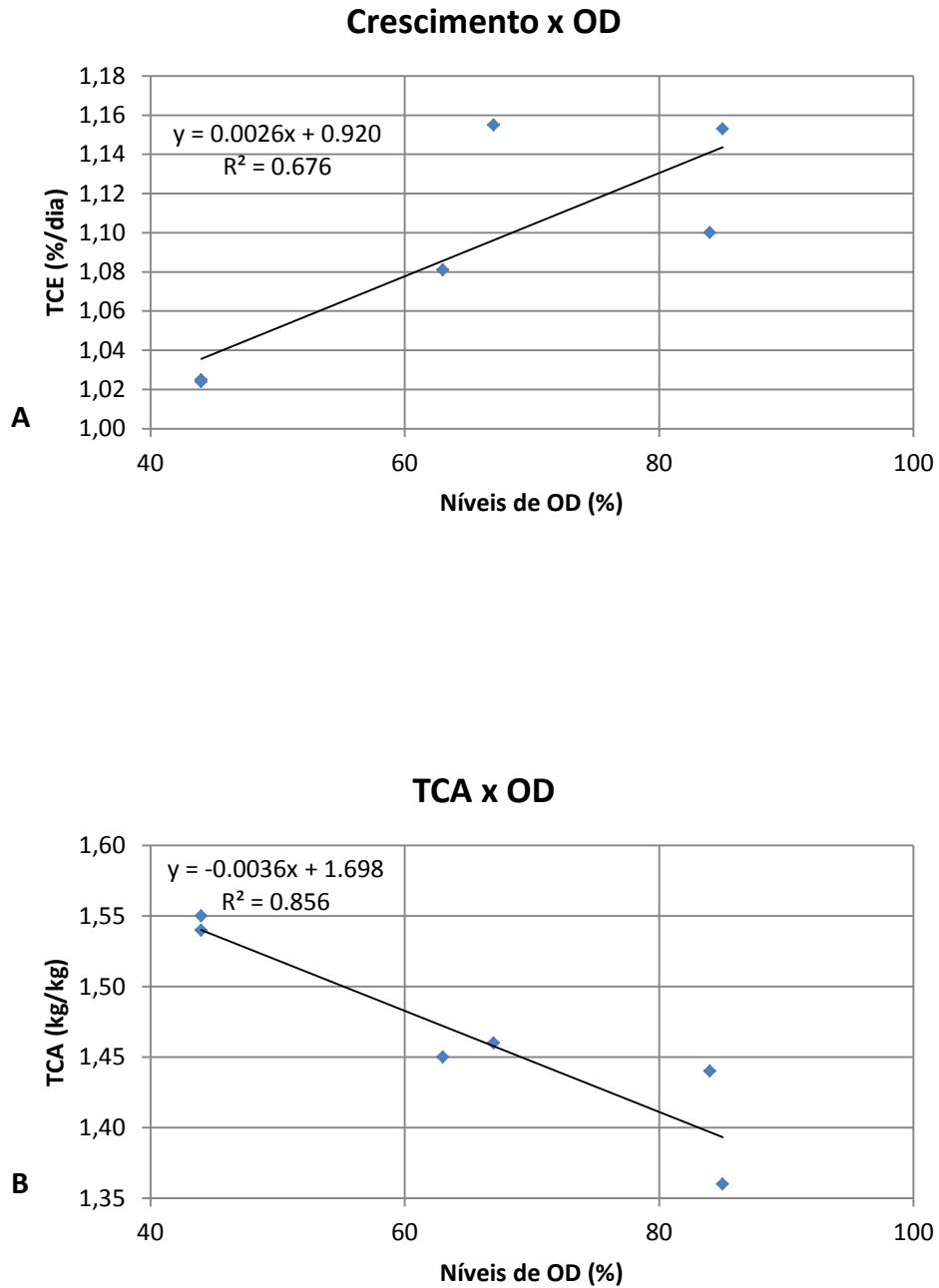


Figura 25 – (A) Relação da taxa de crescimento com o oxigênio dissolvido. (B) Relação do TCA com o oxigênio dissolvido. Experimento com douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), durante 30 dias.

Tabela 8 – TCA baseado na média das concentrações de oxigênio dissolvido, por tanque de diferentes tratamentos.

Tratamento	N. do tanque	Oxigênio dissolvido (média)	TCA com OD (média)
40-60%	4	44%	1.54
	7	44%	1.55
60-80%	5	63%	1.45
	8	66%	1.46
80-100%	6	84%	1.44
	9	84%	1.36

### 3.2.3 Qualidade da água

Existe um padrão semelhante de NH<sub>4</sub> (Amônia total) para todos os tratamentos durante a realização do experimento (Figura 26). O valores mais baixos de NH<sub>4</sub> foram registrados para o tratamento 80-100% de oxigênio dissolvido. Os valores mais altos de NH<sub>4</sub> foram obtidos do tratamento 40-60% de oxigênio dissolvido, nas duas últimas amostragens. Na primeira amostragem o tratamento 60-80% exibiu maior valor de NH<sub>4</sub>. Todos os valores de NH<sub>4</sub> estão dentro do permitido para a espécie.

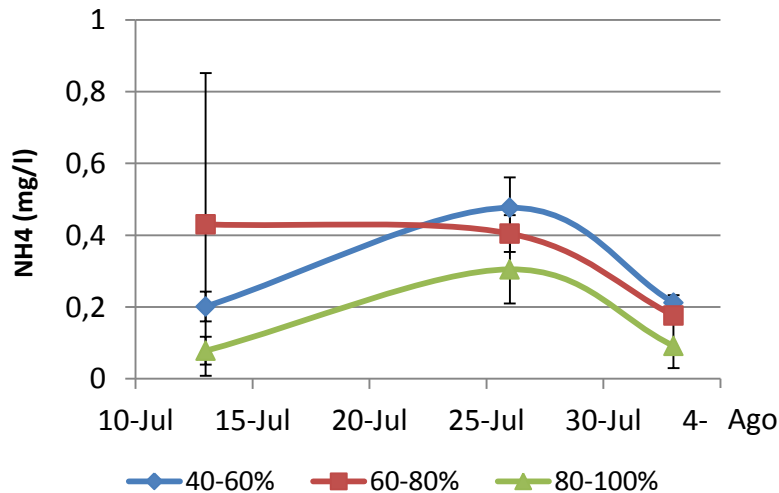


Figura 26 – Variação da amônia total nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.

Os valores mais baixos de NH<sub>3</sub> foram do tratamento 80-100%, os mais altos ocorreram no tratamento intermediário (60-80%), com exceção da última amostragem em que o tratamento 40-60% obteve mais NH<sub>3</sub> (Figura 27). O pH da água variou entre 7,5 e 7,8 (26 °C) entretanto o NH<sub>3</sub> foi mantido em níveis seguros para dourada (< 0,05 mg/L<sup>-1</sup>).

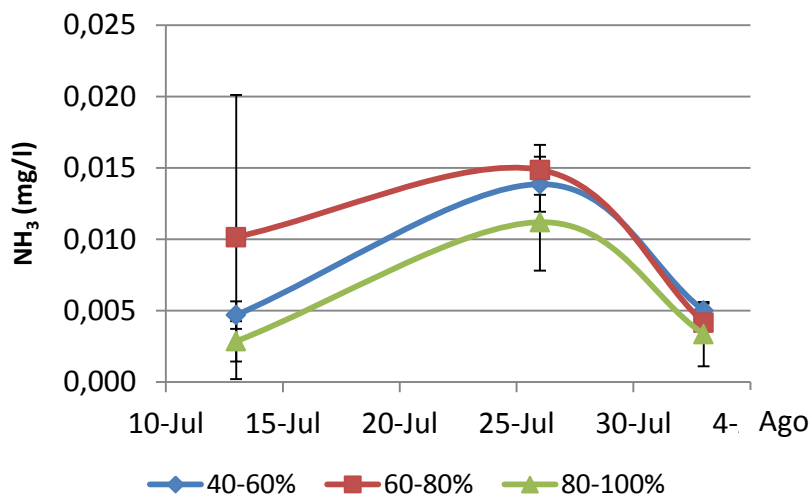


Figura 27 – Variação da amônia não ionizada nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.

Tabela 9 – Relação entre oxigênio dissolvido e amônia total nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Equação
40-60%	$y = -0.5597x + 1.9012$ ; $R^2 = 0.8166$
60-80%	$y = -0.2762x + 1.5108$ ; $R^2 = 0.8885$
80-100%	$y = 0.2255x - 1.1119$ ; $R^2 = 0.0183$

### 3.2.4 Análises sanguíneas

Foram observados valores significativamente elevados de hematócrito com o decréscimo da concentração de oxigênio. Isto indica uma adaptação da fisiologia da dourada em relação a diminuição dos níveis de oxigênio (Figura 28).

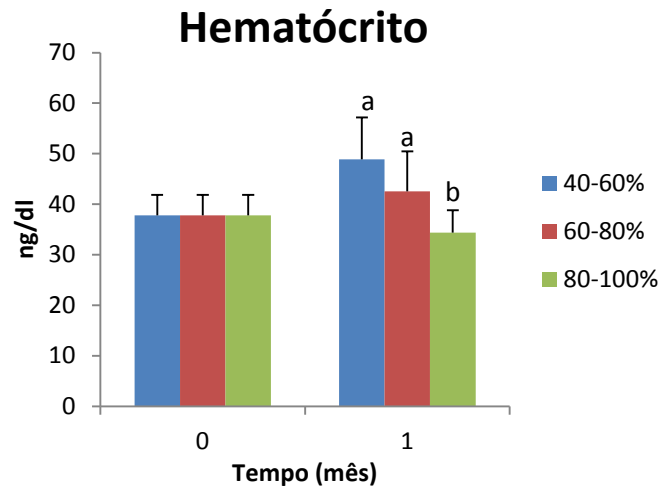


Figura 28 – Valores de hematócrito em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Existe uma leve variação das células brancas dos peixes no tratamento 40-60% de oxigênio dissolvido (Tabela 10). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, este resultado sugere que alguns indivíduos estavam enfrentando uma infecção leve.

Tabela 10 – Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio, após 30 dias.

Células sanguíneas	40-60%	60-80%	80-100%
Vermelha (%)	96.8 ± 2.1	99.3 ± 0.7	99.5 ± 0.3
Branca (%)	3.2 ± 2.1	0.7 ± 0.7	0.5 ± 0.3

Embora os valores da hemoglobina não apresentem diferenças significativas, existe uma tendência de aumento de hemoglobina com a diminuição da disponibilidade de oxigênio (Figura 29).

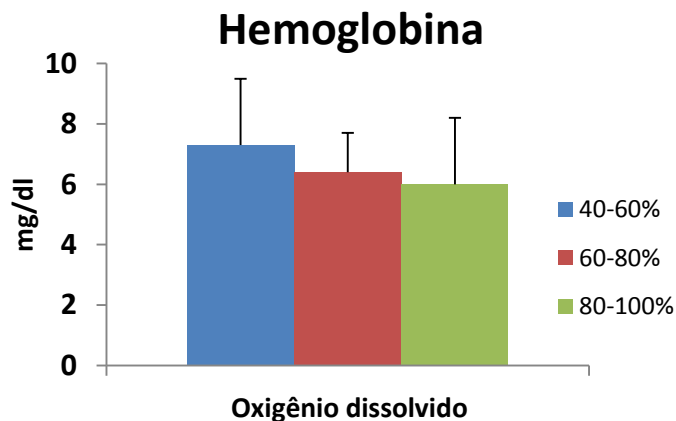


Figura 29 – Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), após 30 dias.

### 3.2.5 Parâmetros plasmáticos

As douradas submetidas aos diferentes níveis de oxigênio, exibem valores similares de cortisol no fim do experimento. Isto indica uma adaptação aos diferentes tratamentos, fazendo com que os níveis de cortisol diminuam em relação ao nível inicial (Figura 30).

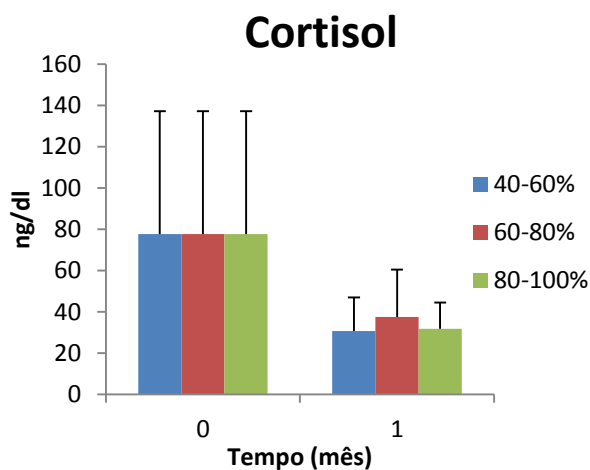


Figura 30 – Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

A glucose plasmática manteve-se constante nos diferentes níveis de oxigênio, durante o período do experimento (Figura 31).

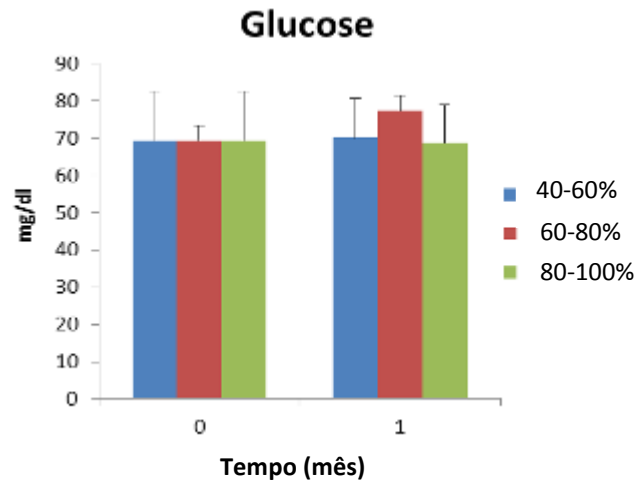


Figura 31 – Valores de glucose em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Nenhuma diferença significativa foi observada no lactato das douradas em seus respectivos tratamentos. Pode-se notar uma diminuição, em torno de 50% de lactato, nos diferentes níveis de oxigênio (Figura 32).

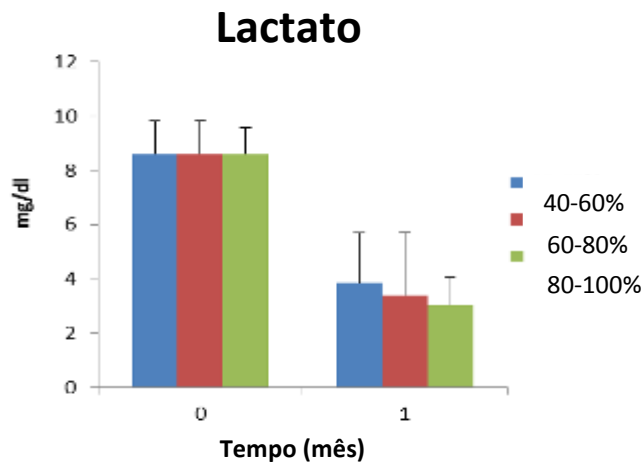


Figura 32 – Valores de lactato em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Os valores de proteína do plasma não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, o mesmo acontece em relação as amostragens (Figura 33).

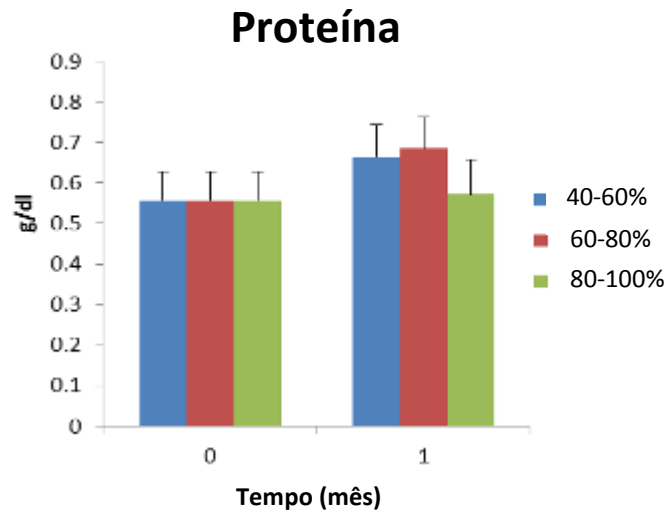


Figura 33 – Valores de proteína do plasma em douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

### 3.2.6 Histologia: Brânquia

As douradas em condições de hipóxia exibiram hiperplasia (Figura 34 - 1 e 2), diminuição da lâmina secundária e congestão da extremidade da mesma (Figura 34 - 1). Nota-se uma maior concentração de eritrócitos no tratamento de menor nível de oxigênio dissolvido. As brânquias do tratamento intermediário exibiram congestão da extremidade da lâmina secundária (Figura 34 - 3) e hemorragia leve (Figura 34 - 4). As douradas do tratamento 80-100% de oxigênio dissolvido, mostraram brânquias com morfologia normal e aspecto saudável.

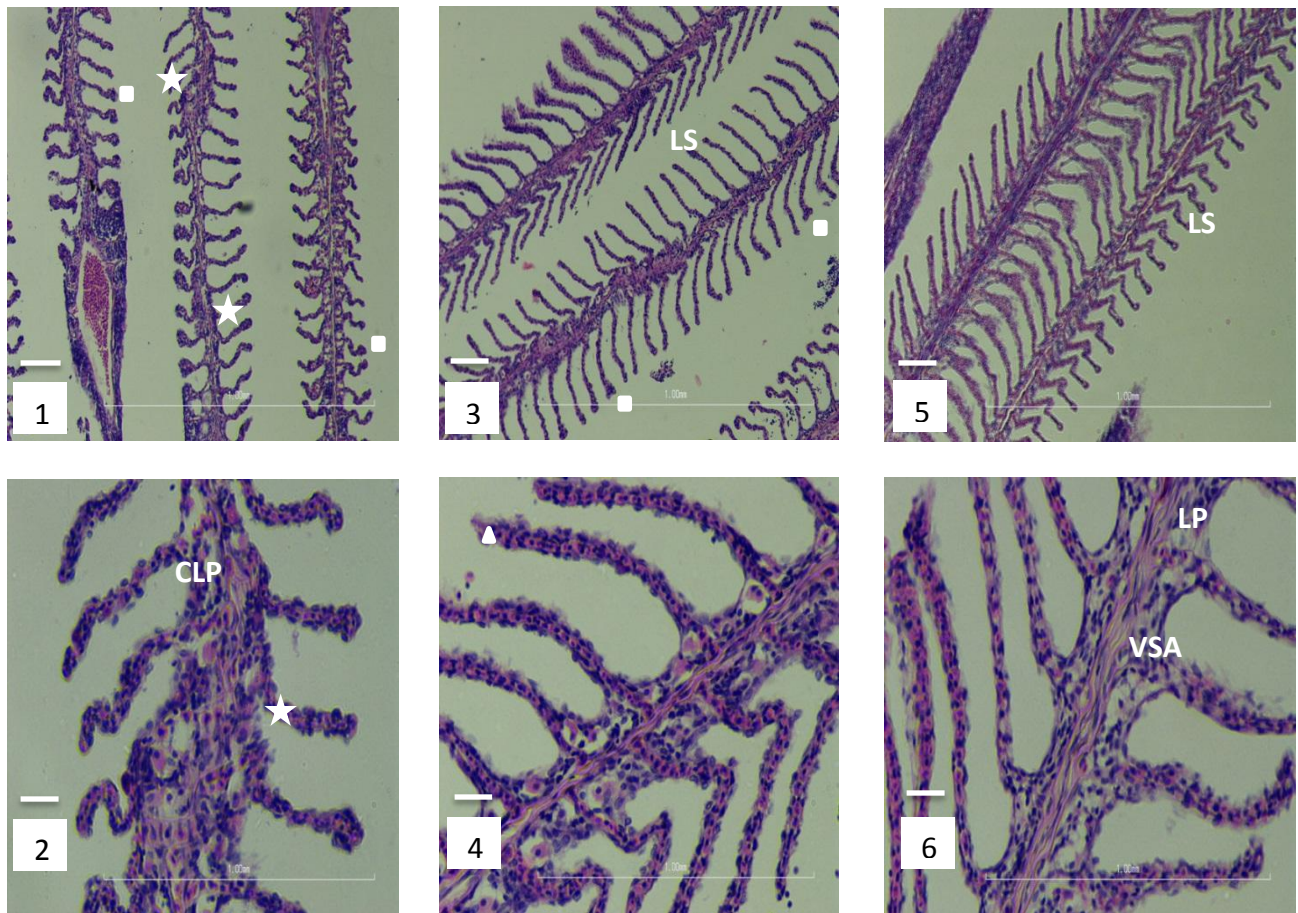


Figura 34 – Histologia (H&E) das brânquias de douradas em diferentes tratamentos. Tratamentos: (1 – 2) 40-60%, (3 – 4) 60-80% e (5 – 6) 80-100%. Aumentos: 1, 3 e 5 (10x - Barra = 90.2  $\mu$ m); 2, 4 e 6 (40x - Barra = 16.7  $\mu$ m). LP = Lâmina primária, LS = Lâmina secundária, VSA = Vaso sanguíneo aferente, CLP = Cartilagem da lâmina primária, E = Eritrócito,  $\square$  = Congestão da lâmina secundária,  $\Delta$  = Lâmina secundária hemorrágica e  $\star$  = Hiperplasia.

## **4. DISCUSSÃO**

### *4.1 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)*

#### *4.1.1 Taxas de crescimento*

A produtividade de uma aquicultura está relacionada com a capacidade do cultivo em altas densidades em sistemas adequados, não afetando as taxas de crescimento nem a saúde dos peixes. No entanto a alta densidade pode induzir a diminuição do crescimento por diferentes fatores: diminuição do consumo de alimento, interação social (Wedemeyer, 1997) e decréscimo da qualidade da água (Pickering e Stewart, 1984).

As diferentes respostas a altas densidades de peixes também está ligada a natureza de cada espécie. O crescimento foi afetado em robalo (Saillant et al., 2003), truta arco-íris (Holm et al., 1990; Ellis et al., 2002) e o bacalhau do atlântico (Lambert e Dutil, 2001). O oposto foi visto com robalo-peva (Correa e Cerqueira, 2007), salmão do atlântico (Kjartansson et al., 1988) e salvelino-ártico (Brown et al., 1992) apresentaram uma melhor tolerância para altas densidades. Estes estudos avaliam a densidade adequada (alta densidade em menor custo), para as diferentes espécies.

Além das diferenças mencionadas em relação a biologia da espécie, alguns autores estudam algumas variáveis que a densidade causa na performance do peixe. O oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade são alguns fatores físicos que podem influenciar as taxas de crescimento (Huntingford et al., 2006), dificultando a análise do efeito da densidade no crescimento do peixe.

No presente estudo a densidade intermediária (10kg/m<sup>3</sup>), apresentou melhores resultados nas taxas de crescimento, quando comparado aos tratamentos de densidades baixa (5kg/m<sup>3</sup>) e alta (20kg/m<sup>3</sup>), apesar de não serem diferenças significativas. Os índices de crescimento são considerados normais para esta espécie considerando as diferentes idades específicas (Canario et al., 1998; Montero et al., 1999; Gómez-Requeni et al., 2004; Sangiao-Alvarellos et al., 2005).

As taxas de conversão alimentar (TCA) foram altas quando comparado com 1,04 (Chatzifotis et al.,2009) para esta espécie. Para evitar uma limitação do crescimento foi decidido aumentar a quantidade de alimento indicado em até 50% de acordo com o apetite do peixe. Isto pode ter afetado o TCA, pois o peixe pode ter canalizado a energia obtida da ração para outras atividades além do crescimento.

No presente estudo, houve uma diferença nos níveis de oxigênio do tratamento de maior densidade (10-15%) em comparação aos demais. Por ser uma diferença pequena, durante pouco tempo de experimento (60 dias), não houve uma influência significativa.

#### *4.1.2 Parâmetros sanguíneos*

As diferentes densidades não foram significativamente afetadas nos parâmetros hematológicos e plasmáticos após 60 dias. Os valores do hematócrito mostram uma tendência, crescendo de acordo com o aumento da densidade, uma adaptação fisiológica para maior transporte de oxigênio. Alta percentagem de glóbulos brancos é uma resposta não específica do sistema imunitário, sendo presente em todos os tratamentos.

Estudos com altas densidades descreveram produção de estresse crônico e mobilização de fontes de energia, resultando em níveis mais altos de cortisol, glucose e proteína (Montero et al., 1999; Sangiao-Alvarellos et al., 2005). Um padrão oposto foi observado neste estudo, em que os valores plasmáticos de cortisol e glucose tendem a ser menores em altas densidades. Este padrão é observado do meio para o final do experimento, sendo a amostragem intermediária com valores mais altos que a amostragem final.

A resposta ao stress são ajustes metabólicos, afim de restaurar a homeostase dos peixes através de mudanças no plasma, como alterações na glucose e lactato. Normalmente, um aumento no cortisol favorece a mobilização da glucose, desta forma, valores mais elevados de glucose eram esperados a valores mais altos de cortisol. Neste estudo, os peixes em tratamento de alta densidade foram mantidos num estresse crônico. Existe um gasto energético do peixe em stress, ao tentar restabelecer sua homeostase. Conseqüentemente, a energia disponível

para o crescimento e saúde do peixe será menor. Outros autores observaram que os peixes submetidos ao estresse crônico apresentaram um pequeno aumento de cortisol, provavelmente por uma adaptação a condições de estresse (Barton et al, 2008; Fast et al, 2008). Provavelmente, longos períodos de esforço resultam numa perda de sensibilidade dos tecidos à ação interna de ACTH ou pituitária (Vijanyan Mommsen et al, 1999). Ainda assim, a alta variabilidade foi observada para estes parâmetros.

#### *4.1.3 Histologia das brânquias*

A brânquias são órgãos que envolvem uma grande variedade de funções básicas, dentre elas: captar oxigênio, liberar CO<sub>2</sub>, osmorregulação, regulação de pH entre outros (Evans et al., 2005). No presente estudo, as brânquias foram afetadas progressivamente de acordo com o aumento da densidades nos tratamentos. Possivelmente estes danos estão relacionados com a amônia consoante as densidades. Apesar da amônia se encontrar em níveis seguros, segundo Francis-Floyd (0,052mg.L<sup>-1</sup>), durante o período de 60 dias pode ter sido o fator destes danos.

#### *4.2 Ensaio: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)*

##### *4.2.1 Taxas de crescimento*

O oxigênio tem um papel essencial no metabolismo do peixe, desde produção energética celular a atividades de rotina e crescimento. O alcance metabólico dos peixes dependem da biologia, temperatura e oxigênio dissolvido (Claireaux et al., 2000; Domecini et al., 2013). Portanto, em algumas situações com capacidade metabólica restrita por pouca demanda de energia podem ocorrer conflitos (Claireaux et al., 2000), e os peixes tem que escolher qual a atividade que irá alocar energia.

Neste ensaio, foi observada uma relação linear entre os índices de crescimento e de oxigênio dissolvido, assim como um menor TCA, em níveis mais elevados de oxigênio. No bacalhau, um padrão similar foi observado, em que a taxa de crescimento está diretamente

relacionada à disponibilidade de oxigênio. Em 97% da redução do crescimento do bacalhau foi atribuído a reduzido consumo de alimento (Chabot e Dutil, 1999). A ingestão de alimento e a assimilação dos nutrientes estão completamente dependentes da disponibilidade de oxigênio dissolvido. Claireaux et al. (2000) apresentou em seus resultados uma interrupção da digestão por regurgitação, quando o oxigênio estava a cerca de 45%. Utilizando desta forma, uma estratégia de se adaptar a restrição da capacidade metabólica. Além disto, quando o *Gadus morhua* é exposto a um estresse crônico por hipóxia (40-45% por 6 semanas em 10 °C) mostra efeitos negativos causando o declínio do volume de ejeção sanguínea em repouso e durante exercícios (Petersen e Gamperl, 2010). Outros autores observaram que os baixos níveis de concentração de oxigênio dissolvido reduzem a taxa de crescimento e capacidade imune (Tom, 1998).

#### 4.2.2 Parâmetros sanguíneos

O déficit de oxigênio induz altos níveis de hematócrito (volume de células vermelhas), como foi visto no presente estudo em que obteve-se diferenças significativas. O aumento das células vermelhas é responsável pelo transporte de oxigênio no sangue, uma estratégia do organismo de manter o mesmo nível de oxigênio dentro das células. O aumento na natação e hiperventilação são estratégias iniciais em condições de hipóxia. As douradas possuem uma habilidade de adaptação fisiológica para baixos níveis de oxigênio, reduzindo o seu metabolismo. Outra adaptação a hipóxia crônica seria a produção de células vermelhas pelo baço, afetando os custos metabólicos.

Embora não significativa, o conteúdo de hemoglobina aumentou em condições de hipóxia, confirmando a estratégia da dourada em manter o transporte de oxigênio semelhante nos tecidos. Além disso, as douradas do tratamento 40-60% OD exibiram um aumento do número de glóbulos brancos, o que indica uma resposta do mecanismo imunológico.

Apesar das alterações dos parâmetros hematológicos, não houve relação significativa entre os diferentes níveis de saturação de oxigênio e parâmetros de estresse como o cortisol,

glucose e outros parâmetros metabólicos até o final do experimento. Além disso, foram observados valores semelhantes para as amostragens inicial e final, com exceção do lactato, que exibiu uma diminuição como resultado do metabolismo anaeróbio. Possivelmente devido a uma consequência da natação dos peixes ao invés de ser causada por diferenças nas concentrações de oxigênio.

#### *4.2.3 Histologia das brânquias*

Em condições de hipóxia prolongada, alterações morfológicas foram descritas para as brânquias, como: hiperplasia da lamela primária, encurtamento e arredondamento da lamela secundária (Cengiz, 2009). Alteração semelhante foi descrito por Gonzalez e McDonald, (1992) como uma estratégia de peixe para se adaptar a hipóxia em baixa temperatura. Em ambos os estudos, verificou-se uma redução na superfície lamelar e hiperplasia afim de reduzir o contato da brânquia com poluentes da água. O arredondamento da extremidade da lamela secundária provavelmente potencializa a quantidade de trocas gasosas, existindo uma vasoconstrição no sentido extremidade para a base.

As células pilares controlam o fluxo sanguíneo através da regulação do diâmetro das lacunas localizadas entre as células pilares. As paredes lamelares são muito finas e permitem que o sangue dentro das lacunas façam as trocas com o meio externo (Hughes, 1984; Wilson & Laurent, 2002). No presente estudo, nota-se um maior número de células sanguíneas dentro das lacunas, de acordo com o déficit de oxigênio. Isto indica uma regulação das células pilares, afim de efetuar mais trocas gasosas com o meio, em função do déficit de oxigênio.

## 5. CONCLUSÃO

O primeiro ensaio (*Cultivo de dourada em diferentes densidades: 5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>*), apresentou melhores tendências nos resultados de crescimento do tratamento intermediário (10kg/m<sup>3</sup>). Apesar disto, os parâmetros de estresse não foram expressivos, tornando a melhor opção de cultivo a densidade 20kg/m<sup>3</sup>, uma vez que produtivamente é mais rentável. Porém é necessário realizar amostragens ao longo do cultivo, para verificar a saúde, taxas de crescimento e estresse dos peixes, corrigindo a densidade quando necessário.

No segundo ensaio (*Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio: 40-60%, 60-80% e 80-100%*) existem relações significativas entre a taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar com o oxigênio dissolvido. Estas relações e as taxas de crescimento mostram melhores resultados para o tratamento 80-100%. As adaptações fisiológicas são significativas, sendo o aumento do hematócrito a estratégia utilizada para aumentar as trocas gasosas em níveis mais críticos de oxigênio. Apesar do tratamento 80-100% apresentar melhores resultados, este nível não seria aconselhado para uma aquicultura no sul de Portugal, onde no verão a temperatura da água é elevada e os gastos para manter estes níveis comprometeriam o lucro da produção. O nível de oxigênio dissolvido indicado para cultivo de densidade 10kg/m<sup>3</sup>, seria de 60-80%, porém com as mesmas condições de verificação de saúde, taxas de crescimento e estresse dos peixes, corrigindo os níveis sempre que necessário. O nível 40-60%, é desaconselhado por ser um limite muito crítico, podendo alguns eventos diminuir o oxigênio abaixo destes limites (alimentação, falha de bombas, limpeza dos filtros de areia, falhas nas difusoras, altas temperaturas, consumo de oxigênio por microalgas e etc).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashley, P.J. 2006. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*. 1-37p
- Boyd C.E. and Tucker C.S., 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA (1998) 700 p.
- Brown, G.E., Brown, J.A. & Srivastava, R.K. 1992. The effect of stocking density on the behaviour of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Fish Biology* 41, 955-963.
- Buentello, J.A., Gatlin III, D.M., Neill, W.H., 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 182, 339–352.
- Canario, A.V.M., J. Condença, D.M. Power, 1998. The effect of stocking density on growth in gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture Research* 29, 177-181.
- Cengiz, El 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22, 200–204.
- Chabot D, Dutil J-D. 1999. Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *J Fish Biol* 55:472–491
- Chatzifotis, S., M. Vazquez-Arias, I.E. Papadakis, P. Divanach, 2009. Evaluation of Feed Stimulants in Diets for Sea Bream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61(4), 315-321.
- Claireaux, G., D. M. Webber , J.-P. Lagardère, S. R. Kerr, 2000. Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research* 44(3-4), 257-265
- Coll Morales, J., 1983a In: *Acuicultura Marina Animal*. Madrid, Ediciones Mundi Prensa, pp. 414-32
- Domenici, P., N. A. Herbert, C. Lefrançois, J. F. Steffensen, D. J. McKenzie, 2013. The Effect of Hypoxia on Fish Swimming Performance and Behaviour, Chapter 6, In: *Swimming Physiology of Fish*, A. P. Palstra and J. V. Planas (eds.), pringer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M. & Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 61: 493-531.
- Eurofish Magazine. 2014. Deliveries to Europe from state-of-the art processing facility. February, ISSN 1868 – 5943. 59p
- FAO. 2007. Aquaculture Development – Technical Guidelines for Responsible Fisheries. (FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations, ISSN 1020 – 5292; Rome.
- FAO, 2012. Fisheries and Aquaculture Department(FI). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2010-2012.
- FAO. 2013.FAN - FAO Aquaculture Newsletter. No. 51. June 2013 Rome, FAO. 60p.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department (FI). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome 9p
- Fast, M. D., Hosoya, S. Johnson, S. C. & Afonso, L. O. B. 2008. Cortisol response and immune related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long term stress. *Fish and Shellfish Immunology* 24:194-204
- Gagnon, A., Jumarie, C. & Hontela, A. 2006. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquatic Toxicology*.
- Garcia, M. P., 2008. Elaboração de um projecto de uma unidade de Piscicultura. (33-72) Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Medale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- Gonzalez, R. J., D. G. McDonald, 1992. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. *J. Exp. Biol.* 16
- Haukenes, A.H., Barton, B.A. & Bolligs, H. 2008 Cortisol response of pallid sturgeon and yellow perch following challenge with lipopolysaccharide. *Jornal of Fish Biology*.
- Holm, J.C., Refstie, T. & Bo, S. 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*.
- Hughes GM. 1984. General anatomy of the gills. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish physiology*, Vol 10A. New York: Academic Press. p 1–72.

Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P. & Turnbull, J.F. 2006. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*.

Jobling M. 1995. Environmental biology of fishes. Chapman and Hall Fish and fisheries series 16.

Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J.M. & Smith, M.J. 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture*.

Lambert, Y. & Dutil, J.D. 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture*.

Landau, M. 1992. Introduction to Aquaculture New York: John Wiley & Sons, Inc.

Mallaya Y.L. 2007. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Kingolwira National Fish Farming Centre.p 11-26

Mallya, J. Y. 2007. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Fisheries Training Programme. The United Nations University. Tanzania.

Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R. 2009. Cortisol and glucose: Reliable indicators of stress? *Pan Am J Aquat Sci* 4: 158-178.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews on Fish Biology and Fisheries*.

Monfort, M. C. 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. *Studies and Reviews*, Nº 89. Food and Agriculture Organization of the United Nations, General Fisheries Commission for the Mediterranean. Rome.

Montero, D., M. S. Izquierdo, L. Tort, L. Robaina and J. M. Vergara, 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 53-60.

Montero, D., T. Kalinowski, A. Obach, L. Robaina, L. Tort, M.J. Caballero, M.S. Izquierdo, 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health

Morales, J.C. 1983. Acuicultura Marina Animal. Madri, Mundi-Prensa Ed., 423p

Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G. & Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream , (pp.194) Vol.1. FAO, Rome, Italy.

Papoutsoglou S.E. and Tziha G. 1996. Blue tilapia (*Oreochromis aureus*) growth rate in relation to dissolved oxygen concentration under recirculated water conditions. *Aquicultural Engineering* 15: 181-192.

Petersen, L.H.; Gamperl, A.K., 2010. Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal Of Experimental Biology*. 213

Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayou, N., Severe, A., Le Roux, A., and Bcouf, G. 2001. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *J. Fish Biol.*

Pickering A.D., Stewart A. 1984. Acclimation of the interregional tissue of the brown trout *Salmon trutta L.*, to chronic crowding stress. *J. fish Biol.* 24, 731-740.

Quéméner, L. 2002. Le maigre común (*Argyrosomus regius*). Biologie, pêche, marché et potentiel aquacole. Editions Ifremer, Plouzane, France. 31 pp.

Randolph, K.N. and H.P. Clemens. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. *Transactions of American Fisheries Society* 105.

Randolph, K.N., and H.P. Clemens. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. *Transactions of American Fisheries Society* 105: 718724.

Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J. & Chatain, B. 2003. Effects of stocking density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) in intensive aquaculture. *Aquaculture*.

Sangiao-Alvarellos, S., J.M. Guzman, R. Llaiz-Carrion, J.M. Miguez, M. P. Martin del Rio, J.M. Mancera, J. L. Soengas, 2005. Interactive Effects of High Stocking Density and Food Deprivation on Carbohydrate Metabolism in Several Tissues of Gilthead Sea Bream *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Zoology* 303A, 761–775

Santinha, P. J., 1998. Dourada (*Sparus Aurata*). In Henriques M. A. R. (ed.) *Manual de Aquacultura ostra, amêijoia, camarão, truta, salmão, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado.* (pp.165-176) Porto.

Stickney R.R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. A Wiley-Interscience publication. Program at Texas A&M University.

Stickney R.R. 2009. *Aquaculture: An Introductory Text*. Editor: Cabi Publishing. ISBN: 9781845935436.

Svobodova Z., Richard L., Jana M., and Blanka V. 1993 Water quality and fish health EIFAC Technical paper 54

The Biology of Fish Growth by A. H. Weatherley; H. S. Gill. 1989. Konrad Dabrowski. Copeia Published by: American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH). Vol., No. 3 pp. 887-889.

Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K.D., Inselmann, S., Rosenthal, H., 1999. Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, 174, 355-367.

Timmons M.B., James M.E., Fred W.W., Sreven T.S. and Brian J. V. 2001. Recirculating Aquaculture Systems. NRAC publication No.01-002.

Timmons MB, Ebeling JM. 2010. Recirculating Aquaculture. Northeastern Regional Aquaculture Center.

Tom L.1998, Nutritional and feeding of fish. Kluwer Academic Publishers. Second edition.

Universidade de Sterling. 2004. Study of the market for Aquaculture produced sea bass and sea bream species. In Report to the European Commission DG Fisheries, April, Sterling.

White, K. et al. 2004. At a Crossroads: Will Aquaculture Fulfill the Promise of the Blue Revolution? *Aquaculture Clearinghouse*. 4p.

Wilson JM, P Laurent. 2002. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 293: 192-213.

## **1. INTRODUÇÃO**

Aquicultura é o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, répteis, batráquios, equinodermos, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas. Existem várias vertentes deste tipo de cultivo: produção de alimentos, iscas para pesca, pesca esportiva e aquarofilia. A conservação também é uma importante abordagem da aquicultura, através do repovoamento de espécies em estado crítico e cultivos de subsistência com sustentabilidade de pequenas comunidades (FAO, 2007).

Por muito tempo no Mediterrâneo, a criação de peixes marinhos foi exclusivamente para consumo local, baseado na captura de juvenis selvagens do mar, aproveitando a migração trófica natural para lagoas costeiras à procura de refúgio e alimento. Com o aperfeiçoamento dos alimentos artificiais (estabilidade na água e composição nutricional) e o melhoramento das técnicas de arejamento artificial, a aquicultura desenvolveu-se mundialmente (Moretti et al., 1999; Landau, 1992; White et al., 2004).

A produção atual da aquicultura marinha (18,3 milhões de toneladas) é composta de moluscos (75,5%, 13,9 milhões de toneladas), peixes (18,7%, 3,4 milhões de toneladas), crustáceos (3,8%) e outros animais aquáticos (2,1 %) como: pepinos e ouriços do mar (FAO, 2011). Nos últimos anos foi destacada a importância dos nutrientes essenciais e proteínas presentes nos peixes e derivados.

Em 2009, os peixes representaram 16,6% do consumo da população mundial de proteína animal e 6,5% de todas as proteínas. O consumo de peixes está em crescimento com o decorrer dos anos, sendo em 2010, 128,2 milhões de toneladas e em 2011, 131,2 milhões de toneladas e o estimado para 2012, 136,2 milhões de toneladas (FAO, 2014) (Tabela 1). É preciso uma produção de peixes que consiga suprir a necessidade do consumo. Segundo estimativas da FAO, em 2018 a produção em aquicultura de peixes para consumo humano irá superar a produção por captura (FAO, 2013).

Tabela 1. Produção e utilização mundial de pesca e aquicultura (Adaptado: FAO, 2014).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	Milhões de toneladas					
<b>PRODUÇÃO</b>						
<b>Captura</b>						
Lagos	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Mar	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
<b>Total de captura</b>	<b>90.8</b>	<b>90.1</b>	<b>90.1</b>	<b>89.1</b>	<b>93.7</b>	<b>91.3</b>
<b>Aquicultura</b>						
Lagos	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Mar	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
<b>Total aquicultura</b>	<b>49.9</b>	<b>52.9</b>	<b>55.7</b>	<b>59.0</b>	<b>62.0</b>	<b>66.6</b>
<b>Total de pesca no mundo</b>	<b>140.7</b>	<b>143.1</b>	<b>145.8</b>	<b>148.1</b>	<b>155.7</b>	<b>158.0</b>
<b>UTILIZAÇÃO</b>						
<b>Consumo humano</b>	<b>117.3</b>	<b>120.9</b>	<b>123.7</b>	<b>128.2</b>	<b>131.2</b>	<b>136.2</b>
<b>Não alimentar</b>	<b>23.4</b>	<b>22.2</b>	<b>22.1</b>	<b>19.9</b>	<b>24.5</b>	<b>21.7</b>
<b>População (Biliões)</b>	<b>6.7</b>	<b>6.8</b>	<b>6.8</b>	<b>6.9</b>	<b>7.0</b>	<b>7.1</b>
<b>Fornecimento de peixe per capita (kg)</b>	<b>17.6</b>	<b>17.9</b>	<b>18.1</b>	<b>18.5</b>	<b>18.7</b>	<b>19.2</b>

As espécies de peixes marinhos em destaque na aquicultura na Europa do sul são: *Dicentrarchus labrax* (robalo) e *Sparus aurata* (dourada), com produção mundial de 265 100 toneladas (FAO, 2012). A dourada teve uma produção estimada em 172.830 toneladas para 2012, de acordo com estatísticas da FAO. Este valor é 13,9% maior do que em 2011 (151.746 toneladas). A produção atual de douradas ocorre em 19 países, sendo os principais: Grécia, com cerca de 68 mil toneladas (representando 39,3% da produção total); Turquia com 40.000 toneladas (23,1%) e Espanha, com 19.430 toneladas (11,2%). O cultivo também acontece em menor escala na Itália, Egito, França, Chipre, Portugal, Croácia, Malta, Tunísia e Marrocos (Eurofish Magazine, 2013).

O sucesso de uma aquicultura depende de um ambiente controlado para um rápido crescimento dos organismos, com o mínimo de custo possível. O crescimento e bem estar dos organismos em uma cultura são afetados por parâmetros físicos, biológicos e químicos sendo

de destacar como críticos o pH, a salinidade, a temperatura, o oxigênio dissolvido e os nutrientes (nitrogênio, fósforo e etc.) (Mallya, 2007).

O objetivo deste estudo foi compreender a influência da densidade e níveis de oxigênio no cultivo de douradas em tanques de terra, com a finalidade de obter uma produção mais rentável, assegurando bons níveis de bem estar animal.

O conhecimento sobre o estresse causado pela densidade dos peixes e níveis de oxigênio é essencial para relacionar com as taxas de crescimento e bem estar animal (Ashley, 2006). Compreender os níveis de estresse e suas respostas fisiológicas são informações que contribuem para traçar um modelo de cultivo ideal a custo mais reduzido.

Os habitats da dourada são os fundos arenosos e rochosos com algas, próximos da costa com profundidade entre 15-30m podendo os adultos chegarem até 150m. Geralmente possuem um comportamento sedentário, podendo ser solitário ou frequentar pequenos grupos. A temperatura é tolerável entre 5-32°C, a salinidade entre 15-40‰ e os valores mínimos de oxigênio dissolvido de 2 mg O<sub>2</sub>/L, sendo estes parâmetros ideais para o cultivo desta espécie (FAO, 2007; Santinha, 1998).

A dourada é carnívora e muito raramente herbívora, destaca-se como alimento os moluscos bivalves, crustáceos e peixes. A dieta é variável ao longo da idade do peixe: os juvenis alimentam-se de poliquetas e crustáceos e os adultos principalmente de moluscos (lamelibrânquios e gastrópodes), crustáceos, equinodermas e ascidáceos (Garcia, 2008).

Como características morfológicas principais estão o corpo oval, profundo e comprimido, perfil da cabeça regularmente curvo com olhos pequenos e boca terminal e ligeiramente oblíqua com lábios pouco protráteis e grossos (Figura 1). Possuem quatro a seis caninos anteriores em cada maxila e 2 a 4 fiadas molares. A barbatana dorsal é formada por 11 raios duros e 13 a 14 moles, a anal com 3 raios duros e 11 ou 12 moles. Parte da cabeça é escamosa, mas o pré-opérculo não possui escamas. As escamas estão presentes ao longo da linha lateral 73-85. A cor predominante é cinza prateada, existindo uma mancha negra na origem da linha lateral que se estende na margem superior do opérculo. Entre os olhos existe

uma faixa dourada frontal, uma faixa escura na barbatana dorsal e barbatana caudal com cor preta predominantemente (FAO, 2007).

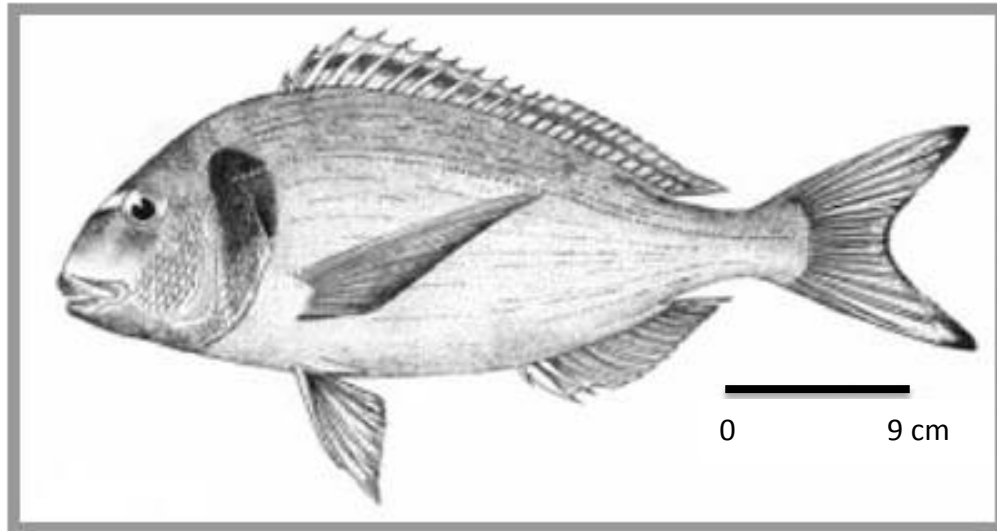


Figura 1 - Morfologia do *Sparus aurata*. (Adaptado: FAO- Database)

### 1.1 Estresse e respostas fisiológicas

Altas densidades em aquicultura podem ser responsáveis por causar estresse crônico (Ashley, 2006). As respostas fisiológicas aos estresses ambientais se dividem em três níveis: primária, secundária e terciária (Stickney, 2000; Barton et al, 2008) (Figura 2). A resposta primária (neuroendócrina) está relacionada com um significativo aumento dos hormônios corticosteroides (cortisol) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). A resposta secundária é iniciada pela estimulação dos hormônios, realizando a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando a glucose no sangue e diminuição da proteína muscular. As respostas terciárias estão relacionadas a saúde (crescimento, reprodução e imunidade) e alterações comportamentais.

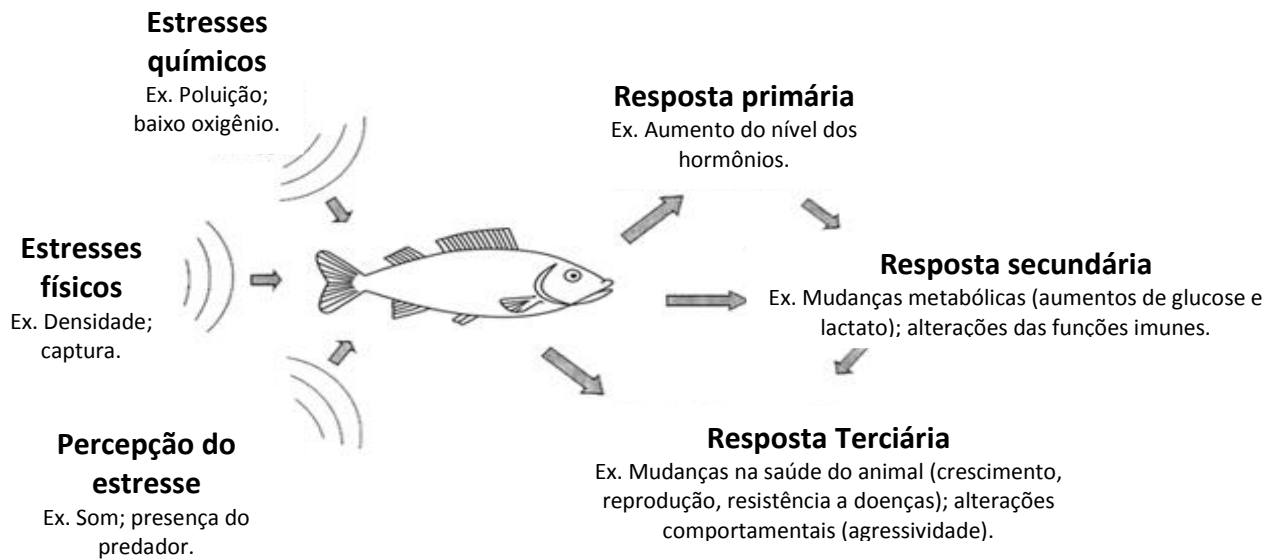


Figura 2 – Percepção do estresse e respostas primária, secundária e terciária. (Adaptado: Barton, 2008)

A resposta dos parâmetros bioquímicos ao estresse crônico em peixes é variável de acordo com o tempo (Figura 3). Após o estresse inicial, existe uma regulação dos processos bioquímicos afim de restaurar a homeostase através de reservas energéticas (Glucose). Em alguns experimentos de estresse crônico, o cortisol teve um aumento pouco expressivo (Barton *et al.* 2008, Fast *et al.* 2008), provavelmente por apresentar um sistema endócrino sobrecarregado por uma longa atividade (Hontela *et al.* 2006) ou por uma adaptação para as condições de estresse. Uma destas adaptações, após um tempo longo de estresse seria a diminuição do cortisol por perda da sensibilidade do tecido interrenal a ação do ACTH ou hormônios pituitários (Vijanyan e Mommsen *et al.* 1999). Para manter o cortisol é necessário uma grande produção de glucose através da glicogênese e glicogenólises.

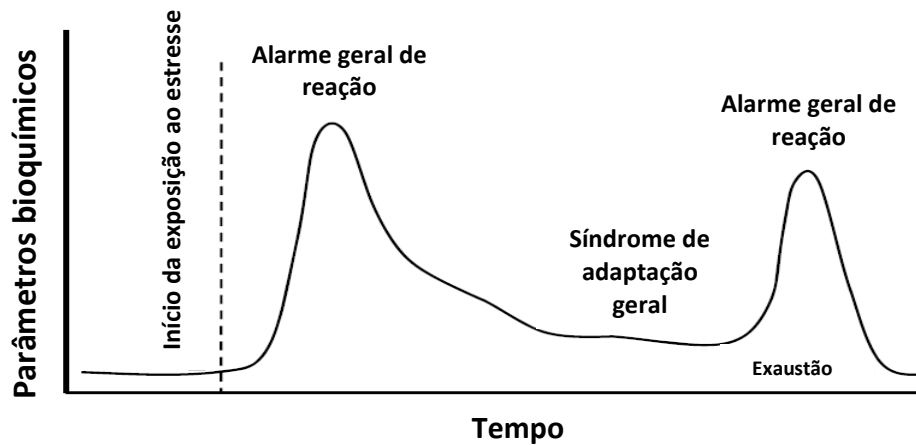


Figura 3 – Respostas fisiológicas ao estresse durante o tempo. (Adaptado: Porchas, 2009)

### 1.2 Oxigênio Dissolvido (OD)

A qualidade da água é um fator essencial na produção em aquicultura, seus efeitos são determinantes para a saúde e condições de crescimento dos peixes. O DO é um parâmetro crítico determinante que deve ser controlado e monitorado diariamente (Timmons et al. 2001).

O Oxigênio é dissolvido na água por difusão a partir da atmosfera e por meio de plantas aquáticas que liberam esse subproduto da fotossíntese. A atmosfera contém cerca de 20% de oxigênio, porém a fração na água é muito pequena (ex: 20°C, 35 salinidade corresponde 7,4ppm ou seja cerca de 0,0074%, Timmons & Ebeling 2010). A difusão do oxigênio da atmosfera para água aumenta quando ocorrem turbulências. Desta forma, em tempos com mais ventos a área da superfície da água é maior que quando em tempos calmos (Stickney, 2000; Landau, 1992).

Em sistemas com algas e fitoplânctons, esses organismos podem produzir seu próprio oxigênio, se tiver alta disponibilidade de luz ao longo do dia e CO<sub>2</sub> para realizar fotossíntese. Mesmo durante o dia as algas podem fornecer e utilizar oxigênio, na noite elas utilizam o oxigênio na respiração (Landau, 1992). Desta forma, na aquicultura, os níveis de oxigênio pela manhã sempre são mais baixo que no final do dia (Figura 4). A remoção de oxigênio da água

deve-se por reações inorgânicas químicas e decomposição de matéria orgânica por microrganismos.

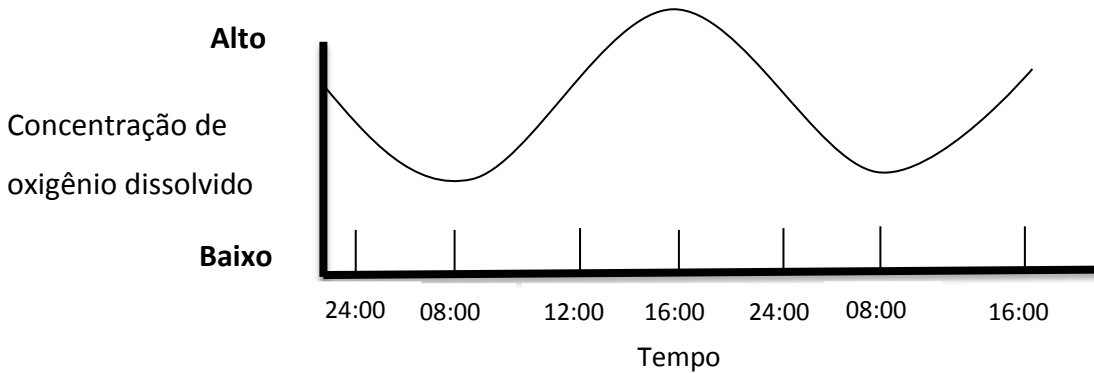


Figura 4 - Variação do oxigênio em aquicultura com influência de sistema aberto. (Adaptado: Stickney, 2009)

O nível de DO está diretamente relacionado com a temperatura, salinidade, pressão atmosférica, quantidade de matéria orgânica e presença de vegetais na água. Quando a água é aquecida ocorre uma redução na capacidade de armazenar oxigênio e a salinidade aumenta (Figura 5). A capacidade de utilização de oxigênio é afetada pelo pH, quanto menor o pH, menor é a utilização do oxigênio. O consumo de  $O_2$  é variável de acordo com a biologia do organismo incluindo a espécie, tamanho, idade, peso, consumo energético, alimentação, temperatura e etc (Morales, 1983).

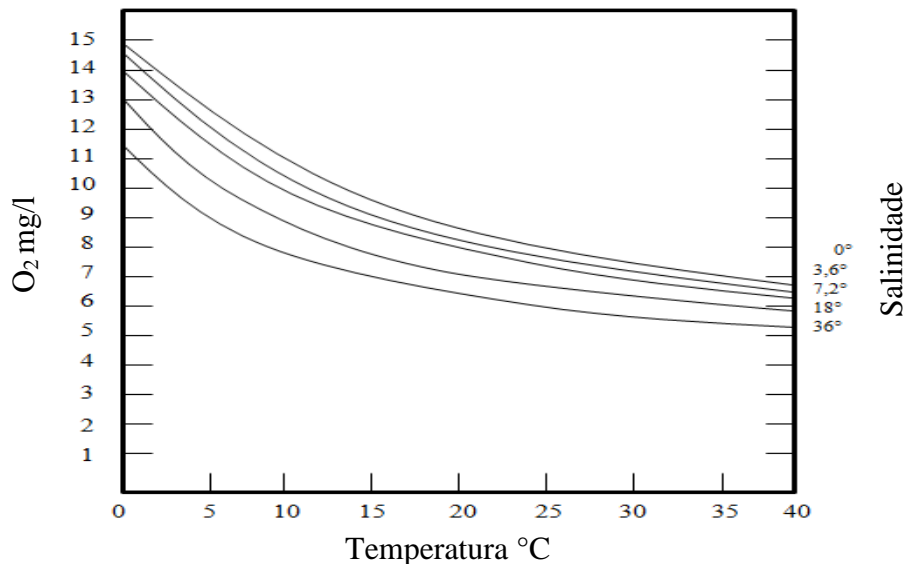


Figura 5 - Variação da solubilidade do oxigênio em água em relação à temperatura e salinidade.  
(Adaptado: Morales, 1983)

### 1.2.1 Efeitos da variação do oxigênio dissolvido

Em sistemas de aquicultura o crescimento depende de um conhecimento das peculiaridades de cada espécie. Para conseguir se aproximar do crescimento ótimo algumas variáveis devem ser controladas como: temperatura, regimes de luz, qualidade da água e os tipos de nutrientes contidos nas rações (Weatherley & Gill, 1989).

A procura por alimento e assimilação de nutrientes está diretamente ligada com a disponibilidade de oxigênio canalizada para o metabolismo. Com concentrações baixas de oxigênio dissolvido, o resultado é a redução na taxa de crescimento e a possibilidade de aumento de doenças (Figura 6) (Tom, 1998). Estudos defendem que quando se mantem os níveis baixos de DO ocorre um grande efeito no crescimento do peixe e aumento de estresse (variações de cortisol e glucose), diminuição de atividades natatórias e redução do sistema imunitário.

Randolph e Clemens (1976) estudaram a variação de temperatura e oxigênio em peixes gatos. Quando o oxigênio diminuía abaixo de 59% os peixes começavam a perder o apetite. Para Jobling (1995) a espécie *Oncorhynchus mykiss* reduz seu apetite abaixo de 60%. Outros estudos mostram resultados semelhantes como: *Dicentrarchus labrax* (Thetmeyer *et al.* 1999), *Oreochromis aureus* (Papoutsoglou e Tziha, 1996), *Ictalurus punctatus* (Buentello *et al.* 2000), *Cyprinus carpio*. (Pichavant *et al.* 2001).

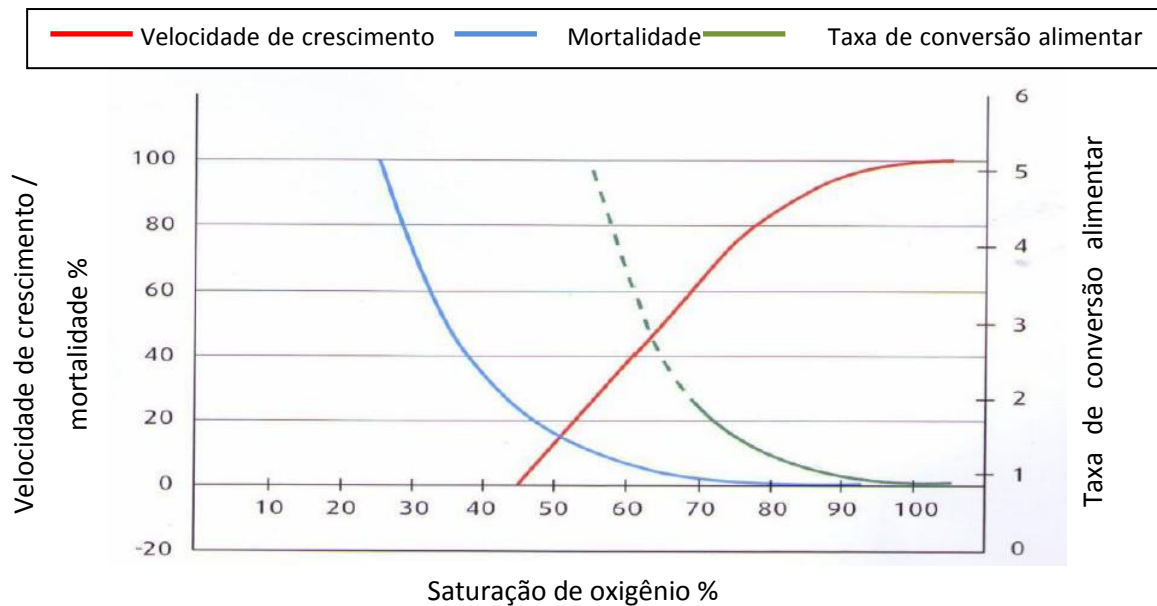


Figura 6 - Efeito do nível de oxigênio no crescimento, taxa de conversão e mortalidade. (Adaptado: Mallaya, 2007)

#### 1.2.1.1 Baixos níveis de oxigênio (Hipóxia)

Um déficit na concentração de oxigênio reduz a atividade metabólica para níveis básicos de sobrevivência (Figura 7). Pequenas reduções no DO, abaixo do mínimo limite para a espécie, pode diminuir a eficiência da conversão alimentar e a taxa de crescimento (Morales, 1983; Stickney, 2000). Quando ocorre uma redução da concentração do oxigênio dissolvido a ponto de afetar as funções de osmorregulação denomina-se hipóxia.

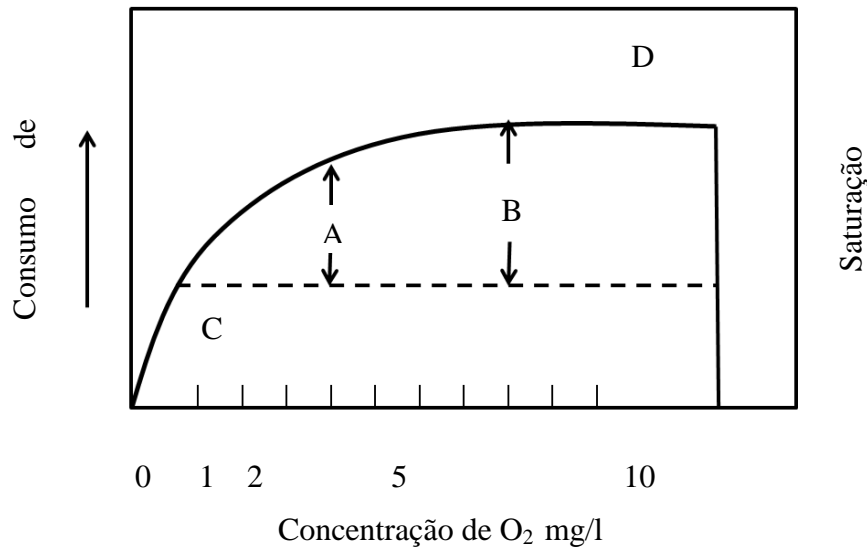


Figura 7 - Dependência da atividade animal em relação com a concentração de oxigênio. (A) Nível de atividade restringida. (B) Nível de completa atividade. (C) Nível de mínima atividade. (D) Nível de saturação a partir dele é possível acontecer doenças das bolhas. (Adaptado: Morales, 1983).

Existem várias formas do peixe responder a uma diminuição significativa do nível de oxigênio. O fluxo de sangue pode ser aumentado através da abertura adicional das lamelas secundárias para aumentar a área respiratória efetiva. Assim pode ocorrer o aumento da concentração de glóbulos vermelhos e uma maior capacidade de transporte de oxigênio do sangue. Outra forma é através da redução do tamanho do plasma (Ex. Aumento do fluxo de urina) em curto prazo, e em longo prazo é liberado glóbulos adicionais do baço (Svobodova et al. 1993). Enquanto isso ocorre, o peixe aumenta a taxa de ventilação a fim de trazer mais água em contato com as guelras. Contudo uma ventilação aumentada ocorrerá em um aumento das substâncias tóxicas na água e conseqüentemente nas brânquias, onde podem ser absorvidas (Boyd e Tucker, 1998). Estudos ainda mostram que a hipóxia prolongada pode induzir a redução de energia e a demanda de oxigênio. Isto deve-se a alterações morfológicas nas brânquias, nomeadamente a hiperplasia.

Referente ao comportamento dos peixes, ocorre uma redução na alimentação, ficam concentrados na superfície da água ou próximo dos aeradores, podem saltar para fora da água, ficam sem reação a estímulos. Com a diminuição da alimentação ocorre um comprometimento do crescimento, desta forma a reprodução é inibida. Para a redução de energia, o peixe procura áreas com temperatura mais baixa, reduzindo o metabolismo.

#### *1.2.1.2 Altos níveis de oxigênio (Hiperóxia)*

Altos níveis de oxigênio também podem ser observados em sistemas de aquicultura, este fenômeno dá-se quando a saturação do oxigênio dissolvido é muito alto, acima de 80%. Este tipo de aumento pode ser promovido por uma biomassa significativa de plantas (algas e macrófitas) deixando os níveis maiores que os da atmosfera. Outra forma de acontecer a hiperóxia seria por injeção de oxigênio em sistemas intensivos, com altas densidades (Stickney, 2000).

Uma resposta comum a grande disponibilidade de oxigênio é a hipercapnia, um estresse comum em tanques com altas densidades. Com a respiração acelerada dos peixes ocorre uma excreção de  $\text{CO}_2$ , esse é hidratado resultando em ácido carbônico que em parte se dissocia para  $\text{H}^+$  e  $\text{HCO}^{-3}$  diminuindo o pH da água. Em longo prazo ocorrem implicações fisiológicas entre a regulação das concentrações iônicas e os ácidos bases associados com a hipercapnia (Mallaya, 2007).

Os peixes que são expostos a baixas pressões atmosféricas, o sangue equilibra-se com o excesso de pressão na água. Bolhas são formadas no sangue, podendo bloquear a circulação em capilares e nadadeiras dorsal e caudal (Mallya, 2007).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Desenho experimental

#### *Ensaio 1: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)*

O ensaio foi realizado com o cultivo de dourada em três densidades: 5 kg/m<sup>-3</sup>, 10 kg/m<sup>-3</sup> e 20 kg/m<sup>-3</sup>, durante 60 dias. Os peixes foram distribuídos, de acordo com as densidades, em tanques de fibra de vidro circulares de 1,5 m<sup>3</sup> (Figura 8). Cada tratamento foi realizado em duplicado (n = 2), num sistema aberto de circulação com água captada da Ria Formosa e filtrada por um filtro de areia.

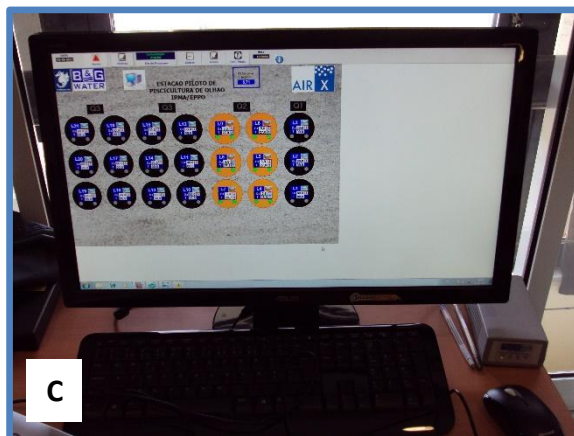
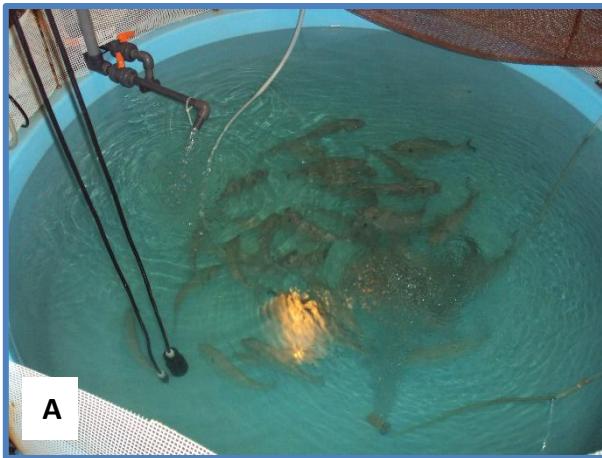


Figura 8 – Tanque de fibra de vidro com 1,5m<sup>3</sup> em sistema aberto de circulação de água.

Os peixes foram alimentados três vezes por dia com a dieta Sorgal<sup>®</sup> (Aquasoja Balance 5mm). Para ter certeza de que a alimentação não foi um fator limitante, os peixes foram alimentados em 1,1 a 1,4% do peso corporal, seguindo a tabela de alimentação do fabricante,

além de um acréscimo de até 50% (por exemplo: de acordo com tabela de 100 g, portanto 100g + 50 g = 150 g).

O oxigênio e temperatura foram registrados automaticamente a cada hora, através do sistema Synergia® (Figura 9). Este sistema é composto por sondas de temperatura e oxigênio, eletroválvulas, caudalímetros, quadro com os dados atuais e um programa de computador. Através do programa, no computador pode-se definir limites de injeção e pausa de oxigênio, transferir os dados para o Excel e visualizar gráficos entre outras funções. O sistema foi programado para injetar oxigênio puro quando o limite atingia os 35 % e parava ao chegar nos 50%, de modo a evitar a mortalidade dos peixes. Foram recolhidas amostras de água 2 semanas após o início do ensaio, posteriormente foram coletadas todas as semanas para controlar as concentrações de amônia, nitritos e nitratos. A salinidade permaneceu em torno de 36. Os peixes foram mantidos em fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas escuro durante todo o período do



experimento.

Figura 9 – Sistema de Synergia<sup>®</sup>: (A) Sondas de temperature e oxigênio, (B) quadro com medições em tempo real e controle de injeção de oxigênio, (C) programa de registro dos dados.

Procedeu-se amostragens inicial, intermediária e final para acompanhar as taxas de crescimento, saúde e mortalidade. Também foram coletadas amostras de sangue dos peixes para fins hematológicos (hematócrito e esfregaço) e determinações plasmáticas (glicose, cortisol, proteína e lactato). Na amostragem final, o segundo arco branquial foi coletado para análises histológicas.

## *2.2 Desenho experimental*

*Ensaio 2: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)*

Três níveis de oxigênio dissolvido foram testados (em duplicado  $n = 2$ ): 40-60 %, 60-80 % e 80-100 % em tanques de fibra de vidro de  $1,5 \text{ m}^3$  com peixes em densidade de  $10 \text{ kg/m}^3$ , durante 30 dias. Foi utilizado o sistema de circulação aberta de água no tanques. Os níveis de oxigênio foram mantidos através da combinação da renovação da água, aeração (com pedras de ar) e, eventualmente, a injeção de oxigênio puro para manter condições de criação idênticas entre os tratamentos. Os peixes foram alimentados três vezes por dia, com uma dieta, Alpis® (5 mm), de 1,1 a 1,4% de peso corporal de acordo com a tabela de alimentação do fabricante.

O oxigênio e temperatura foram registrados automaticamente a cada hora através do sistema Synergia®, utilizado também para injetar oxigênio puro quando o tratamento encontrava-se no limite de oxigênio dissolvido. Foram recolhidas amostras de água 2 semanas após o início do ensaio, posteriormente foram coletadas todas as semanas para controlar as concentrações de amônia, nitritos e nitratos. A salinidade permaneceu em torno de 36‰. Os peixes foram mantidos em fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas escuro durante todo o período do experimento.

Procedeu-se amostragens inicial e final para verificar as taxas de crescimento, saúde e mortalidade. Também foram coletadas amostras de sangue dos peixes para fins hematológicos (hematócrito, esfregaço e hemoglobina) e determinações plasmáticas (glicose, cortisol, proteína e lactato). Na amostragem final, o segundo arco branquial foi coletado para análises histológicas.

## *2.3 Componente analítica*

### *2.3.1 Parâmetros zootécnicos*

O crescimento da dourada foi avaliado pela determinação da taxa de crescimento específico (TCE), o índice de crescimento diário (ICD), crescimento com unidade térmica (CUT) e taxa de conversão alimentar (TCA), com base nas seguintes fórmulas:

$$TCE = \frac{(\ln wf - \ln wi)}{tf - ti} \times 100$$

$$ICD = \frac{wf^{\frac{1}{3}} - wi^{\frac{1}{3}}}{tf - ti} \times 100$$

$$TGC = \frac{wf^{\frac{1}{3}} - wi^{\frac{1}{3}}}{\sum TD} \times 100 \quad \text{CUT}$$

$$TCA = \frac{\text{Ração}}{\text{Ganho da}}$$

*Lnwf= Logarítimo do peso final*

*Lnwi= Logarítimo do peso inicial*

*Wf= Peso final*

*Wi= Peso inicial*

*Tf= Temperatura final*

*Ti= Temperatura inicial*

*∑TD= Somatório das temperaturas diárias*

### 2.3.2 Qualidade da água

A temperatura da água e pH foram registrados quando as amostras de água foram coletadas. O nutrientes (amônia, nitritos e nitratos) foram analisados por reações colorimétricas baseadas no método desenvolvido por Grasshoff (1976), usando um SKALAR Autoanalyser 6250.

### 2.3.3 Coleta de sangue

Os peixes foram profundamente anestesiados com fenoxietanol (300 ppm), o sangue foi coletado por punção na veia caudal com agulha e seringa heparinizada. A coleta de sangue foi realizada em dez indivíduos por tratamento no ensaio de densidades dos peixes e doze indivíduos por tratamento no ensaio dos níveis de oxigênio.

### 2.3.4 Análises hematológicas

Uma gota de sangue foi utilizada para o esfregaço, que foi posteriormente fixada com álcool metílico e corada com Giemsa para uma identificação qualitativa das células sanguíneas (vermelha e branca), sob um microscópio binocular de 400x seco ao ar. Cinco áreas aleatórias do esfregaço foram analisadas para cada peixe sob um microscópio para determinar a proporção de glóbulos vermelhos e brancos para cada indivíduo. Valores foram apresentados como percentagem do número total de células contadas. Valor hematócrito também foi determinado por carregar amostra de sangue em tubos de micro-hematócrito (tubos capilares lisas, 75 mm, Super Rior, W. - Alemanha), que foram centrifugados (5 000 g, 5 min) com centrífuga (EBA 21 Hettich, Alemanha).

#### *2.3.5 Parâmetros plasmáticos*

O sangue restante foi centrifugado para se obter o plasma a 2500 g durante 10 minutos e posteriormente congelado a -20 ° C até à análise. Foi feito um “pool” do plasma de 2 (1° ensaio) e 3 (2° ensaio) peixes para aumentar o volume do plasma e permitir a determinação dos diferentes parâmetros plasmáticos.

O cortisol foi determinado com o teste VIDAS, um ensaio de enzima fluorescente desenhada para o sistema miniVIDAS. A glicose e hemoglobina foram determinados com kits de QCA. O lactato foi determinado com um kit de SPINREACT. A proteína total foi determinada pelo kit BCA do método Bio-Rad. Todos os parâmetros plasmáticos foram determinados com triplicados analíticos, através de leituras de reações colorimétricas em um leitor de microplacas (Thermo Scientific) no comprimento de onda específico, exceto o cortisol.

#### *2.3.6 Histologia da brânquia*

As brânquias foram fixadas em formol tamponado a 4% por 24 horas. Após este período os tecidos foram lavados 3 x 15 min com tampão fosfato salina, água e armazenadas em etanol a 70% até a incorporação da parafina. Quando necessário, os tecidos foram descalcificados com

uma solução de ácido de HCl 8 % e ácido fórmico a 8 % (1:1). Cortes de 6-7µm foram corados com hematoxilina-eosina.

### 2.3.7 Análise estatística

Os dados das taxas de crescimento e parâmetros sanguíneos foram expressos em três replicados  $\pm$  desvio padrão, enquanto os dados hematológicos são baseados em seis determinações. Dados associados à ao crescimento, hematologia e parâmetros sanguíneos foram analisados por ANOVA (one-way), com densidade de peixes como variável. Parâmetros expressos em porcentagem foram submetidos à transformação do arco seno da raiz quadrada. A significância estatística foi testada em 0,05 de probabilidade. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS (v21, IBM , EUA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)

Tabela 2 – Distribuição das densidades e os códigos dos tanques.

Tratamento	5kg/m <sup>3</sup>		10kg/m <sup>3</sup>		20kg/m <sup>3</sup>	
Código/Tanque	L5	L6	L4	L8	L7	L9

#### 3.1.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água

A amplitude térmica da água foi de 8 °C, variando de 17 °C (30 de abril) a 25 °C (14 de junho), de forma similar em todos os tratamentos (Figura 10). O valor da média da temperatura em todos os tratamentos foi  $21,6 \pm 2.0$  °C, com uma variação maior nos vinte primeiros dias de experimento.

Existe influência da temperatura da água no oxigênio dissolvido, visível em todos os tratamentos. Há um padrão na variação de oxigênio, porém com diferenças entre as densidades de peixe. Os tratamentos com  $5\text{kg/m}^3$  e  $10\text{kg/m}^3$  possuem valores de oxigênio similares quando comparados ao de  $20\text{kg/m}^3$ . A maior diferença na variação de oxigênio ocorreu entre os tratamentos de  $5\text{kg/m}^3$  e  $20\text{kg/m}^3$ , respectivamente com 60% a 78% e 50% a 70%. A diferença entre estes tratamentos se manteve em 10%, excedendo os 10% em junho, devido ao aumento da temperatura e biomassa.

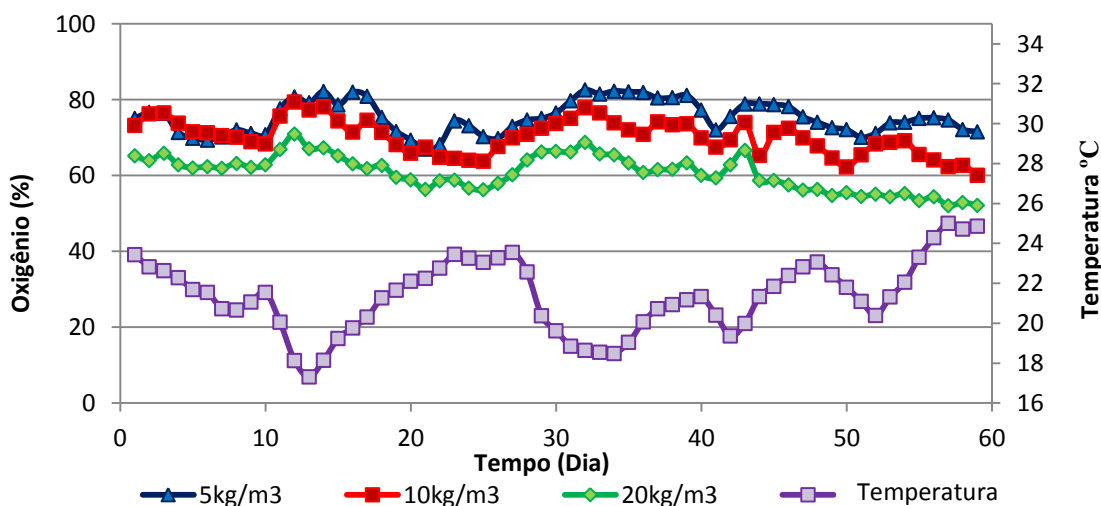


Figura 10 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 60 dias de ensaio, em diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg.m<sup>-3</sup>).

Os dias de menor (17 °C) e maior temperatura da água (25 °C) foram escolhidos para a análise da variação de oxigênio e temperatura (Figura 11).

O valor mais baixo de temperatura da água (17 °C) ocorreu duas semanas após o início do experimento. O padrão de variação, durante o dia, foi idêntico em todos os tratamentos,

com uma diminuição de oxigênio até cerca de metade do dia, seguido de um aumento até as 20 horas quando se estabiliza. Os valores de oxigênio do tratamento 20kg/m<sup>3</sup> são 10% menores que os tratamentos de 5kg/m<sup>3</sup> e 10kg/m<sup>3</sup>. As médias de oxigênio são respectivamente 79.2 ± 2.2%, 77.3 ± 0.6%, 67.1 ± 0.6%, para 5, 10 e 20 kg/m<sup>-3</sup>.

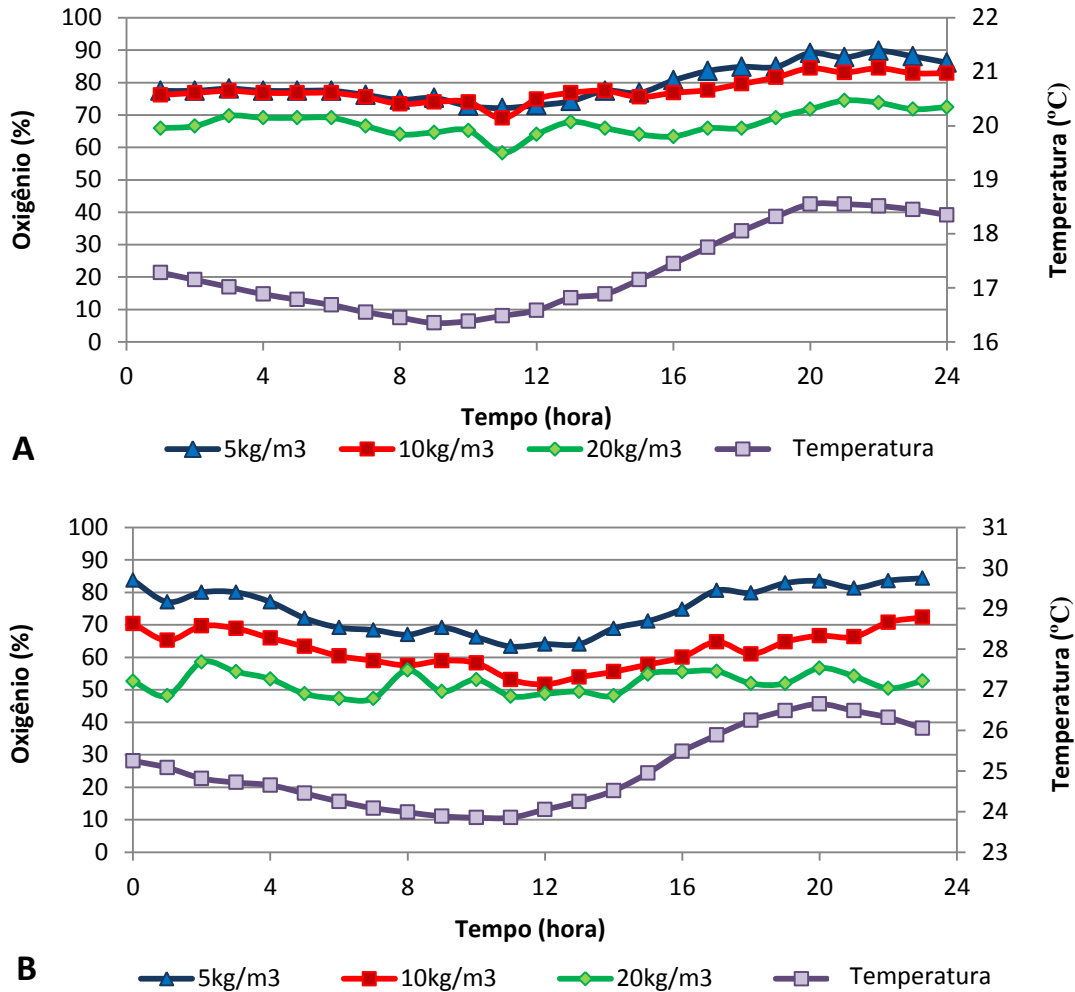
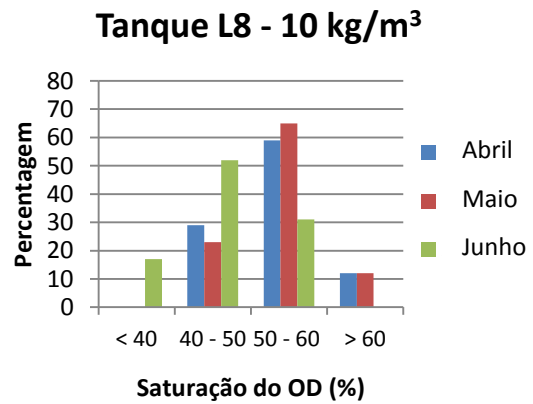
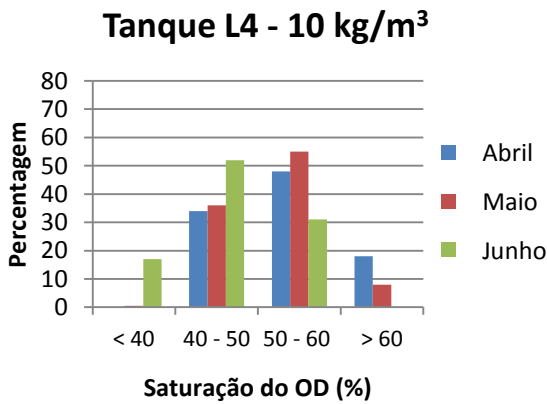
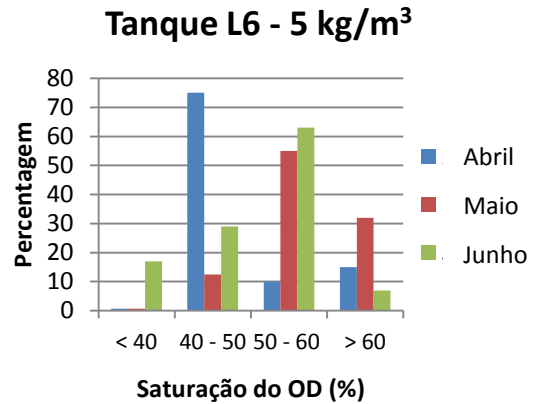
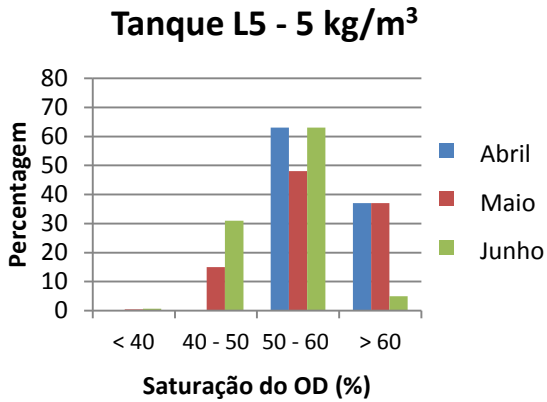


Figura 11 – Variação de oxigênio e temperatura durante 24 horas no dia mais frio (A) (30 de abril - 17 °C) e mais quente (B) (14 de junho - 25 °C) do experimento com diferentes densidades de douradas (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>).

No registro mais alto da temperatura da água, o oxigênio variou de acordo com a densidade dos peixes. O tratamento de maior densidade (20 kg/m<sup>-3</sup>), manteve seus níveis de oxigênio de forma estável, durante o ciclo de 24 horas. Nos demais tratamentos (5 e 10 kg/m<sup>-3</sup>)

existe uma diminuição do oxigênio dissolvido nas primeiras 12 horas, seguido por um aumento. As médias dos tratamentos são respectivamente  $74.7 \pm 1.53\%$ ,  $62.3 \pm 0.17\%$ ,  $52.1 \pm 1.53\%$  para baixa, média e alta densidades.



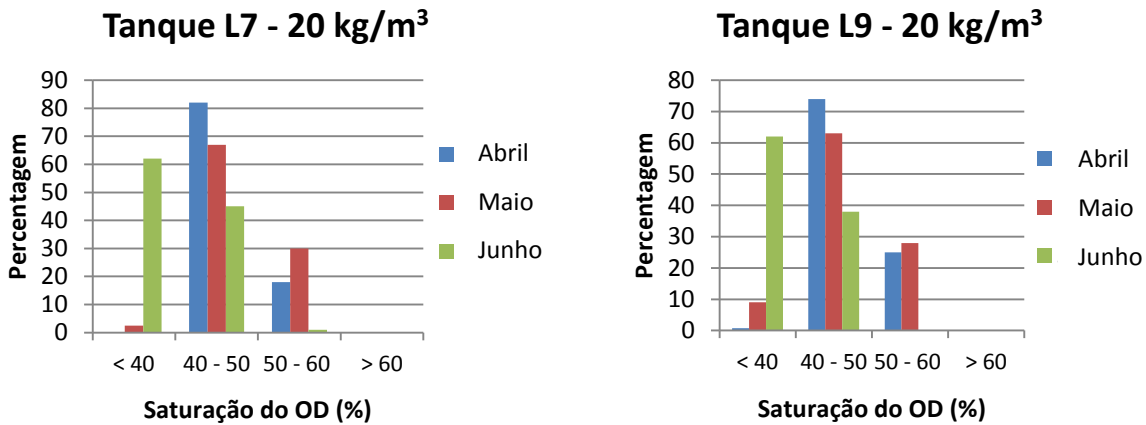


Figura 12– Frequência da concentração do oxigênio dissolvido nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

A concentração do oxigênio dissolvido é muito baixa durante as duas últimas semanas de (junho), com ponto mais crítico no tratamento 20kg/m<sup>3</sup> (Tanques L7 e L9). Neste período 62% dos registros estão na classe 30-40% de oxigênio dissolvido (Figura 12).

Para manter os níveis de segurança (acima de 35%), foram utilizadas garrafas 4 garrafas de 180 L de oxigênio puro. Não houve nenhuma utilização deste recurso no tratamento de baixa densidade, cerca de 90% do oxigênio puro, foi consumido pelo tratamento de maior densidade (Figura 13).

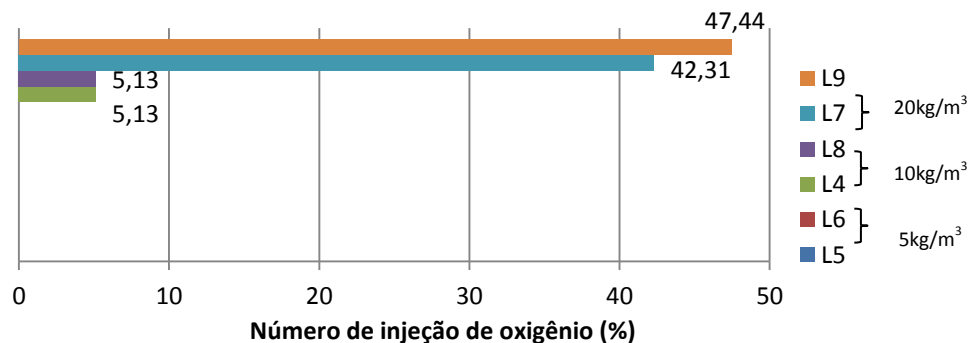


Figura 13 – Percentagem de ativação do sistema de injeção de oxigênio, acionado quando os níveis de oxigênio dissolvido encontravam-se no limite (35%).

A variação do oxigênio dissolvido acompanha a densidade dos tratamentos, porém com uma pequena exceção entre as densidades 20kg/m<sup>3</sup> (tanque L7) e 10kg/m<sup>3</sup> (tanque L4) após a limpeza dos filtros. Em geral os níveis de oxigênio dissolvido reduzem após a alimentação e a pausa de água para limpeza dos filtros. No tratamento de maior densidade, a diminuição de oxigênio após estes eventos acontece de forma mais abrupta (Figura 14).

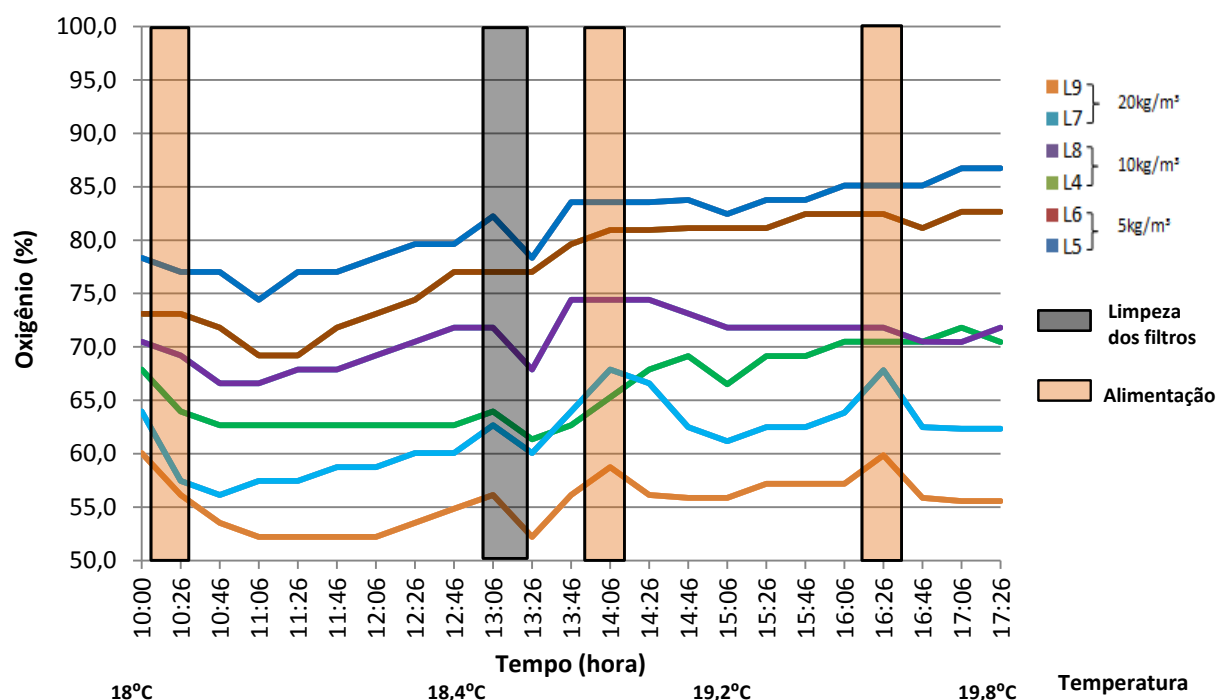


Figura 14 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura, durante os procedimentos cotidianos (alimentação e limpeza dos filtros), nas diferentes densidades de douradas (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>).

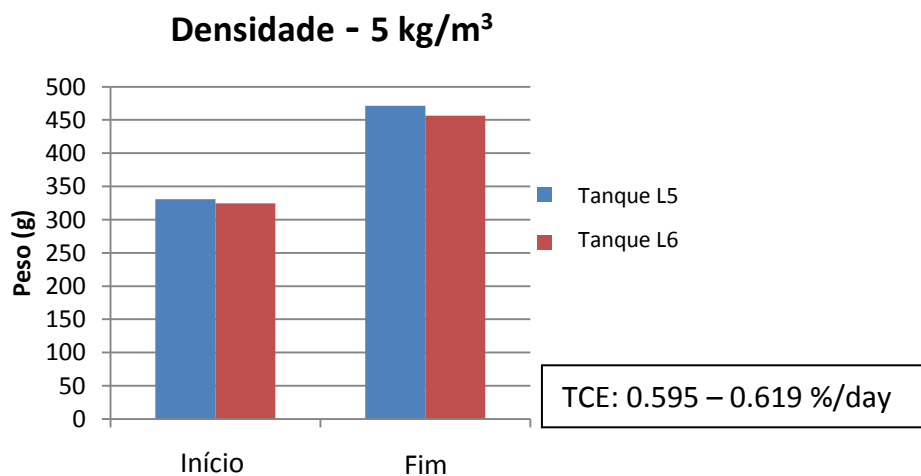
### 3.1.2 Parâmetros Zootécnicos

Durante o período de experimento apenas 2 peixes do tratamento de maior densidade morreram. Estes valores foram subtraídos da biomassa inicial para obter o TCA e ganho mais reais. No início do experimento, as médias de peso entre os tratamentos foram entre 325 e

327g (tabela 3), com uma variação de 4% por tanque. O ganho final foi respectivamente de 41, 44% e 40% para baixa, média e alta densidade. A dispersão dos pesos aumentou 7% de forma semelhante em todos os tratamentos.

Tabela 3 – Perfil do crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias de experimento.

Parâmetro	5 kg/m <sup>-3</sup>	10 kg/m <sup>-3</sup>	20 kg/m <sup>-3</sup>
Peso inicial (g)	325.4± 7.3	327.4 ± 0.2	326.9± 0.6
Peso final (g)	459.3 ± 17.0	470.8 ± 5.0	458.9 ± 3.3
n de peixe	23	46	93
Ganho (kg)	3.1 ± 0.2	6.6± 0.2	11.8 ± 0.4
TCE (%.dia <sup>-1</sup> )	0.57 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.01
ICD	0.74 ± 0.05	0.80 ± 0.03	0.73 ± 0.01
CUT	6.4 ± 0.5	6.8 ± 0.3	6.2 ± 0.1
TCA	2.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.5 ± 0.0



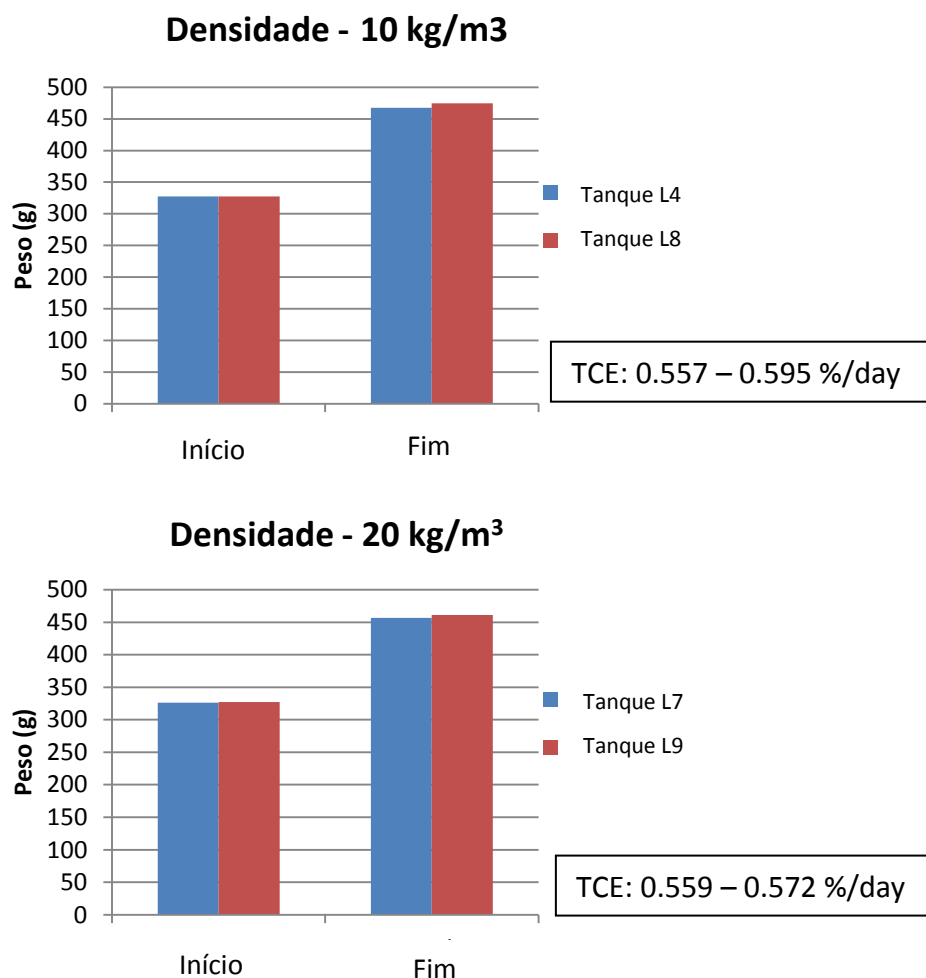


Figura 15 – Média da taxa de crescimento de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

### 3.1.3 Qualidade da água

A amônia total possui um padrão similar para todos os tratamentos durante todo experimento, porém os valores estão diretamente relacionados com a densidade dos peixes por tanque (Figura 16).

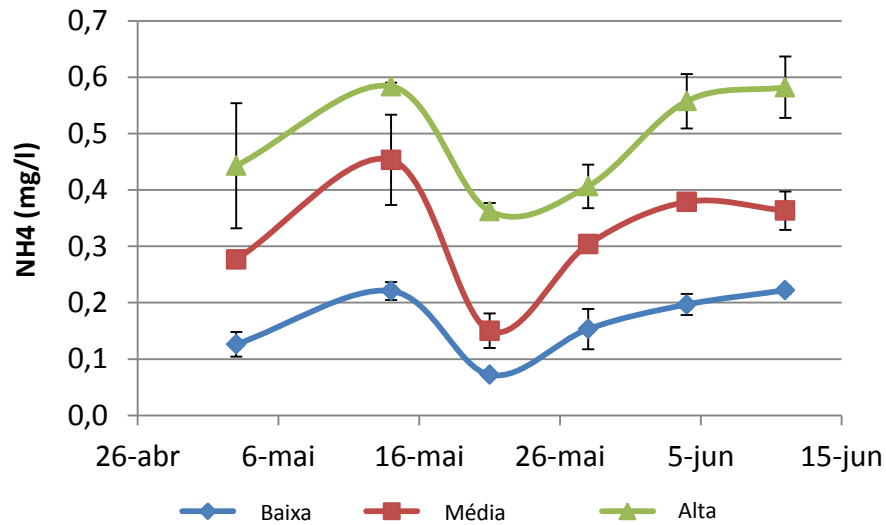


Figura 16 – Variação da amônia total nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

A temperatura da água e o pH afetam a forma predominante da amônia, ionizada (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou não ionizada (NH<sub>3</sub>), forma mais tóxica. Para determinar a amônia não ionizada (Figura 17), além da coleta de água, foi medido o pH (variou entre 7,7 e 8,2) e a temperatura (variou entre 19-23 °C).

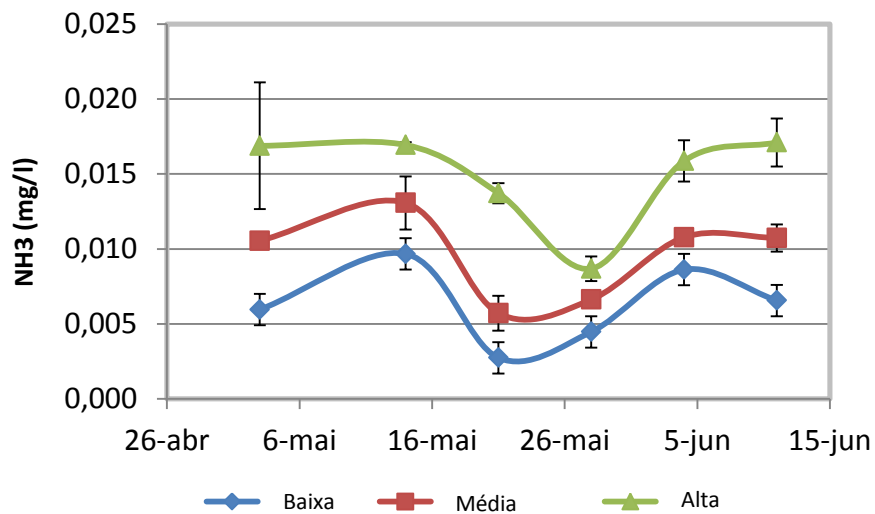


Figura 17 – Variação da amônia não ionizada, nos tanques de diferentes densidades de dourada (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), num período de 60 dias.

Os valores de NH<sub>3</sub> tiveram um padrão semelhante ao NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com valores altos em relação ao aumento da densidade. Os valores obtidos são considerados aceitáveis (máximo 0,016 mg/l<sup>-1</sup>), abaixo de 0,05 mg/l<sup>-1</sup>, valor considerado tóxico que podem danificar as brânquias.

Tabela 4 - Relação entre oxigênio dissolvido e a amônia nos tanques de diferentes densidades.

Tratamento	Equação
<i>Baixa densidade</i>	$y = -0.0745x + 0.5858; R^2 = 0.6597$
<i>Média densidade</i>	$y = -0.1509x + 1.102; R^2 = 0.629$
<i>Alta densidade</i>	$y = -0.118x + 1.0106; R^2 = 0.5279$

### 3.1.4 Análises sanguíneas

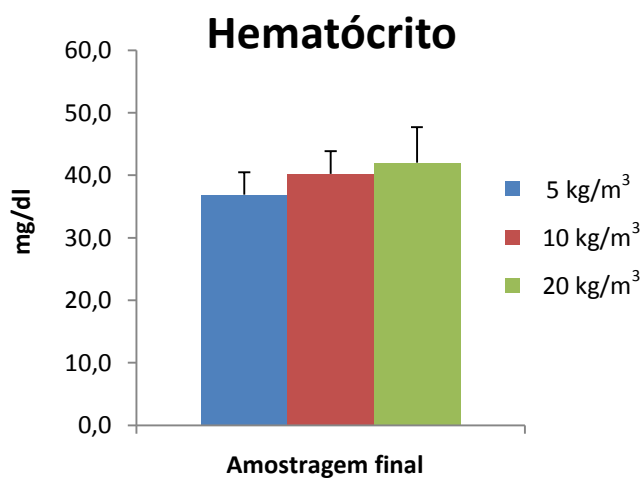


Figura 18 – Valores de hematócrito em sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias.

Apesar de não existir nenhuma diferença significativa, existe uma tendência do quanto maior a densidade, maior quantidade de hematócrito.

Tabela 5 – Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas, cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), após 60 dias.

<b>Células sanguíneas</b>	<b>5 Kg/m<sup>-3</sup></b>	<b>10 Kg/m<sup>-3</sup></b>	<b>20 Kg/m<sup>-3</sup></b>
<b>Vermelho (%)</b>	94.2 ± 2.7	91.6 ± 3.1	93.9 ± 2.4
<b>Branco (%)</b>	5.8 ± 2.7	8.4 ± 3.1	6.1 ± 2.4

Percentagens muito semelhantes de células vermelhas e brancas foram observadas nas diferentes densidades (Tabela 5). Um alto número de células brancas estão relacionadas com o sistema de defesa dos peixes.

### *3.1.5 Parâmetros plasmáticos*

Após um mês de experimento os níveis de cortisol em todos os tratamentos aumentaram, porém sem diferenças significativas entre as diferentes densidades e com alta variabilidade. Na amostragem final verifica-se um padrão em que os níveis de cortisol tendem a diminuir, sugerindo uma adaptação ao stress (Figura 19).

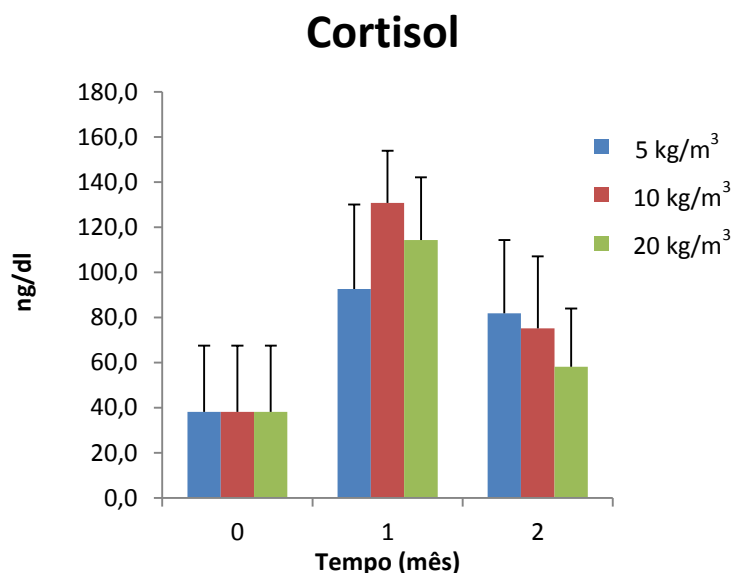


Figura 19 – Valores de cortisol no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

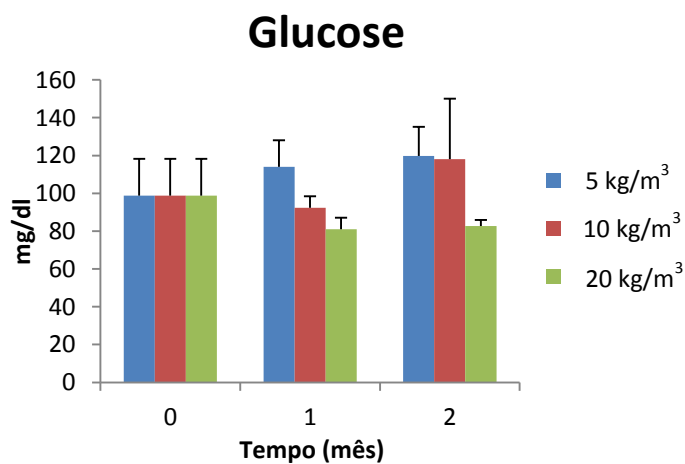


Figura 20 - Valores de glucose no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

A amostragem após um mês de experimento indica uma relação inversamente proporcional entre a glucose e a densidade dos peixes. Após dois meses de experimento, os valores de glucose dos tratamentos de densidade 5 e 20 kg/m<sup>3</sup> se mantiveram e o tratamento de densidade intermediária aumentou (Figura 20).

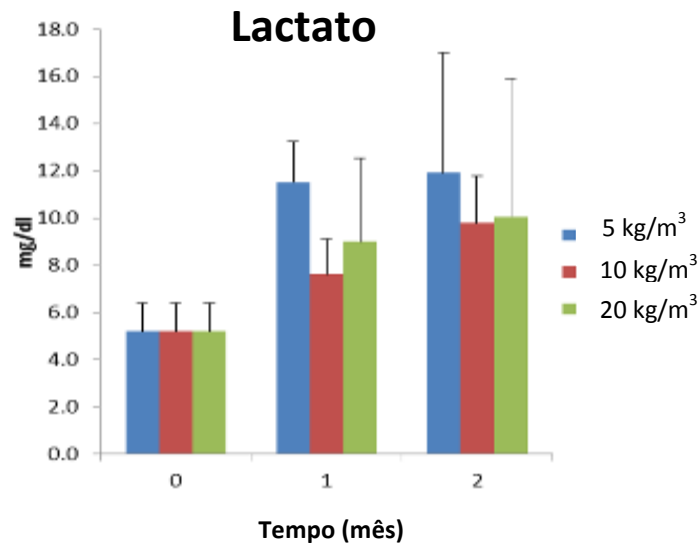


Figura 21 – Valores de lactato no plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

A concentração de lactato é semelhante nos diferentes tratamentos, aumentando no primeiro mês de experimento e se tornando constante para o segundo mês (Figura 21).

As douradas de diferentes tratamentos exibem valores similares de proteína plasmática, em todas as amostragens realizadas durante o experimento (Figura 22).

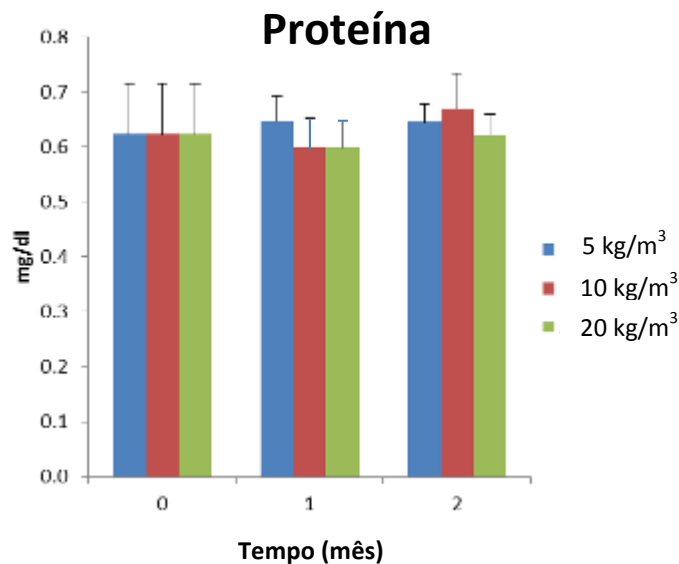


Figura 22 – Valores de proteína do plasma de douradas cultivadas em diferentes densidades (5, 10 e 20 Kg/m<sup>3</sup>), amostragem inicial, intermediária e final.

### 3.1.6 Histologia: Brânquia

A análise histológica das brânquias dos peixes em tratamento de densidade baixa mostram lâmelas primárias e secundárias saudáveis (Figura 23, 1 e 2). Danos graduais são notáveis a partir dos peixes de tratamento intermediário (23, 3 e 4). É possível notar danos no epitélio da lâmela secundária (leve congestão e hemorragia). Os peixes de alta densidade exibem lesões mais severas na lâmela secundária (Figura 23, 5 e 6).

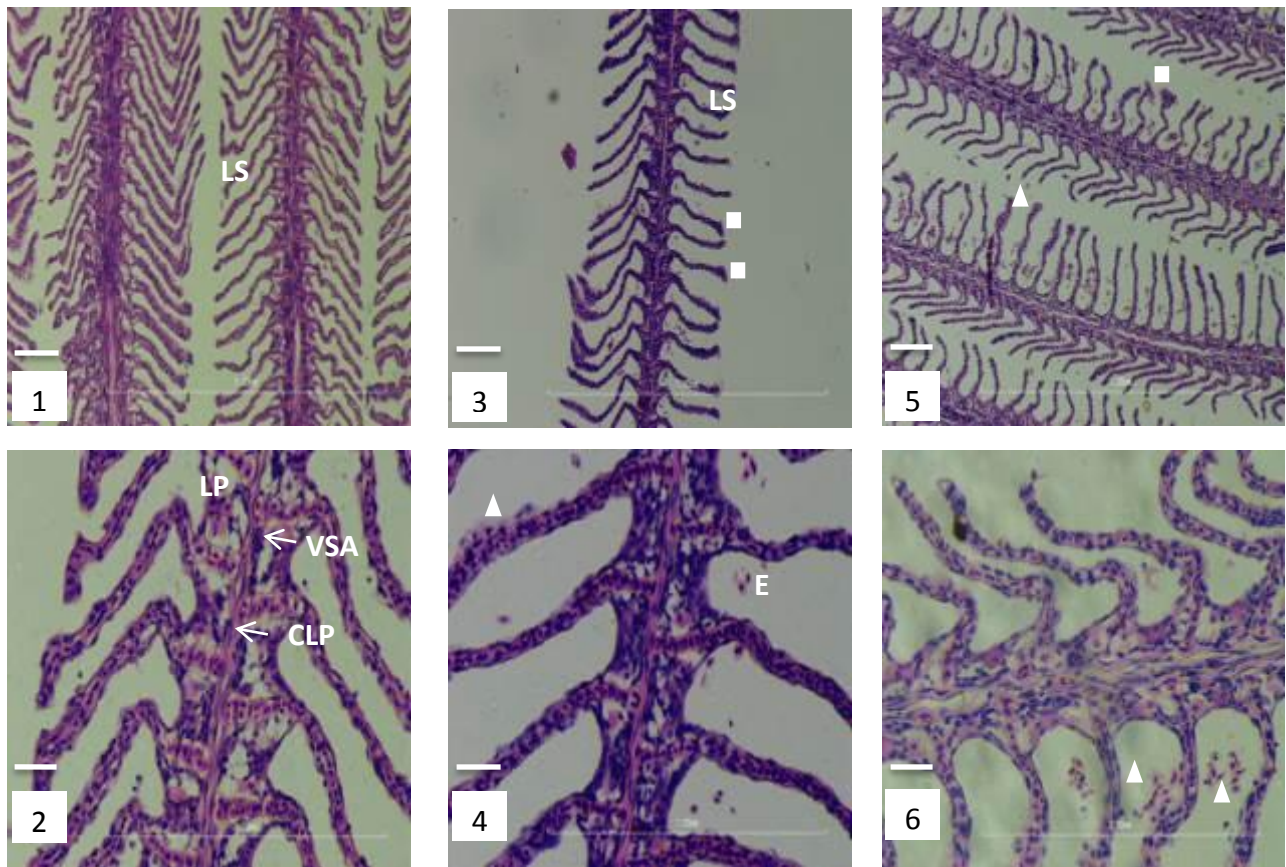


Figura 23 – Histologia (H&E) das brânquias de dourada em diferentes tratamentos de densidade. Tratamento:  $5\text{kg/m}^3$  (1 – 2),  $10\text{kg/m}^3$  (3 – 4) e  $20\text{kg/m}^3$  (5 – 6). Aumento: (10x - Barra =  $90.2\ \mu\text{m}$ ) 1, 3 e 5; (40x - Barra =  $16.7\ \mu\text{m}$ ) 2, 4 e 6. LP = Lâmelas primárias, LS = Lâmelas secundárias, VSA = Vaso sanguíneo aferente, CLP = Cartilagem da lâmela primária,  $\square$  = Eritrócito,  $\blacksquare$  = Congestão da lâmela secundária,  $\Delta$  = Lâmelas secundárias hemorrágicas.

### 3.2 Ensaio: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)

Tabela 6 – Distribuição das concentrações de oxigênio e os códigos dos tanques.

Tratamento	40-60%		60-80%		80-100%	
Código/Tanque	L4	L7	L5	L8	L6	L9

#### 3.2.1 Oxigênio dissolvido e temperatura da água

A média da temperatura da água se manteve em  $26 \pm 0.8$  °C durante todo experimento, para todos os tratamentos (Figura 24). Os níveis de oxigênio são estáveis durante ao longo do ensaio, sendo o tratamento 60-80% com um pouco mais de variação.

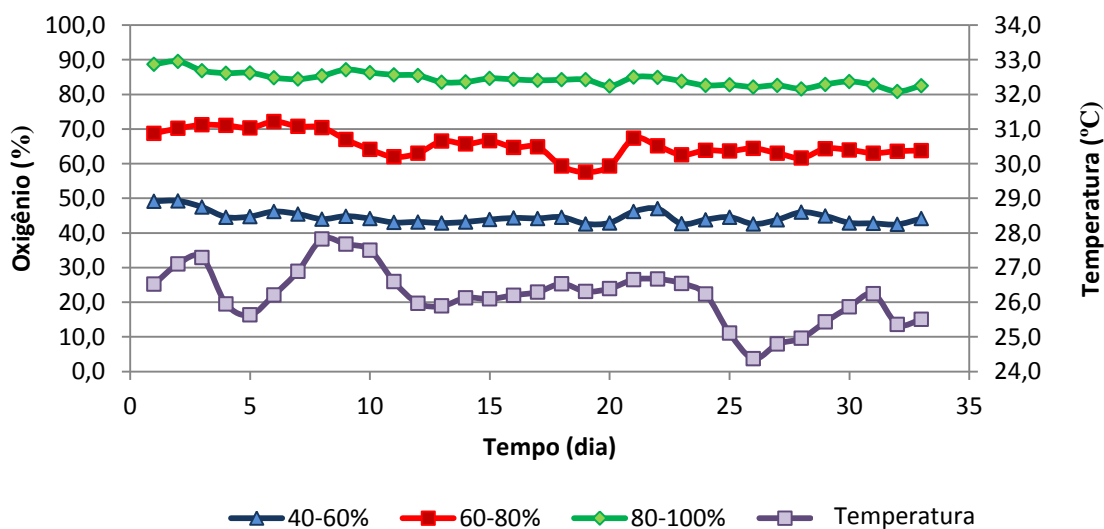


Figura 24 – Variação do oxigênio dissolvido e temperatura durante 30 dias de ensaio, em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%).

### 3.2.2 Parâmetros zootécnicos

O peso inicial das douradas foi entre 313 e 319 g (Tabela 7) com variação entre 7 e 8% entre todos os tratamentos. A amostragem final mostrou um ganho de 36, 38 e 40% de peso, respectivamente para os tratamentos 40-60%, 60-80% e 80-100%. A dispersão final é semelhante a encontrada na amostragem inicial.

Tabela 7 – Perfil da dourada em diferentes níveis de oxigênio após 30 dias de experimento.

<b>Parâmetro</b>	<b>40-60%</b>	<b>60-80%</b>	<b>80-100%</b>
Peso inicial (g)	317.1 ± 2.5	317.9 ± 7.0	313.9 ± 0.4
Peso final (g)	432.7 ± 1.3	445.1 ± 3.7	440.2 ± 5.5
n de peixe	48	48	48
Ganho (kg)	5.5 ± 0.1	5.7 ± 0.3	6.1 ± 0.2
TCE (%.dia <sup>-1</sup> )	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0
ICD	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
CUT	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.9 ± 0.2
TCA	1.52 ± 0.0	1.49 ± 0.1	1.40 ± 0.1

Os parâmetros de crescimento aumentam com maior disponibilidade de oxigênio dissolvido. Existe uma correlação de significância entre o oxigênio dissolvido e o TCE ( $y = 0.0235x + 1.0127$ ;  $R^2 = 0.6785$ ) (Figura 24).

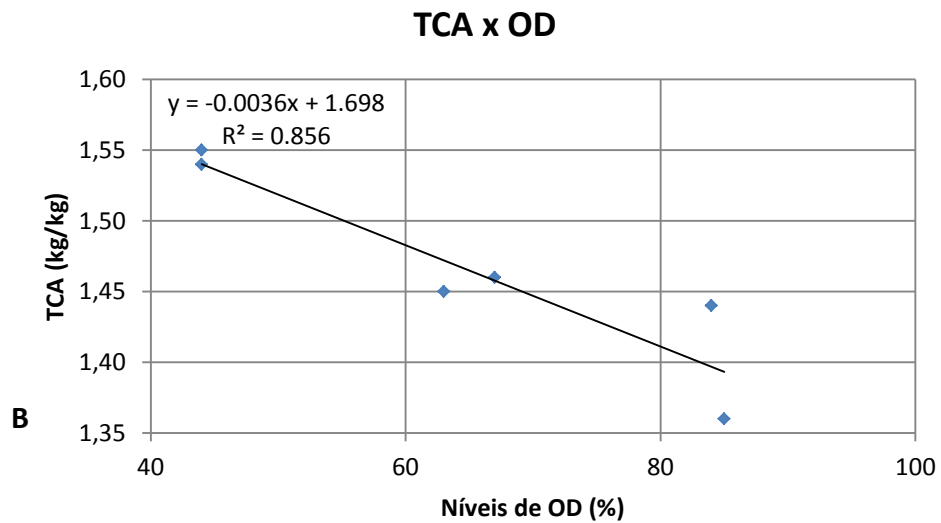
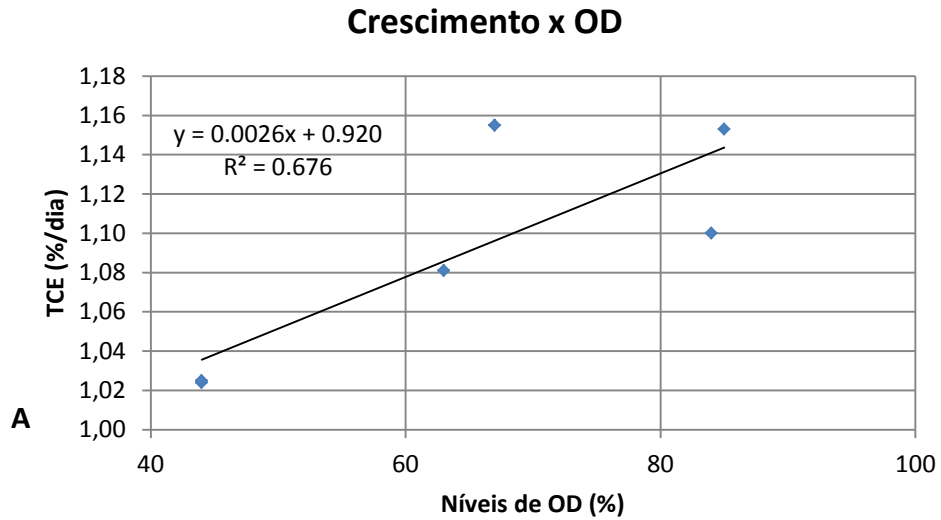


Figura 25 – (A) Relação da taxa de crescimento com o oxigênio dissolvido. (B) Relação do TCA com o oxigênio dissolvido. Experimento com douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), durante 30 dias.

Tabela 8 – TCA baseado na média das concentrações de oxigênio dissolvido, por tanque de diferentes tratamentos.

Tratamento	N. do tanque	Oxigênio dissolvido (média)	TCA com OD (média)
40-60%	4	44%	1.54
	7	44%	1.55
60-80%	5	63%	1.45
	8	66%	1.46
80-100%	6	84%	1.44
	9	84%	1.36

### 3.2.3 Qualidade da água

Existe um padrão semelhante de NH<sub>4</sub> (Amônia total) para todos os tratamentos durante a realização do experimento (Figura 26). O valores mais baixos de NH<sub>4</sub> foram registrados para o tratamento 80-100% de oxigênio dissolvido. Os valores mais altos de NH<sub>4</sub> foram obtidos do tratamento 40-60% de oxigênio dissolvido, nas duas últimas amostragens. Na primeira amostragem o tratamento 60-80% exibiu maior valor de NH<sub>4</sub>. Todos os valores de NH<sub>4</sub> estão dentro do permitido para a espécie.

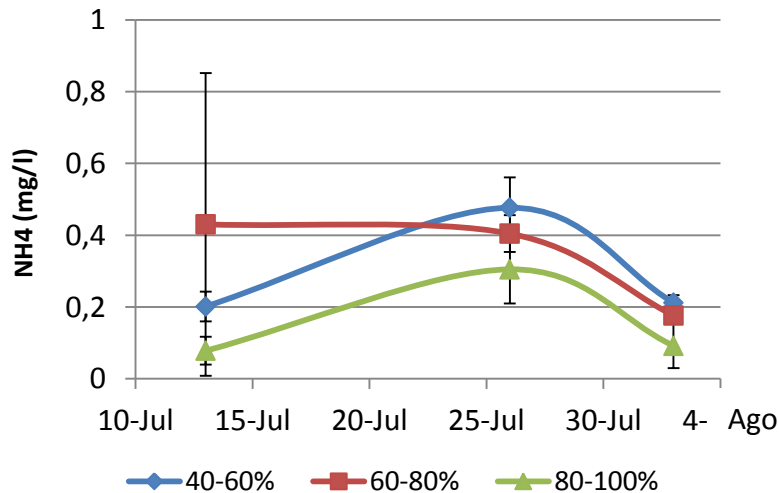


Figura 26 – Variação da amônia total nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.

Os valores mais baixos de NH<sub>3</sub> foram do tratamento 80-100%, os mais altos ocorreram no tratamento intermediário (60-80%), com exceção da última amostragem em que o tratamento 40-60% obteve mais NH<sub>3</sub> (Figura 27). O pH da água variou entre 7,5 e 7,8 (26 °C) entretanto o NH<sub>3</sub> foi mantido em níveis seguros para dourada (< 0,05 mg/L<sup>-1</sup>).

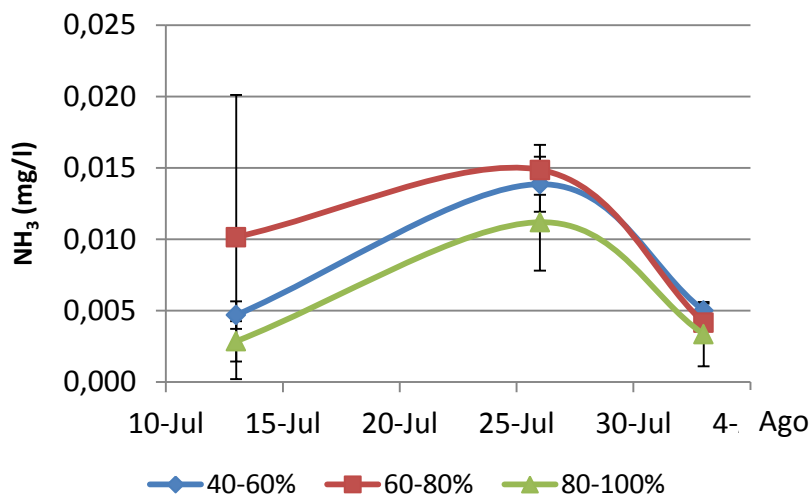


Figura 27 – Variação da amônia não ionizada nos tanques de diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), num período de 30 dias.

Tabela 9 – Relação entre oxigênio dissolvido e amônia total nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Equação
40-60%	$y = -0.5597x + 1.9012; R^2 = 0.8166$
60-80%	$y = -0.2762x + 1.5108; R^2 = 0.8885$
80-100%	$y = 0.2255x - 1.1119; R^2 = 0.0183$

### 3.2.4 Análises sanguíneas

Foram observados valores significativamente elevados de hematócrito com o decréscimo da concentração de oxigênio. Isto indica uma adaptação da fisiologia da dourada em relação a diminuição dos níveis de oxigênio (Figura 28).

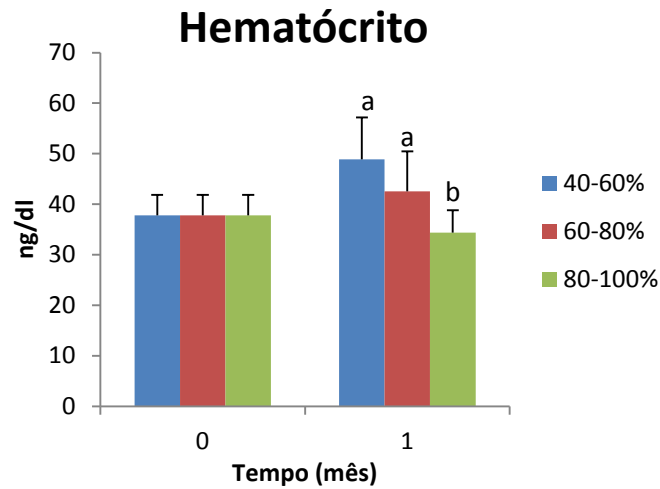


Figura 28 – Valores de hematócrito em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Existe uma leve variação das células brancas dos peixes no tratamento 40-60% de oxigênio dissolvido (Tabela 10). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, este resultado sugere que alguns indivíduos estavam enfrentando uma infecção leve.

Tabela 10 – Percentagem de células vermelhas e brancas no sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio, após 30 dias.

Células sanguíneas	40-60%	60-80%	80-100%
Vermelha (%)	96.8 ± 2.1	99.3 ± 0.7	99.5 ± 0.3
Branca (%)	3.2 ± 2.1	0.7 ± 0.7	0.5 ± 0.3

Embora os valores da hemoglobina não apresentem diferenças significativas, existe uma tendência de aumento de hemoglobina com a diminuição da disponibilidade de oxigênio (Figura 29).

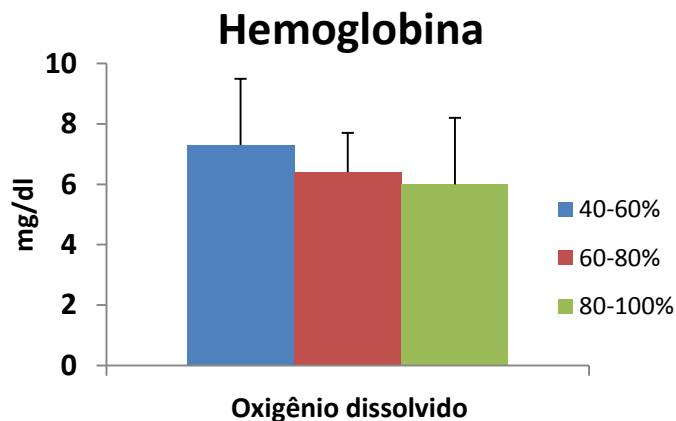


Figura 29 – Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), após 30 dias.

### 3.2.5 Parâmetros plasmáticos

As douradas submetidas aos diferentes níveis de oxigênio, exibem valores similares de cortisol no fim do experimento. Isto indica uma adaptação aos diferentes tratamentos, fazendo com que os níveis de cortisol diminuam em relação ao nível inicial (Figura 30).

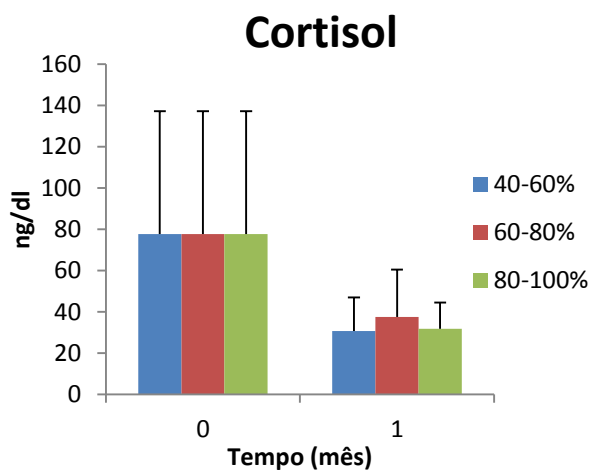


Figura 30 – Valores de hemoglobina em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

A glucose plasmática manteve-se constante nos diferentes níveis de oxigênio, durante o período do experimento (Figura 31).

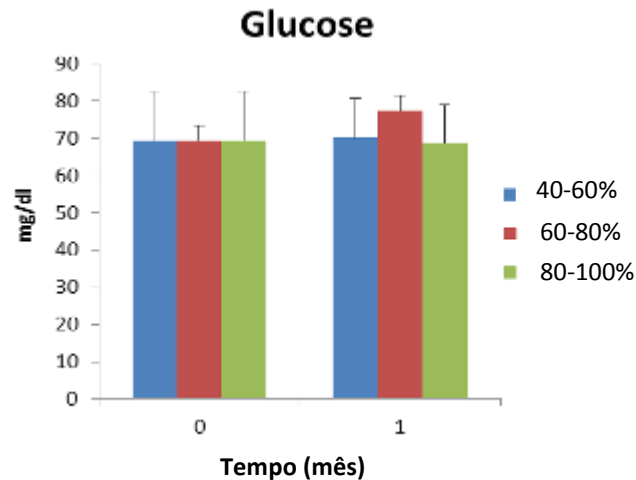


Figura 31 – Valores de glucose em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Nenhuma diferença significativa foi observada no lactato das douradas em seus respectivos tratamentos. Pode-se notar uma diminuição, em torno de 50% de lactato, nos diferentes níveis de oxigênio (Figura 32).

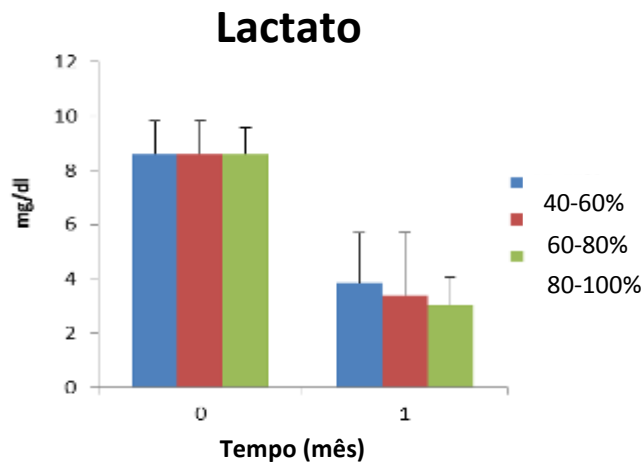


Figura 32 – Valores de lactato em sangue de douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

Os valores de proteína do plasma não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, o mesmo acontece em relação as amostragens (Figura 33).

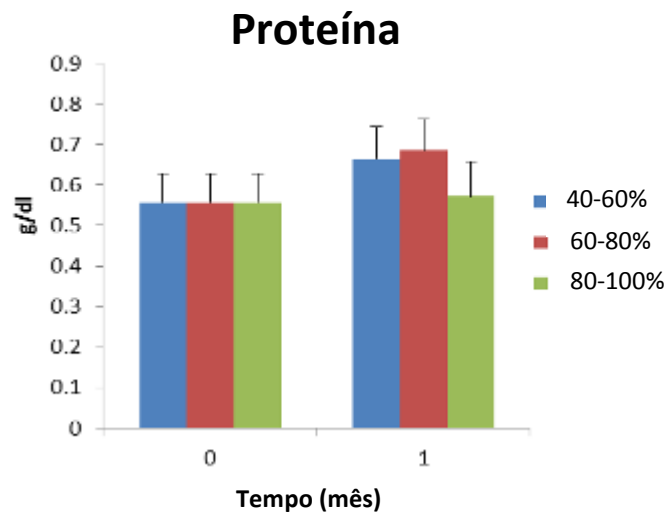


Figura 33 – Valores de proteína do plasma em douradas cultivadas em diferentes concentrações de oxigênio (40-60%, 60-80%, 80-100%), com amostragem inicial e após 30 dias.

### 3.2.6 Histologia: Brânquia

As douradas em condições de hipóxia exibiram hiperplasia (Figura 34 - 1 e 2), diminuição da lâmelas secundária e congestão da extremidade da mesma (Figura 34 - 1). Nota-se uma maior concentração de eritrócitos no tratamento de menor nível de oxigênio dissolvido. As brânquias do tratamento intermediário exibiram congestão da extremidade da lâmelas secundária (Figura 34 - 3) e hemorragia leve (Figura 34 - 4). As douradas do tratamento 80-100% de oxigênio dissolvido, mostraram brânquias com morfologia normal e aspecto saudável.

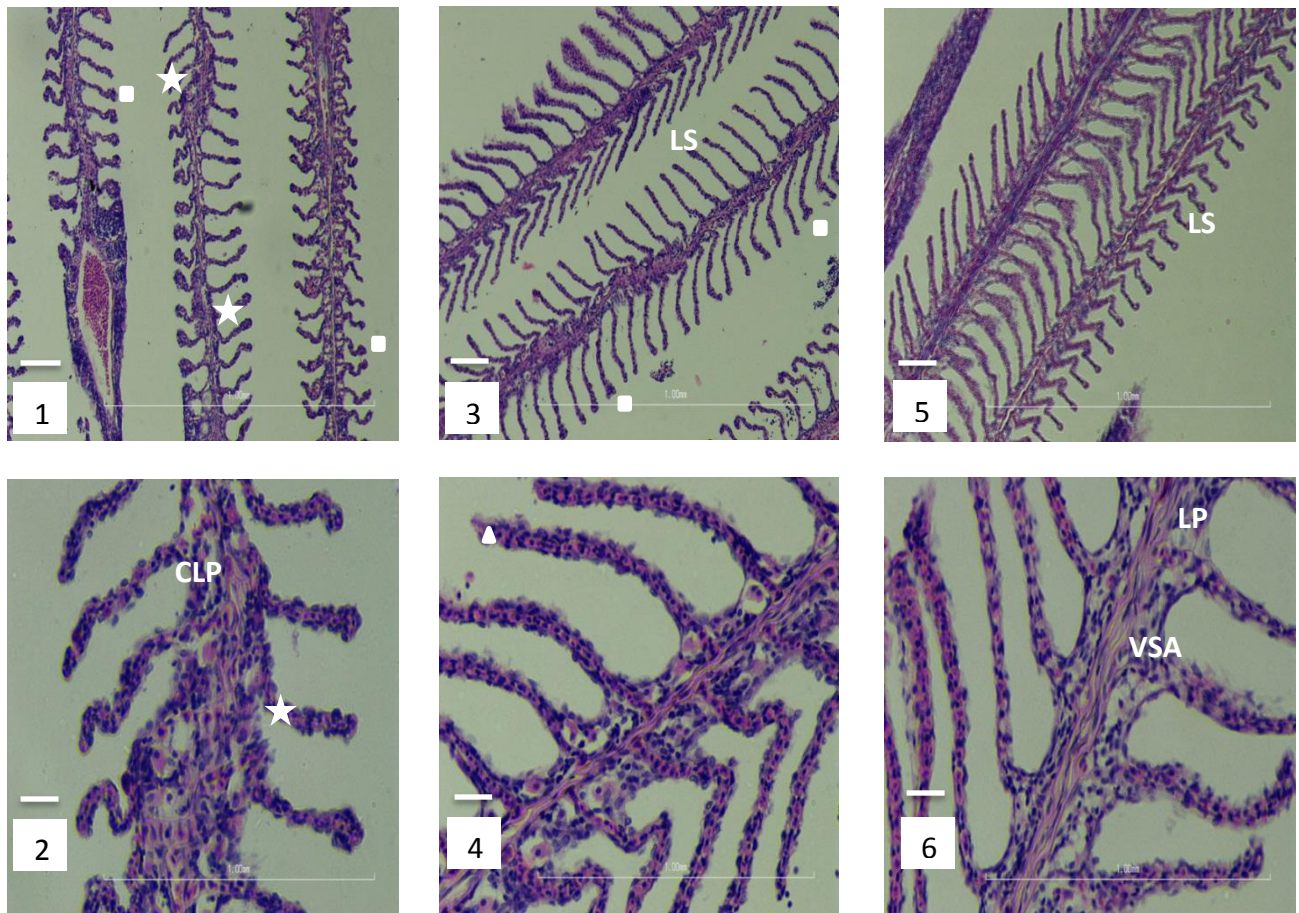


Figura 34 – Histologia (H&E) das brânquias de douradas em diferentes tratamentos. Tratamentos: (1 – 2) 40-60%, (3 – 4) 60-80% e (5 – 6) 80-100%. Aumentos: 1, 3 e 5 (10x - Barra = 90.2  $\mu$ m); 2, 4 e 6 (40x - Barra = 16.7  $\mu$ m). LP = Lâmelas primária, LS = Lâmelas secundária, VSA = Vaso sanguíneo aferente, CLP = Cartilagem da lâmelas primária, E = Eritrócito,  $\square$  = Congestão da lâmelas secundária,  $\Delta$  = Lâmelas secundária hemorrágica e  $\star$  = Hiperplasia.

## **4. DISCUSSÃO**

### *4.1 Ensaio: Cultivo de dourada em diferentes densidades (5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>)*

#### *4.1.1 Taxas de crescimento*

A produtividade de uma aquicultura está relacionada com a capacidade do cultivo em altas densidades em sistemas adequados, não afetando as taxas de crescimento nem a saúde dos peixes. No entanto a alta densidade pode induzir a diminuição do crescimento por diferentes fatores: diminuição do consumo de alimento, interação social (Wedemeyer, 1997) e decréscimo da qualidade da água (Pickering e Stewart, 1984).

As diferentes respostas a altas densidades de peixes também está ligada a natureza de cada espécie. O crescimento foi afetado em robalo (Saillant et al., 2003), truta arco-íris (Holm et al., 1990; Ellis et al., 2002) e o bacalhau do atlântico (Lambert e Dutil, 2001). O oposto foi visto com robalo-peva (Correa e Cerqueira, 2007), salmão do atlântico (Kjartansson et al., 1988) e salvelino-ártico (Brown et al., 1992) apresentaram uma melhor tolerância para altas densidades. Estes estudos avaliam a densidade adequada (alta densidade em menor custo), para as diferentes espécies.

Além das diferenças mencionadas em relação a biologia da espécie, alguns autores estudam algumas variáveis que a densidade causa na performance do peixe. O oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade são alguns fatores físicos que podem influenciar as taxas de crescimento (Huntingford et al., 2006), dificultando a análise do efeito da densidade no crescimento do peixe.

No presente estudo a densidade intermediária (10kg/m<sup>3</sup>), apresentou melhores resultados nas taxas de crescimento, quando comparado aos tratamentos de densidades baixa (5kg/m<sup>3</sup>) e alta (20kg/m<sup>3</sup>), apesar de não serem diferenças significativas. Os índices de crescimento são considerados normais para esta espécie considerando as diferentes idades específicas (Canario et al., 1998; Montero et al., 1999; Gómez-Requeni et al., 2004; Sangiao-Alvarellos et al., 2005).

As taxas de conversão alimentar (TCA) foram altas quando comparado com 1,04 (Chatzifotis et al.,2009) para esta espécie. Para evitar uma limitação do crescimento foi decidido aumentar a quantidade de alimento indicado em até 50% de acordo com o apetite do peixe. Isto pode ter afetado o TCA, pois o peixe pode ter canalizado a energia obtida da ração para outras atividades além do crescimento.

No presente estudo, houve uma diferença nos níveis de oxigênio do tratamento de maior densidade (10-15%) em comparação aos demais. Por ser uma diferença pequena, durante pouco tempo de experimento (60 dias), não houve uma influência significativa.

#### *4.1.2 Parâmetros sanguíneos*

As diferentes densidades não foram significativamente afetadas nos parâmetros hematológicos e plasmáticos após 60 dias. Os valores do hematócrito mostram uma tendência, crescendo de acordo com o aumento da densidade, uma adaptação fisiológica para maior transporte de oxigênio. Alta percentagem de glóbulos brancos é uma resposta não específica do sistema imunitário, sendo presente em todos os tratamentos.

Estudos com altas densidades descreveram produção de estresse crônico e mobilização de fontes de energia, resultando em níveis mais altos de cortisol, glucose e proteína (Montero et al., 1999; Sangiao-Alvarellos et al., 2005). Um padrão oposto foi observado neste estudo, em que os valores plasmáticos de cortisol e glucose tendem a ser menores em altas densidades. Este padrão é observado do meio para o final do experimento, sendo a amostragem intermediária com valores mais altos que a amostragem final.

A resposta ao stress são ajustes metabólicos, afim de restaurar a homeostase dos peixes através de mudanças no plasma, como alterações na glucose e lactato. Normalmente, um aumento no cortisol favorece a mobilização da glucose, desta forma, valores mais elevados de glucose eram esperados a valores mais altos de cortisol. Neste estudo, os peixes em tratamento de alta densidade foram mantidos num estresse crônico. Existe um gasto energético do peixe em stress, ao tentar restabelecer sua homeostase. Conseqüentemente, a energia disponível

para o crescimento e saúde do peixe será menor. Outros autores observaram que os peixes submetidos ao estresse crônico apresentaram um pequeno aumento de cortisol, provavelmente por uma adaptação a condições de estresse (Barton et al, 2008; Fast et al, 2008). Provavelmente, longos períodos de esforço resultam numa perda de sensibilidade dos tecidos à ação interna de ACTH ou pituitária (Vijanyan Mommsen et al, 1999). Ainda assim, a alta variabilidade foi observada para estes parâmetros.

#### *4.1.3 Histologia das brânquias*

A brânquias são órgãos que envolvem uma grande variedade de funções básicas, dentre elas: captar oxigênio, liberar CO<sub>2</sub>, osmorregulação, regulação de pH entre outros (Evans et al., 2005). No presente estudo, as brânquias foram afetadas progressivamente de acordo com o aumento da densidades nos tratamentos. Possivelmente estes danos estão relacionados com a amônia consoante as densidades. Apesar da amônia se encontrar em níveis seguros, segundo Francis-Floyd (0,052mg.L<sup>-1</sup>), durante o período de 60 dias pode ter sido o fator destes danos.

#### *4.2 Ensaio: Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio (40-60%, 60-80% e 80-100%)*

##### *4.2.1 Taxas de crescimento*

O oxigênio tem um papel essencial no metabolismo do peixe, desde produção energética celular a atividades de rotina e crescimento. O alcance metabólico dos peixes dependem da biologia, temperatura e oxigênio dissolvido (Claireaux et al., 2000; Domecini et al., 2013). Portanto, em algumas situações com capacidade metabólica restrita por pouca demanda de energia podem ocorrer conflitos (Claireaux et al., 2000), e os peixes tem que escolher qual a atividade que irá alocar energia.

Neste ensaio, foi observada uma relação linear entre os índices de crescimento e de oxigênio dissolvido, assim como um menor TCA, em níveis mais elevados de oxigênio. No bacalhau, um padrão similar foi observado, em que a taxa de crescimento está diretamente

relacionada à disponibilidade de oxigênio. Em 97% da redução do crescimento do bacalhau foi atribuído a reduzido consumo de alimento (Chabot e Dutil, 1999). A ingestão de alimento e a assimilação dos nutrientes estão completamente dependentes da disponibilidade de oxigênio dissolvido. Claireaux et al. (2000) apresentou em seus resultados uma interrupção da digestão por regurgitação, quando o oxigênio estava a cerca de 45%. Utilizando desta forma, uma estratégia de se adaptar a restrição da capacidade metabólica. Além disto, quando o *Gadus morhua* é exposto a um estresse crônico por hipóxia (40-45% por 6 semanas em 10 °C) mostra efeitos negativos causando o declínio do volume de ejeção sanguínea em repouso e durante exercícios (Petersen e Gamperl, 2010). Outros autores observaram que os baixos níveis de concentração de oxigênio dissolvido reduzem a taxa de crescimento e capacidade imune (Tom, 1998).

#### 4.2.2 Parâmetros sanguíneos

O déficit de oxigênio induz altos níveis de hematócrito (volume de células vermelhas), como foi visto no presente estudo em que obteve-se diferenças significativas. O aumento das células vermelhas é responsável pelo transporte de oxigênio no sangue, uma estratégia do organismo de manter o mesmo nível de oxigênio dentro das células. O aumento na natação e hiperventilação são estratégias iniciais em condições de hipóxia. As douradas possuem uma habilidade de adaptação fisiológica para baixos níveis de oxigênio, reduzindo o seu metabolismo. Outra adaptação a hipóxia crônica seria a produção de células vermelhas pelo baço, afetando os custos metabólicos.

Embora não significativa, o conteúdo de hemoglobina aumentou em condições de hipóxia, confirmando a estratégia da dourada em manter o transporte de oxigênio semelhante nos tecidos. Além disso, as douradas do tratamento 40-60% OD exibiram um aumento do número de glóbulos brancos, o que indica uma resposta do mecanismo imunológico.

Apesar das alterações dos parâmetros hematológicos, não houve relação significativa entre os diferentes níveis de saturação de oxigênio e parâmetros de estresse como o cortisol,

glucose e outros parâmetros metabólicos até o final do experimento. Além disso, foram observados valores semelhantes para as amostragens inicial e final, com exceção do lactato, que exibiu uma diminuição como resultado do metabolismo anaeróbio. Possivelmente devido a uma consequência da natação dos peixes ao invés de ser causada por diferenças nas concentrações de oxigênio.

#### *4.2.3 Histologia das brânquias*

Em condições de hipóxia prolongada, alterações morfológicas foram descritas para as brânquias, como: hiperplasia da lamela primária, encurtamento e arredondamento da lamela secundária (Cengiz, 2009). Alteração semelhante foi descrito por Gonzalez e McDonald, (1992) como uma estratégia de peixe para se adaptar a hipóxia em baixa temperatura. Em ambos os estudos, verificou-se uma redução na superfície lamelar e hiperplasia afim de reduzir o contato da brânquia com poluentes da água. O arredondamento da extremidade da lamela secundária provavelmente potencializa a quantidade de trocas gasosas, existindo uma vasoconstrição no sentido extremidade para a base.

As células pilares controlam o fluxo sanguíneo através da regulação do diâmetro das lacunas localizadas entre as células pilares. As paredes lamelares são muito finas e permitem que o sangue dentro das lacunas façam as trocas com o meio externo (Hughes, 1984; Wilson & Laurent, 2002). No presente estudo, nota-se um maior número de células sanguíneas dentro das lacunas, de acordo com o déficit de oxigênio. Isto indica uma regulação das células pilares, afim de efetuar mais trocas gasosas com o meio, em função do déficit de oxigênio.

## 5. CONCLUSÃO

O primeiro ensaio (*Cultivo de dourada em diferentes densidades: 5kg/m<sup>3</sup>, 10kg/m<sup>3</sup> e 20kg/m<sup>3</sup>*), apresentou melhores tendências nos resultados de crescimento do tratamento intermediário (10kg/m<sup>3</sup>). Apesar disto, os parâmetros de estresse não foram expressivos, tornando a melhor opção de cultivo a densidade 20kg/m<sup>3</sup>, uma vez que produtivamente é mais rentável. Porém é necessário realizar amostragens ao longo do cultivo, para verificar a saúde, taxas de crescimento e estresse dos peixes, corrigindo a densidade quando necessário.

No segundo ensaio (*Cultivo de douradas em diferentes níveis de oxigênio: 40-60%, 60-80% e 80-100%*) existem relações significativas entre a taxa de crescimento específico, taxa de conversão alimentar com o oxigênio dissolvido. Estas relações e as taxas de crescimento mostram melhores resultados para o tratamento 80-100%. As adaptações fisiológicas são significativas, sendo o aumento do hematócrito a estratégia utilizada para aumentar as trocas gasosas em níveis mais críticos de oxigênio. Apesar do tratamento 80-100% apresentar melhores resultados, este nível não seria aconselhado para uma aquicultura no sul de Portugal, onde no verão a temperatura da água é elevada e os gastos para manter estes níveis comprometeriam o lucro da produção. O nível de oxigênio dissolvido indicado para cultivo de densidade 10kg/m<sup>3</sup>, seria de 60-80%, porém com as mesmas condições de verificação de saúde, taxas de crescimento e estresse dos peixes, corrigindo os níveis sempre que necessário. O nível 40-60%, é desaconselhado por ser um limite muito crítico, podendo alguns eventos diminuir o oxigênio abaixo destes limites (alimentação, falha de bombas, limpeza dos filtros de areia, falhas nas difusoras, altas temperaturas, consumo de oxigênio por microalgas e etc).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashley, P.J. 2006. Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*. 1-37p
- Boyd C.E. and Tucker C.S., 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*, Kluwer Academic Publishers, Boston, MA (1998) 700 p.
- Brown, G.E., Brown, J.A. & Srivastava, R.K. 1992. The effect of stocking density on the behaviour of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Fish Biology* 41, 955-963.
- Buentello, J.A., Gatlin III, D.M., Neill, W.H., 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 182, 339–352.
- Canario, A.V.M., J. Condença, D.M. Power, 1998. The effect of stocking density on growth in gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture Research* 29, 177-181.
- Cengiz, El 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22, 200–204.
- Chabot D, Dutil J-D. 1999. Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *J Fish Biol* 55:472–491
- Chatzifotis, S., M. Vazquez-Arias, I.E. Papadakis, P. Divanach, 2009. Evaluation of Feed Stimulants in Diets for Sea Bream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61(4), 315-321.
- Claireaux, G., D. M. Webber , J.-P. Lagardère, S. R. Kerr, 2000. Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research* 44(3-4), 257-265
- Coll Morales, J., 1983a In: *Acuicultura Marina Animal*. Madrid, Ediciones Mundi Prensa, pp. 414-32
- Domenici, P., N. A. Herbert, C. Lefrançois, J. F. Steffensen, D. J. McKenzie, 2013. The Effect of Hypoxia on Fish Swimming Performance and Behaviour, Chapter 6, In: *Swimming Physiology of Fish*, A. P. Palstra and J. V. Planas (eds.), pringer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M. & Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 61: 493-531.
- Eurofish Magazine. 2014. Deliveries to Europe from state-of-the art processing facility. February, ISSN 1868 – 5943. 59p
- FAO. 2007. Aquaculture Development – Technical Guidelines for Responsible Fisheries. (FAO) Food and Agriculture Organization of the United Nations, ISSN 1020 – 5292; Rome.
- FAO, 2012. Fisheries and Aquaculture Department(FI). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, 2010-2012.
- FAO. 2013.FAN - FAO Aquaculture Newsletter. No. 51. June 2013 Rome, FAO. 60p.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department (FI). In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome 9p
- Fast, M. D., Hosoya, S. Johnson, S. C. & Afonso, L. O. B. 2008. Cortisol response and immune related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long term stress. *Fish and Shellfish Immunology* 24:194-204
- Gagnon, A., Jumarie, C. & Hontela, A. 2006. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquatic Toxicology*.
- Garcia, M. P., 2008. Elaboração de um projecto de uma unidade de Piscicultura. (33-72) Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Medale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- Gonzalez, R. J., D. G. McDonald, 1992. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. *J. Exp. Biol.* 16
- Haukenes, A.H., Barton, B.A. & Bolligs, H. 2008 Cortisol response of pallid sturgeon and yellow perch following challenge with lipopolysaccharide. *Journal of Fish Biology*.
- Holm, J.C., Refstie, T. & Bo, S. 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*.
- Hughes GM. 1984. General anatomy of the gills. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish physiology*, Vol 10A. New York: Academic Press. p 1–72.

Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P. & Turnbull, J.F. 2006. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*.

Jobling M. 1995. Environmental biology of fishes. Chapman and Hall Fish and fisheries series 16.

Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J.M. & Smith, M.J. 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture*.

Lambert, Y. & Dutil, J.D. 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture*.

Landau, M. 1992. Introduction to Aquaculture New York: John Wiley & Sons, Inc.

Mallaya Y.L. 2007. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Kingolwira National Fish Farming Centre.p 11-26

Mallya, J. Y. 2007. The effects of dissolved oxygen on fish growth in aquaculture. Fisheries Training Programme. The United Nations University. Tanzania.

Martinez-Porchas M, Martinez-Cordova LR, Ramos-Enriquez R. 2009. Cortisol and glucose: Reliable indicators of stress? *Pan Am J Aquat Sci* 4: 158-178.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews on Fish Biology and Fisheries*.

Monfort, M. C. 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. *Studies and Reviews*, Nº 89. Food and Agriculture Organization of the United Nations, General Fisheries Commission for the Mediterranean. Rome.

Montero, D., M. S. Izquierdo, L. Tort, L. Robaina and J. M. Vergara, 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 53-60.

Montero, D., T. Kalinowski, A. Obach, L. Robaina, L. Tort, M.J. Caballero, M.S. Izquierdo, 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health

Morales, J.C. 1983. Acuicultura Marina Animal. Madri, Mundi-Prensa Ed., 423p

Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G. & Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream , (pp.194) Vol.1. FAO, Rome, Italy.

Papoutsoglou S.E. and Tziha G. 1996. Blue tilapia (*Oreochromis aureus*) growth rate in relation to dissolved oxygen concentration under recirculated water conditions. *Aquicultural Engineering* 15: 181-192.

Petersen, L.H.; Gamperl, A.K., 2010. Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal Of Experimental Biology*. 213

Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayou, N., Severe, A., Le Roux, A., and Bcouf, G. 2001. Comparative effects of long-term hypoxia on growth, feeding and oxygen consumption in juvenile turbot and European sea bass. *J. Fish Biol.*

Pickering A.D., Stewart A. 1984. Acclimation of the interregional tissue of the brown trout *Salmon trutta L.*, to chronic crowding stress. *J. fish Biol.* 24, 731-740.

Quéméner, L. 2002. Le maigre común (*Argyrosomus regius*). Biologie, pêche, marché et potentiel aquacole. Editions Ifremer, Plouzane, France. 31 pp.

Randolph, K.N. and H.P. Clemens. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. *Transactions of American Fisheries Society* 105.

Randolph, K.N., and H.P. Clemens. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. *Transactions of American Fisheries Society* 105: 718-724.

Saillant, E., Fostier, A., Haffray, P., Menu, B., Laureau, S., Thimonier, J. & Chatain, B. 2003. Effects of stocking density, size grading and parental factors on sex ratios of the sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) in intensive aquaculture. *Aquaculture*.

Sangiao-Alvarellos, S., J.M. Guzman, R. Llaiz-Carrion, J.M. Miguez, M. P. Martin del Rio, J.M. Mancera, J. L. Soengas, 2005. Interactive Effects of High Stocking Density and Food Deprivation on Carbohydrate Metabolism in Several Tissues of Gilthead Sea Bream *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Zoology* 303A, 761–775

Santinha, P. J., 1998. Dourada (*Sparus Aurata*). In Henriques M. A. R. (ed.) *Manual de Aquacultura ostra, amêijoia, camarão, truta, salmão, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado.* (pp.165-176) Porto.

Stickney R.R. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. A Wiley-Interscience publication. Program at Texas A&M University.

Stickney R.R. 2009. *Aquaculture: An Introductory Text*. Editor: Cabi Publishing. ISBN: 9781845935436.

Svobodova Z., Richard L., Jana M., and Blanka V. 1993 Water quality and fish health EIFAC Technical paper 54

The Biology of Fish Growth by A. H. Weatherley; H. S. Gill. 1989. Konrad Dabrowski. Copeia Published by: American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH). Vol., No. 3 pp. 887-889.

Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K.D., Inselmann, S., Rosenthal, H., 1999. Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, 174, 355-367.

Timmons M.B., James M.E., Fred W.W., Sreven T.S. and Brian J. V. 2001. Recirculating Aquaculture Systems. NRAC publication No.01-002.

Timmons MB, Ebeling JM. 2010. Recirculating Aquaculture. Northeastern Regional Aquaculture Center.

Tom L.1998, Nutritional and feeding of fish. Kluwer Academic Publishers. Second edition.

Universidade de Sterling. 2004. Study of the market for Aquaculture produced sea bass and sea bream species. In Report to the European Commission DG Fisheries, April, Sterling.

White, K. et al. 2004. At a Crossroads: Will Aquaculture Fulfill the Promise of the Blue Revolution? *Aquaculture Clearinghouse*. 4p.

Wilson JM, P Laurent. 2002. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 293: 192-213.