



Universidade de Aveiro  
2021

**Diogo Fernandes  
Amaro Martins**

**Melhoria das condições de aclimação e ensaio de  
novas dietas para pós-larvas de *Penaeus vannamei***



Universidade de Aveiro  
2021

**Diogo Fernandes  
Amaro Martins**

**Melhoria das condições de aclimação e ensaio de  
novas dietas para pós-larvas de *Penaeus vannamei***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha Aplicada, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Jorge Miranda Rocha, diretor de operações e de inovação e desenvolvimento da Riasearch e professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia e membro do CESAM da Universidade de Aveiro, e do Doutor Mário Guilherme Garcês Pacheco, professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Victor Manuel dos Santos Quintino**  
Professor Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

**Doutora Carolina Oliveira Castro**  
R&D Manager, Acuinova – Atividades Piscícolas, S.A.

orientador

**Doutor Rui Jorge Miranda Rocha**  
Professor Auxiliar Convidado, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Quero agradecer aos meus orientadores, à RiaSearch pela possibilidade de lá realizar à minha dissertação. Agradeço também ao André, Adriana, Daniel e Bruna pela disponibilidade e ajuda, e ao Igor e Diana pelo companheirismo durante este período. E por último, mas não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio a todos os níveis.

## palavras-chave

Aquacultura, Nutrição, *Penaeus vannamei*, Krill, Artémia salina, Camarão

## resumo

Com o crescimento da população humana e a cada vez maior escassez de recursos marinhos, a aquacultura tem sido cada vez mais encarada como uma alternativa sustentável para produção de alimentos. Por ser uma atividade em constante evolução, existe um esforço constante para otimizar os métodos de produção e as dietas utilizadas. Os crustáceos representam um grande grupo a nível da aquacultura mundial, sendo o *Penaeus vannamei* a espécie mais produzida dentro deste grupo. A presente dissertação propõe-se a apresentar os resultados e conclusões obtidos nos ensaios de aclimação e crescimento realizados com pós-larvas de *Penaeus vannamei* executados na RiaSearch. No ensaio de aclimação, foi testada a possibilidade de melhorar a sobrevivência, condição do sistema antioxidante e de reservas energéticas, através do fornecimento de artémia recém eclodida durante o período de aclimação (3 dias), ensaio do qual se percebeu que, a curto prazo, esta dieta não apresenta vantagens significativas. No ensaio de crescimento, foram comparadas dietas baseadas em farinha de peixe, peixe com alta concentração de gorduras, lula, e krill, com uma dieta comercial comum e uma dieta comercial com um novo aglutinante. Foram analisados parâmetros de crescimento, stress oxidativo e reservas energéticas. Neste ensaio, reconheceu-se o krill como um bom constituinte base para a alimentação dos camarões nesta fase do seu desenvolvimento. De um modo geral o fornecimento de artémia recém eclodida às PL em processo de aclimação, não apresentou vantagens em relação ao mesmo processo com o fornecimento exclusivo de ração inerte, não podendo ser esquecidos os custos e logística da eclosão de artémia, quanto às novas dietas testadas, KRILL demonstrou ser a melhor.

**keywords**

Aquaculture, Riasearch, nutrition, *Penaeus vannamei*, Krill, Brine shrimp, Shrimp

**abstract**

With the growth of the human population and the growing scarcity of marine resources, aquaculture has been increasingly seen as an alternative for sustainable food production. As an activity in steadfast evolution, there is a constant effort to optimize the production methods and the diets used. Crustaceans represent a large group in world aquaculture, with *Penaeus vannamei* being the most produced species within this group. This dissertation proposes to present the results and conclusions obtained in the acclimatization and growth tests carried out with post-larvae of *Penaeus vannamei* done in RiaSearch. In the acclimatization test, the possibility of improving survival, antioxidant condition and energy reserves was tested through the supply of newly hatched brine shrimp during the acclimatization period (3 days). Results suggested that in the short term, supply of newly hatched brine shrimp has no advantages. In the growth test, diets based on fish meal, high-fat fish, squid, and krill were compared with a standard commercial diet and a commercial diet with a new binder. Growth parameters, oxidative stress status and energy reserves were analysed. In this, krill was recognized as a good base constituent for shrimp feed at this development stage. In general, the supply of newly hatched brine shrimp to PL in the acclimatization process did not present advantages over the same process with the exclusive supply of inert feed, and the costs and logistics of the brine shrimp hatching, regarding the new diets, cannot be forgotten, as for the new diets tested, KRILL proved to be the best.

## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Crescimento populacional e alimentação.....	1
1.2. Pesca versus Aquacultura .....	1
1.3. Aquacultura de crustáceos.....	2
2. Material e Métodos .....	4
2.1. Sistema de Cultivo Experimental .....	4
2.2. Desenho experimental .....	7
2.3. Desempenho de Crescimento e Sobrevivência.....	10
2.4. Biomarcadores de Stress Oxidativo .....	10
2.4.1. Catalase (CAT) .....	11
2.4.2. Glutaciona-S-transferase (GST).....	11
2.4.3. Glutaciona total (tGSH) .....	11
2.5. Peroxidação lipídica (LPO).....	11
2.6. Reservas Energéticas.....	12
2.6.1. Lípidos .....	12
2.6.2. Hidratos de carbono .....	12
2.6.3. Proteínas .....	12
2.6.4. Energia disponível (Ed) .....	12
2.6.5. Energia consumida (Ec).....	12
2.6.6. Alocação de energia celular (AEC) .....	13
2.7. Análise de dados .....	13
3. Resultados .....	13
3.1. Ensaio 1- Aclimação .....	13
3.2. Ensaio 2 – Crescimento .....	19
4. Discussão .....	27
4.1. Ensaio 1 - Aclimação .....	27
4.2. Ensaio 2 - crescimento .....	28
5. Conclusões.....	29

6. Bibliografia .....	30
-----------------------	----

## Índice de Figuras

Figura 1: Indivíduo adulto de <i>Litopenaeus vannamei</i> . .....	3
Figura 2: Tanques utilizados nos ensaios, cobertos por rede para evitar fugas. ....	5
Figura 3: Sump do sistema utilizado nos ensaios. ....	6
Figura 4: Alimentadores automáticos <i>Fishmate</i> e respectivas dietas, previamente pesadas. .....	6
Figura 5: Chegada das PL. São visíveis as bolsas térmicas de gel quente e a caixa isotérmica utilizadas na manutenção da temperatura durante o transporte. ....	7
Figura 6: PL de <i>L. vannamei</i> a iniciar o ensaio de aclimação. ....	8
Figura 7: Produção de artémia recém eclodida. A: Eclusão da artémia; B: Separação da artémia recém eclodida dos cistos com recurso a <i>Separator</i> . ....	9
Figura 8: Taxa de sobrevivência obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	14
Figura 9: Variação da atividade da catalase obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	14
Figura 10: Variação da atividade de glutathiona-S-transferase obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	15
Figura 11: Variação da concentração de glutathionas totais obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art – dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	15

Figura 12: Variação dos valores de peroxidação lipídica obtidos em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ).....	16
Figura 13: Variação da concentração de lípidos obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.....	16
Figura 14: Variação da concentração de hidratos de carbono obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	17
Figura 15: Variação da concentração de proteínas obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.....	17
Figura 16: Variação da energia disponível obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	18
Figura 17: Variação da energia consumida obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	18
Figura 18: Variação da alocação de energia celular obtida em PL de <i>P. vannamei</i> aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio. ....	19
Figura 19: Peso corporal final obtido em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias. ....	19
Figura 20: Taxa de sobrevivência obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ).....	20

Figura 21: Ganho de peso por tanque obtido em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ). .....	21
Figura 22: Taxa de crescimento relativo obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias.....	21
Figura 23: Taxa de conversão de alimento obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ). .....	22
Figura 24: Atividade da catalase obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ).....	22
Figura 25: Atividade de glutationala-S-transferase obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ).....	23
Figura 26: Concentração de glutationalas totais obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias.....	23
Figura 27: Valores de peroxidação lipídica obtidos em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos $p < 0.05$ ). .....	24
Figura 28: Concentração de lípidos obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias.....	24
Figura 29: Concentração de hidratos de carbono obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias.....	25
Figura 30: Concentração de proteínas obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias.....	25
Figura 31: Energia disponível obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias. ....	26
Figura 32: Energia consumida obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias. ....	26
Figura 33: Alocação de energia celular obtida em PL de <i>P. vannamei</i> após ensaio de crescimento de vinte e um dias. ....	27

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Informação nutricional da dieta inerte, utilizada no ensaio de aclimação. ....	8
Tabela 2: Composição nutricional das dietas utilizadas no ensaio de crescimento (MH - matéria húmida). .....	10

## 1. Introdução

### 1.1. Crescimento populacional e alimentação

É um facto que a população humana a nível mundial tem crescido de forma exponencial, e que nas próximas décadas este crescimento poderá colocar em causa a sobrevivência, e o bem-estar da própria espécie humana, bem como dos recursos naturais, indispensáveis às condições anteriores. Embora tenha impacto a nível mundial, esta situação terá maiores efeitos nas regiões em desenvolvimento, sendo, por sua vez, estas as que mais contribuem para o crescimento populacional à escala mundial, sendo elas a África Subsaariana e o Sul da Ásia. Para contrariar esta tendência, é imprescindível uma forte aposta na educação (Goujon, 2018).

No entanto, este processo educativo é bastante demorado, e também demorados são os seus possíveis resultados, pelo que se torna necessário encontrar soluções para os problemas atuais provocados pelo excesso populacional. Sendo um deles a necessidade de alimentar de forma sustentável, segura, saudável, e acessível a população humana. É neste cenário que surge a aquacultura, como uma forma de fornecer peixe e outros produtos de origem aquática de forma mais acessível e sustentável.

A importância dos alimentos de origem aquática, designadamente marinha, é conhecida. É reconhecido que o consumo deste tipo de alimentos esteja relacionado com hábitos de vida mais saudáveis. O Japão, um dos maiores consumidores de alimentos de origem aquática (animais e plantas, capturados ou cultivados), é um dos países com maior esperança média de vida, e que regista menos mortes relacionadas com obesidade e doenças cardíacas (Tacon & Metian, 2013).

### 1.2. Pesca *versus* Aquacultura

Enquanto a atividade pesqueira estagnou o seu crescimento de há alguns anos para a atualidade (96,4 milhões de toneladas em 2018), a aquacultura tem vindo a crescer, sendo já responsável por quase metade do peixe e marisco consumidos a nível mundial (82,1 milhões de toneladas em 2018), estando este crescimento, acompanhado por um ligeiro, mas consistente aumento do consumo de pescado per capita (FAO, 2020). O continente asiático foi responsável por 88,69% da produção em 2018, sendo que a produção na China (57,93%), foi superior à soma das produções dos países Europeus (3,75%). No mesmo ano, a carpa-do-limo *Ctenopharyngodon idellus* e o camarão *Penaeus vannamei* foram as espécies de peixes e crustáceos mais produzidas a nível mundial, respetivamente (FAO, 2020).

### 1.3. Aquacultura de *P. vannamei*

Seguindo a tendência geral, a produção de crustáceos em aquacultura tem vindo a aumentar ao longo dos anos, apresentando um grande potencial pelo elevado valor comercial destes animais e pelo impacto dos métodos de pesca utilizados para a sua captura no meio selvagem, nomeadamente o arrasto de fundo. Dentro dos crustáceos, a espécie *Penaeus vannamei* (Figura 1) é a mais produzida a nível mundial, tendo sido produzidas 4966200 toneladas em 2018, sendo também de notar que esta quantidade apresenta uma tendência crescente (FAO, 2020).

Este crustáceo, pertence à classe Malacostraca, ordem Decapoda, subordem Dendrobranchiata, e família Penaeidae. Em estado selvagem, o *P. vannamei* pode ser encontrado na costa do Pacífico oriental das Américas do Norte, Central e do Sul. Na fase adulta, vive em oceano aberto, local onde acabam também por desovar, migrando as pós-larvas para zonas mais próximas da costa, onde ocupam estuários, lagoas e mangais, até atingirem a fase adulta, regressando posteriormente ao oceano aberto. A maturidade reprodutiva é atingida entre os 6 e 7 meses de idade, pesando os machos nesta altura 20 g e as fêmeas 28 g ou mais (FAO, 2018). O seu ciclo de vida pode ser dividido em fase larvar, pós-larvar, juvenil e adulta. Na fase larvar, o *P. vannamei* é pelágico, vivendo na coluna de água. Esta fase tem uma duração de 11 a 17 dias dependendo da temperatura da água, e pode ainda ser dividida em 3 fases, sendo elas náuplio, zoeia e misis (Cook & Murphy, 1969; Rojo-Arreola *et al.*, 2020).

A fase de náuplio é a primeira logo após a eclosão. nesta fase, a larva é lecitotrófica, ou seja, alimenta-se das reservas contidas no vitelo, passando em seguida à fase de zoeia, em que passa a ser fitófago, terminando a sua fase larvar com a fase de misis, em que se torna zoófago (Rojo-Arreola *et al.*, 2020).

Após este desenvolvimento inicial, torna-se pós-larva, passando então de pelágico a bentónico e a ter uma alimentação detritívora e omnívora; é também nesta fase que em aquacultura passa a aceitar dietas inertes (Rojo-Arreola *et al.*, 2020).



**Figura 1:** Indivíduo adulto de *Penaeus vannamei*.

No entanto, fases iniciais de produção são frequentemente associadas a um crescimento não ideal e baixas taxas de sobrevivência, que podem estar relacionadas com problemas de nutrição. Tudo isso indica que existe ainda espaço para melhorias nesta área e para a criação de novas dietas inertes para esta fase do crescimento do *P. vannamei* em aquacultura.

#### 1.4. Nutrição em aquacultura

Em quase todas as aquaculturas de animais, a alimentação dos mesmos representa uma parte importante das despesas da produção, pelo que é importante que a mesma seja o mais adequada possível, de forma a otimizar o crescimento, conseguindo com isso um melhor perfil nutricional dos mesmos, que se traduz numa maior capacidade de produção e, conseqüentemente, maiores rendimentos obtidos.

Têm sido desenvolvidos esforços para melhorar a qualidade das dietas, a sua digestibilidade, com vista a aumentar a sua eficiência, e maximizar o desenvolvimento e crescimento dos organismos cultivados. Por outro lado, existe a necessidade de encontrar novos ingredientes e fontes de proteína e ácidos gordos que possam substituir os

tradicionais farinha e óleo de peixe, de forma a tornar a aquacultura mais sustentável. A sua elevada digestibilidade, excelente perfil de aminoácidos e ácidos gordos, fazem da farinha de peixe, uma importante fonte de proteína para aquacultura. No entanto, o seu elevado custo, as limitações da disponibilidade e as questões de sustentabilidade ambiental, fazem crescer a procura por novas fontes de proteína (Katya *et al.*, 2016; Tacon e Metian, 2008; Ayisi *et al.*, 2017). Para que possam ser considerados boas opções, os novos ingredientes devem existir em quantidade que permita a sua utilização sustentável, ter boa qualidade nutricional e ser economicamente viáveis (Goytortúa-Bores *et al.*, 2006; Ayisi *et al.*, 2017).

Também o alimento fornecido aos animais estabulados tem impacto na sua sobrevivência e na sua resposta ao stress, havendo a possibilidade de a alimentação fornecida poder dissipar comportamentos canibais, característicos de PL expostas a stress, como o provocado por um transporte e posterior aclimação.

A análise de parâmetros de stress oxidativo, dano celular e reservas energéticas permite perceber a condição física e fisiológica dos animais alimentados com uma determinada dieta. Através da comparação destes parâmetros em animais alimentados com diferentes dietas, é possível perceber qual a dieta que apresenta melhor desempenho.

### 1.5. Objetivos

Este trabalho foi realizado com dois objetivos específicos: i) otimizar os processos de aclimação de PLs de *P. vannamei*, após um período longo de transporte, utilizando diferentes protocolos de alimentação à chegada (alimentação inerte, alimentação inerte juntamente com náuplios de artémia durante 1 dia e alimentação inerte juntamente com náuplios de artémia durante 3 dias), de forma a diminuir o canibalismo e maximizar a sobrevivência; e ii) testar dietas inovadoras, com formulações distintas, para cultivo de PLs de *P. vannamei*. No final dos ensaios, avaliaram-se vários indicadores zootécnicos e fisiológicos, designadamente biomarcadores de stress oxidativo (antioxidantes e indicadores de dano) e reservas energéticas.

## 2. Material e Métodos

Os trabalhos descritos nesta dissertação foram realizados com pós-larvas (PL) de camarão de patas brancas, de nome científico, *Penaeus vannamei* (Boone, 1931).

### 2.1. Sistema de Cultivo Experimental

Os ensaios decorreram num sistema experimental, em circuito fechado, constituído por 18 tanques de 45 L de capacidade, com uma taxa de renovação de 100% do volume por hora.

Adicionalmente, todos os tanques estavam equipados com pedras difusoras para promover oxigenação da água, através de arejamento (Figura 2).

Após a saída dos tanques, a água, controlada por tubos de nível, era encaminhada por uma linha de esgoto, para o tanque de filtração, passando por um filtro mecânico de 50  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, após filtração por escumador de proteínas, a água era encaminhada para o filtro biológico (com aproximadamente 500 L), sendo posteriormente bombeada, através de uma unidade com radiação ultravioleta (UV-C) e de uma unidade de controlo de temperatura (com capacidade para aquecer ou arrefecer a água), de volta aos tanques de cultivo experimental (Figura 3).

A temperatura foi mantida em torno dos 28 °C ( $\pm 1$  °C), sendo realizadas trocas parciais de água, com água salobra (salinidade 18) de captação subterrânea, previamente tratada com recurso a um filtro de areia e uma bomba hidrolítica, por forma a retirar o excesso de ferro, característico da zona de captação.

O oxigénio dissolvido foi mantido entre os 5,7 e os 6,9 mg/L e os níveis de amónia e nitritos inferiores 0,05 mg/L e 0,02 mg/L, respetivamente.



**Figura 2:** Tanques utilizados nos ensaios, cobertos por rede para evitar fugas.



**Figura 3:** Sistema de filtração utilizado nos ensaios.

Para a alimentação com dietas inertes, foram utilizados alimentadores automáticos *Fishmate*, programados para fornecer 8 alimentações diárias (Figura 4).



**Figura 4:** Alimentadores automáticos *Fishmate* e *falcons* respectivas dietas, previamente pesadas.

## 2.2. Desenho experimental

### 2.2.1. Ensaio 1- Aclimação

As pós-larvas (PL12 – pós-larvas com 12 após a eclosão) adquiridas a uma maternidade em Miami (Florida, EUA), foram transportadas de avião até Lisboa, e em seguida de automóvel até à Riasearch, num processo que demorou cerca de 72 horas. Para este transporte, foram acondicionadas em sacos de plástico com água e oxigénio, dentro de caixas isotérmicas com bolsas térmicas de gel quente, de forma a manter a temperatura o mais estável possível (Figura 5).



**Figura 5:** Chegada das PL. São visíveis as bolsas térmicas de gel quente e a caixa isotérmica utilizadas na manutenção da temperatura durante o transporte.

À chegada, foi realizada uma amostragem inicial para recolha de amostras para a análise de biomarcadores de stress oxidativo e de reservas energéticas. As pós-larvas (PL) foram amostradas com pinças, rapidamente escorridas em papel, para remover o excesso de água salgada, e imediatamente congeladas em azoto líquido. Posteriormente, parte das PL foram distribuídas pelos 18 tanques do ensaio, através de métodos de concentração (concentração das PL num volume de água conhecido, estimativa do número de PL por litro e posterior distribuição de volumes idênticos aleatoriamente pelos tanques), para que se desse início ao ensaio de aclimação (Figura 6).



**Figura 6:** PL de *P. vannamei* a iniciar o ensaio de aclimação.

Durante este ensaio, as PLs de 6 dos tanques foram alimentadas apenas com uma dieta inerte (NoArt - ração comercial similar à utilizada na maternidade de proveniência das pós-larvas), as de outros 6 foram alimentadas com dieta inerte e artémia recém eclodida apenas no primeiro dia (1Art), e o último conjunto de PLs de 6 tanques foi alimentadas com ração inerte e artémia recém eclodida durante os 3 dias de duração do ensaio (3Art).

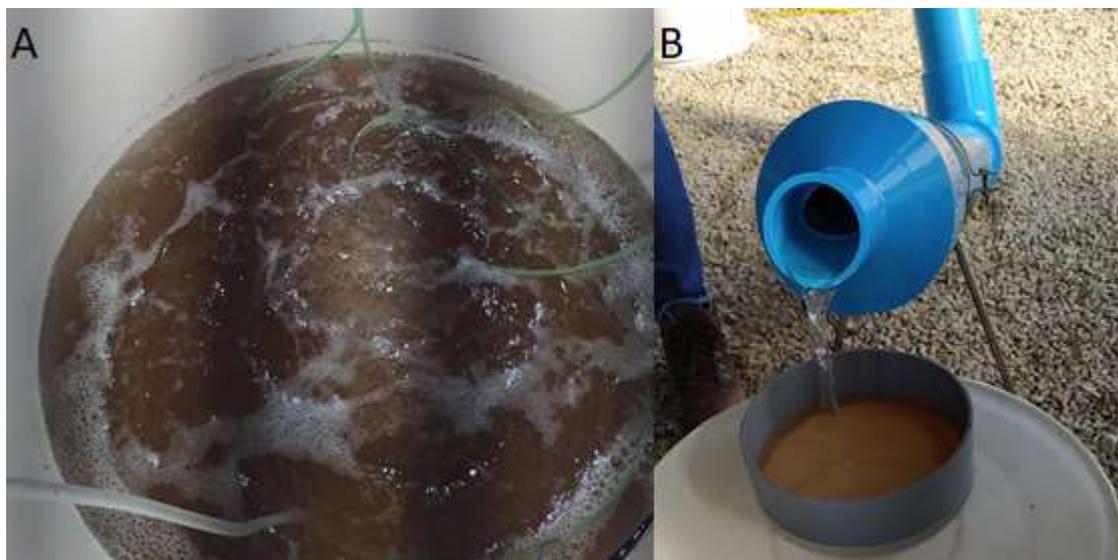
A composição nutricional da dieta inerte utilizada está disponível na Tabela 2.

**Tabela 1:** Informação nutricional da dieta inerte, utilizada no ensaio de aclimação.

Composição	Dieta inerte
Proteína (%)	62
Lípidos (%)	18
Hidratos de carbono (%)	10,5

Foram utilizados cistos de artémia polarizados para que pudesse separar os náuplios recém eclodidos dos córions e cistos não eclodidos, com recurso a um separador magnético (*Separator*). Os cistos de artémia foram incubados num tanque cilíndrico-cónico com 100 L de volume, a uma salinidade de 26 - 28, equipado com uma resistência-termostato para

manter a temperatura a 28 °C e 2 arejadores, para arejar e manter a água e os cistos em constante movimento (Figura 7).



**Figura 7:** Incubação de cistos de artémia. A: Eclosão; B: Separação dos náuplios de artémia recém eclodidos dos córions e cistos, com recurso a *Separator*.

Durante estes dias, foi registada a mortalidade das PL e, ao fim do terceiro, foram contabilizadas as PL existentes em cada tanque, e colhidas amostras para a análise de biomarcadores de stress oxidativo e de reservas energéticas, tal como na amostragem inicial.

#### 2.2.2. Ensaio 2- crescimento

No segundo ensaio, ensaio de crescimento, foram colocados 200 PL em cada um dos 18 tanques, tendo sido atribuído a cada um, de forma aleatória, uma das dietas a testar.

Testaram-se 6 dietas: “52P”, uma dieta de tipo comercial contendo peixe de alta qualidade, lula, farinha de trigo e glúten de trigo; “FISH”, “SQUID” e “KRILL”, dietas formuladas e produzidas para conter farinhas de peixe, lula e krill, respetivamente, como ingredientes principais; “FISHHF”, dieta formulada e produzida para conter um maior teor de gordura bruta que as demais; e “BD”, dieta formulada e produzida com uma fração maior de aglutinantes em comparação com as demais, de forma a aumentar a estabilidade do grânulo, para um período mais longo de residência na água. As dietas foram produzidas pela SPAROS Lda. (Olhão, Portugal) onde os ingredientes foram misturados de acordo com a formulação estabelecida num misturador de dupla hélice, sendo posteriormente triturados duas vezes num moinho de martelo micropulverizador. A fração oleosa da formulação foi adicionada seguida de humidificação e aglomeração por extrusão de baixo

cisalhamento. Posteriormente, as rações foram secas durante 4 horas a 60 °C e trituradas e peneiradas em diferentes faixas de tamanho. A composição nutricional das 6 dietas utilizadas está exposta na Tabela 1.

**Tabela 2:** Composição nutricional das dietas utilizadas no ensaio de crescimento (MH – matéria húmida).

MH %	52P	FISH	FISH HF	SQUID	KRILL	BD
<b>Proteína</b>	53,5	54,8	54,4	54,3	53,5	54,9
<b>Lípidos</b>	14,5	14,2	16,3	14,3	14,3	14,2
<b>Fósforo</b>	1,6	1,7	1,7	1,6	1,7	1,7
<b>Cinzas</b>	9,6	12,0	12,1	10,6	12,0	12,0
<b>Energia (MJ/Kg)</b>	19,7	20,1	20,5	20,2	20,1	19,9

No dia em que se iniciou este ensaio, as PL pesavam em média  $13 \pm 2$  mg de peso húmido. O ensaio teve a duração de 21 dias, durante os quais as PL foram alimentadas *ad libitum*, e ao fim dos quais foram avaliados o desempenho do crescimento, a taxa de conversão alimentar, a sobrevivência, parâmetros de stress oxidativo e reservas energéticas.

### 2.3. Desempenho de Crescimento e Sobrevivência

Para análise do desempenho de crescimento no ensaio de crescimento foram utilizados, o peso corporal final (FBW), o ganho de peso, a taxa de conversão de alimento (FCR), e a taxa de crescimento relativo (RGR).

No ensaio de aclimação, a sobrevivência foi obtida através da contabilização das mortes diárias. No ensaio de crescimento a sobrevivência foi obtida pela diferença entre o número inicial de PL (200) e o número final.

### 2.4. Biomarcadores de Stress Oxidativo

Durante o processo de amostragem, foram recolhidas 30 pós-larvas inteiras e imediatamente congeladas em azoto líquido, e armazenadas a -80 °C, até processamento e análise. As amostras foram sonicadas em 1600 mL de água ultrapura. Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO), utilizou-se uma alíquota de 200 µL e o restante do homogeneizado ( $\approx 500$  µL) foi diluído em 500 µL de 0,2 M de tampão fosfato K, pH 7,4 (PBS), e centrifugado por 20 minuto a 10 000 g (4°C). O sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi dividido em três microtubos por cada amostra, que foram mantidos a -80 °C até a análise da atividade de catalase (CAT) e glutathiona-S-transferase (GST) (Inácio, 2018).

#### 2.4.1. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada em PMS pelo método de Claiborne (1996), com ligeiras modificações. Resumidamente, a mistura de ensaio consistiu em 0,190 mL de tampão fosfato (0,05 M, pH 7,0) com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,010 M) e 0,010 mL de PMS, perfazendo um volume final de 0,2 mL. A variação da absorvância foi medida em microplacas apropriadas com transparência UV (microplacas de fundo plano UV-Star®, Greiner Bio-One GmbH, Alemanha), registradas a 240 nm e atividade de CAT calculada em termos de  $\mu\text{mol}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por  $\text{min mg}^{-1}$  de proteína usando um coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de  $43,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Pereira, 2016).

#### 2.4.2. Atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada em PMS com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato, de acordo com o método de Habig *et al.* (1974). A mistura de ensaio consiste em 0,1 mL de PMS e 0,17 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 7,9) e GSH (0,0018 M). A reação foi iniciada por adição de 0,03 mL de CDNB (0,01 M) e o aumento da absorvância foi registrado a 340 nm. A atividade enzimática foi calculada como nmol conjugado de CDNB formado por  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Pereira, 2016).

#### 2.4.3. Glutathiona total (tGSH)

Para determinar o teor de glutathiona total (tGSH), o PMS foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA a 12%) durante 1 h e depois centrifugado a 12 000 g durante 5 min a 4 °C. O teor de tGSH foi determinado (em PMS desproteínizado) com recurso ao método de reciclagem enzimático usando excesso de glutathiona redutase (GR), onde o grupo sulfidrilo de GSH reage com o ácido 2-nitrobenzóico (5,5-Dithiobis, reagente de Ellmans, DTNB) produzindo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela (Tietze 1969 *apud* Baker *et al.*, 1990 *apud* Pereira, 2016). A taxa de produção de TNB é diretamente proporcional a essa reação de reciclagem, que é, por sua vez, diretamente proporcional à concentração de GSH na amostra. A mistura de ensaio consistiu em 0,2 mL de tampão de fosfato de sódio (0,143 M, pH 8), EDTA (0,0063 M), DTNB (0,001 M) e NADPH (0,00034 M), adicionados a 0,04 mL de PMS desproteínizado. A reação teve início com 0,04 mL de GR ( $8,5 \text{ U mL}^{-1}$ ). A formação de TNB foi medida a 415 nm. Deve ter-se em conta que a glutathiona dissulfeto (GSSG) é convertida em GSH pela GR neste sistema, o que, conseqüentemente, indica o GSH total. Os resultados foram expressos como nmol TNB formado  $\text{min}^{-1} \text{ mg}$  de proteína<sup>-1</sup> ( $\epsilon = 14,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Pereira, 2016).

#### 2.5. Peroxidação lipídica (LPO)

O homogeneizado de 200  $\mu\text{L}$  usado para determinar o LPO foi tratado com 4  $\mu\text{L}$  de uma solução a 4% do composto antioxidante butilado hidroxitolueno em metanol. A LPO foi

medida através do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm (Bird e Draper, 1984; Gladics *et al.*, 2017; Inácio, 2018).

## 2.6. Reservas Energéticas

### 2.6.1. Lípidos

O conteúdo total de lípidos foi separado da amostra por centrifugação (300 µL de amostra homogeneizada) com a adição de 500 µL de clorofórmio (119,38 M; grau espectrofotométrico ACS, ≥99,8%) e metanol (32,04 M; classificação espectrofotométrica ACS, ≥99,8%). A fase orgânica de cada amostra foi transferida para tubos de vidro limpos, tendo sido adicionados 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubados a 200 °C por 15 minutos. Após a temperatura baixar até à temperatura ambiente, 1500 µL de água ultra-pura foram adicionados a cada tubo e a absorvância foi medida na microplaca a 375 nm. A tripalmitina foi utilizada como padrão lipídico (Rodrigues *et al.*, 2015).

### 2.6.2. Hidratos de carbono

A quantificação do teor de hidratos de carbono foi realizada adicionando 100 µL de TCA a 15% a 300 µL de amostra homogeneizada, seguido de uma incubação de 10 minutos a -20 °C. Depois, foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos a 4 °C, após o que foram adicionados 200 µL de fenol a 5% e 800 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As amostras, e a glicose (usada como padrão), foram incubadas a 20 °C por 30 minutos e a absorvância lida a 492 nm numa microplaca (Rodrigues *et al.*, 2015).

### 2.6.3. Proteínas

O método de Bradford (Bradford, 1976) foi usado para quantificar a proteína total na amostra homogeneizada utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorvância foi medida a 520 nm, após 30 minutos de incubação na microplaca (Rodrigues *et al.*, 2015).

### 2.6.4. Energia disponível (Ed)

O valor de energia disponível (Ed) foi obtido através da soma dos lípidos, hidratos de carbono e proteínas.

### 2.6.5. Energia consumida (Ec)

A energia consumida (Ec) é medida pela atividade da cadeia transportadora de eletrões (ETS).

Para a medição da atividade ETS, 150 µL de tampão de homogeneização (0,3 M base Tris; 0,45% (m / v) Polivinilpirrolidona; 459 mg MgSO<sub>4</sub>; 0,6% (v / v) Triton X-100, pH de 8,5) foram adicionados a 300 µL de amostra homogeneizada que foram em seguida centrifugados (1000 g 10 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi transferido para uma microplaca (50 µL por

réplica) e aos quais foram adicionados 150 µL de solução tampão base Tris 0,13 M; 0,27% (v / v) de Triton X-100; 1,7 mM NADH; 274 µM NADPH; e 100 µL de solução INT (p-iodonitrotetrazólio; 8 mM). A absorbância foi medida cineticamente a 490 nm durante um período de 3 minutos (Rodrigues *et al.*, 2015).

#### 2.6.6. Alocação de energia celular (AEC)

O valor da alocação de energia celular (AEC) foi obtido através da seguinte fórmula:  $AEC = Ed/Ec$  (Verslycke *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2015).

#### 2.7. Análise de dados

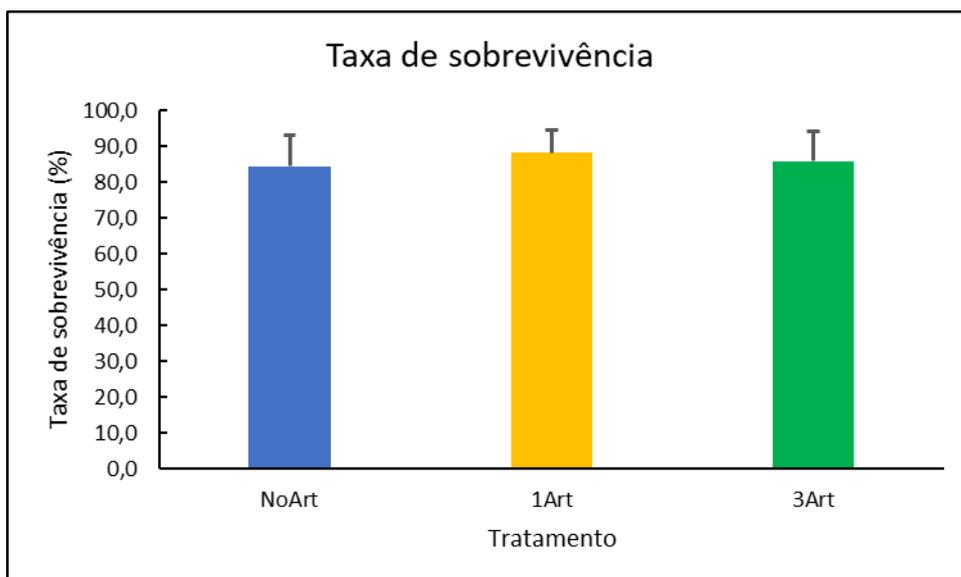
Para realizar a análise estatística dos resultados, começou por se verificar a normalidade dos dados com recurso ao teste Anderson-Darling e Ryan-Joiner, e a homogeneidade dos dados através do teste de Bartlett. Em seguida, foi realizado um teste ANOVA de um fator confrontando os valores para cada indicador com o tratamento/dieta utilizado, com um nível de significância de  $p < 0.05$ . Nos casos em que não se verificou normalidade e homogeneidade dos dados, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No ensaio de aclimação foi analisada a variação entre o valor final para cada tratamento e o valor inicial.

### 3. Resultados

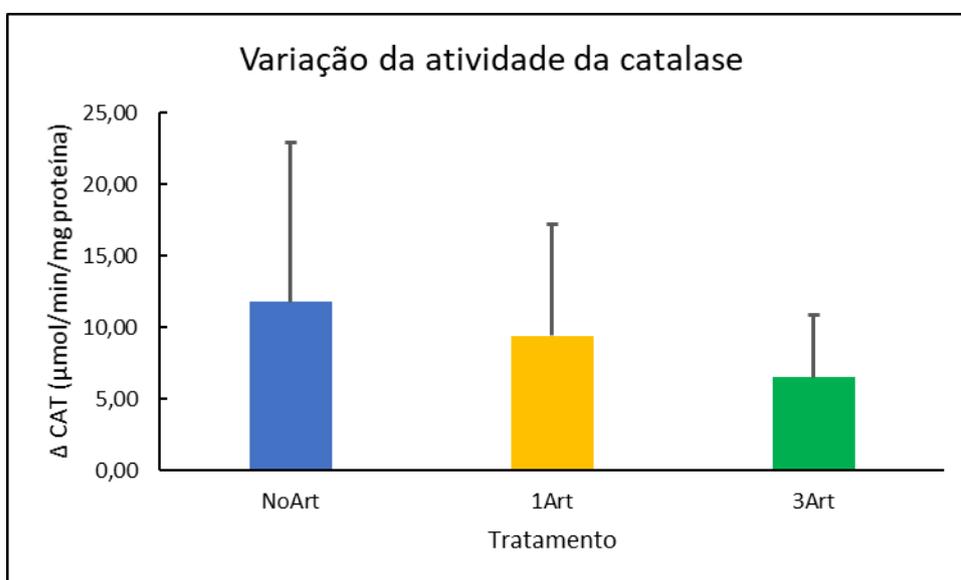
#### 3.1. Ensaio 1- Aclimação

Os resultados da sobrevivência do ensaio de aclimação estão expostos na Figura 8, não se verificando diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.



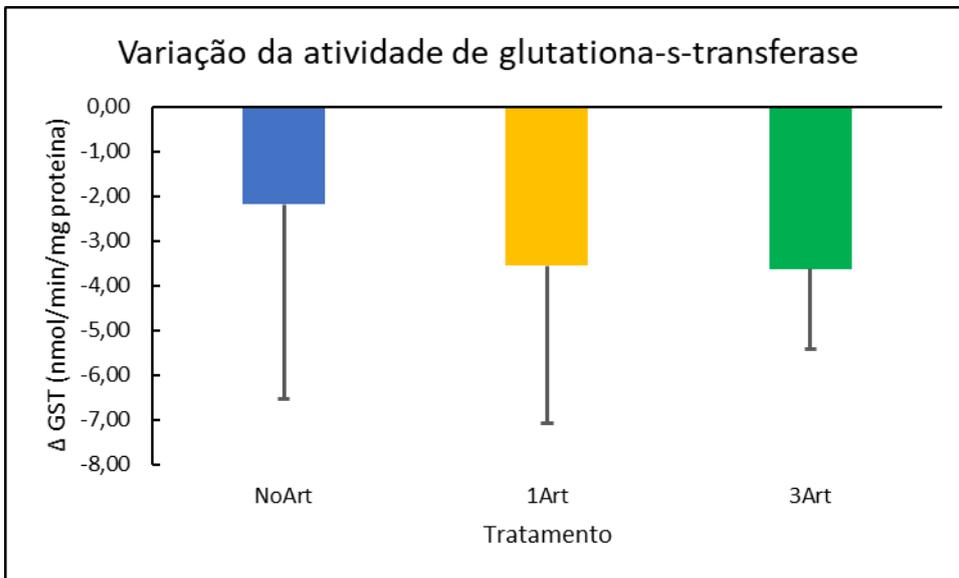
**Figura 8:** Taxa de sobrevivência obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

Os resultados da variação da atividade da catalase, resultado da diferença entre os valores finais e os valores obtidos no final do ensaio, estão expostas na Figura 9. Não se verificam diferenças entre os tratamentos para este parâmetro.



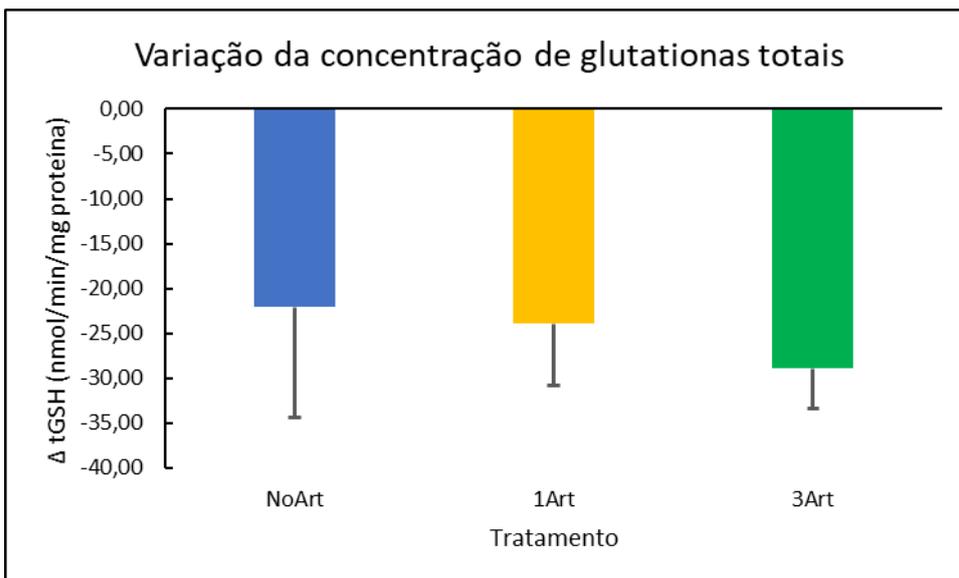
**Figura 9:** Variação da atividade da catalase obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da atividade de glutathiona-S-transferase é apresentada na Figura 10. Neste parâmetro também não se verificam diferenças significativas entre tratamentos.



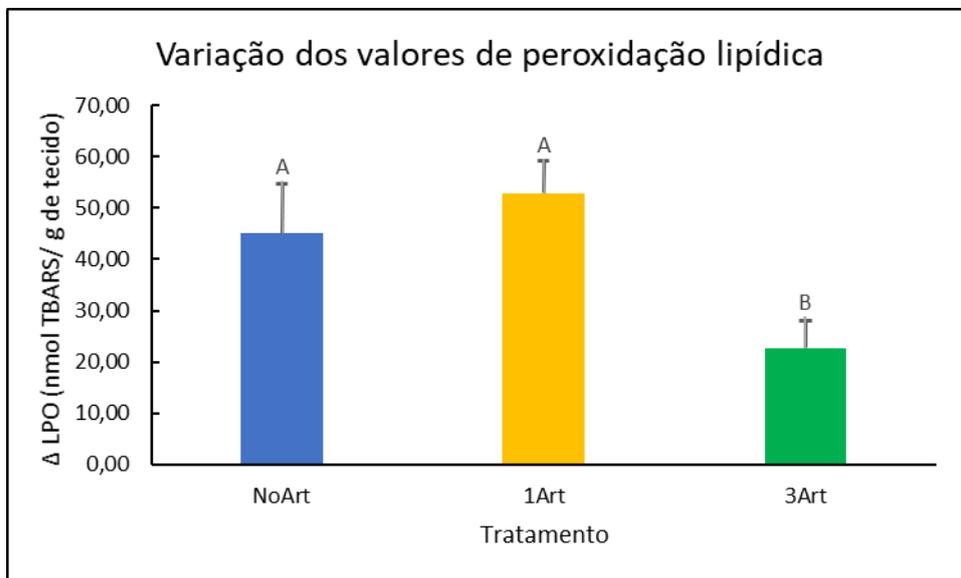
**Figura 10:** Variação da atividade de glutathiona-S-transferase obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da concentração de tGSH é apresentada na Figura 11. Não se verificam diferenças para este parâmetro.



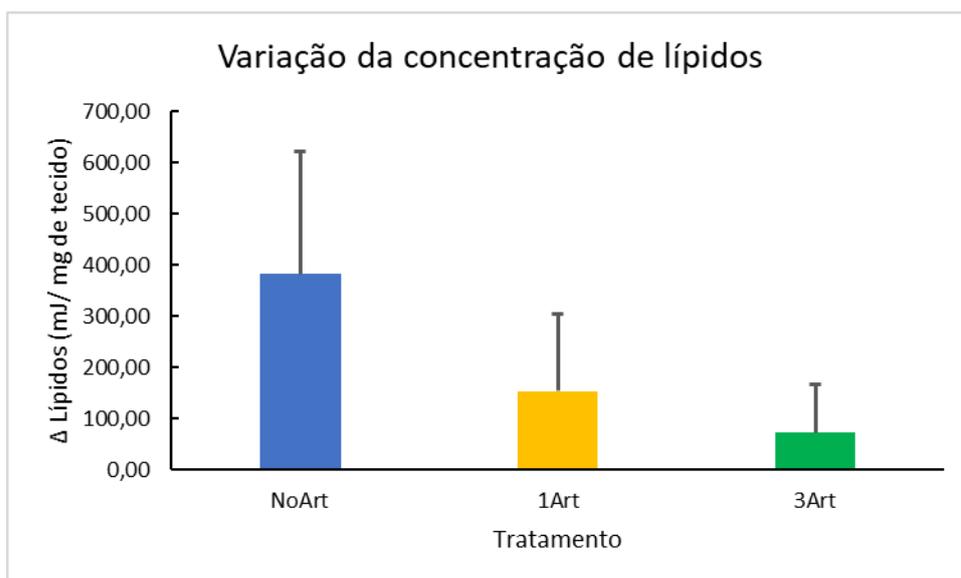
**Figura 11:** Variação da concentração de glutathionas totais obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação dos valores de peroxidação lipídica é apresentada na Figura 12. Verifica-se que o tratamento 3Art é significativamente diferente dos outros dois tratamentos, apresentando valores de diferença da peroxidação lipídica significativamente inferiores aos obtidos nos tratamentos NoArt e 1Art.



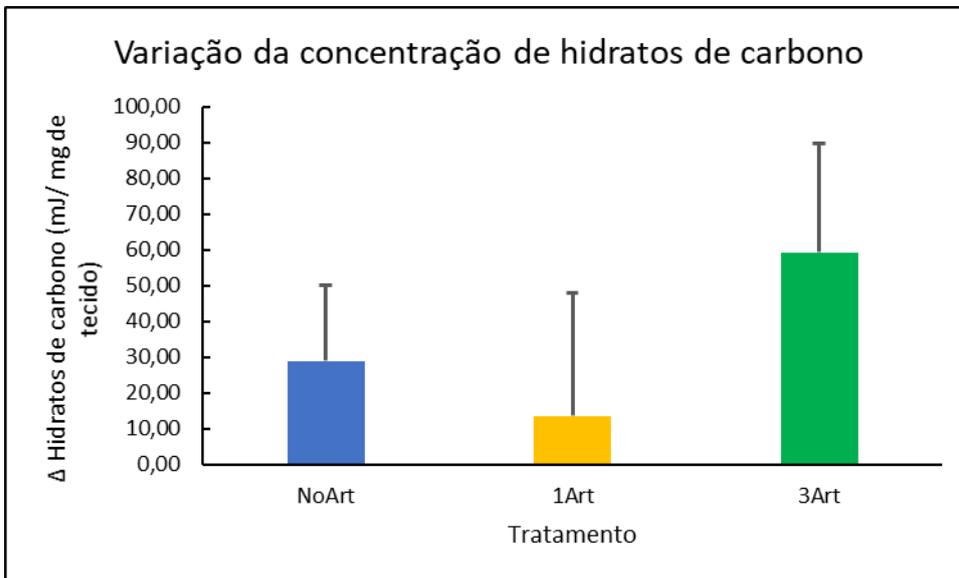
**Figura 12:** Variação dos valores de peroxidação lipídica obtidos em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0,05$ ).

A variação da concentração de lípidos, resultado da diferença entre os valores obtidos no início e no fim do ensaio, é apresentada na Figura 13. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



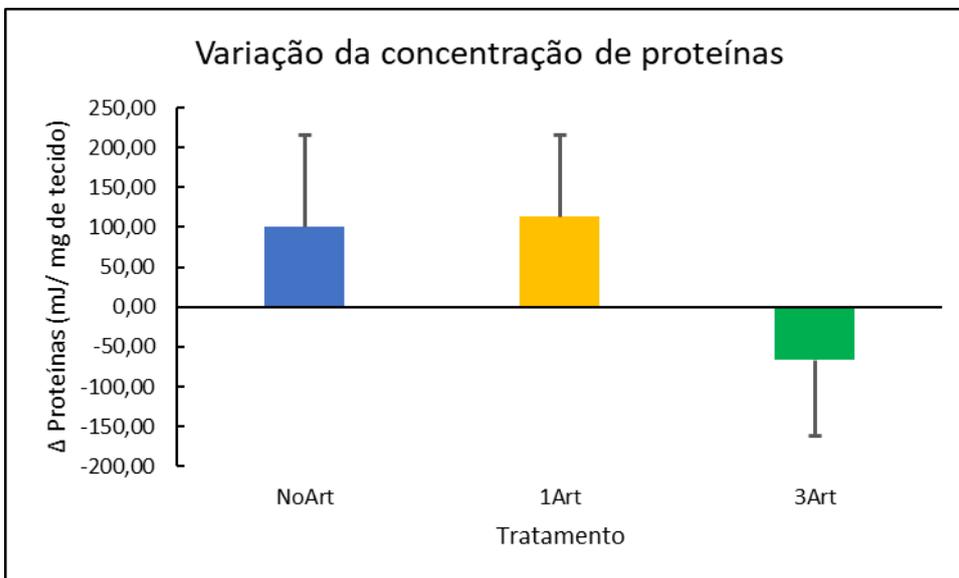
**Figura 13:** Variação da concentração de lípidos obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da concentração de hidratos de carbono é apresentada na Figura 14. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



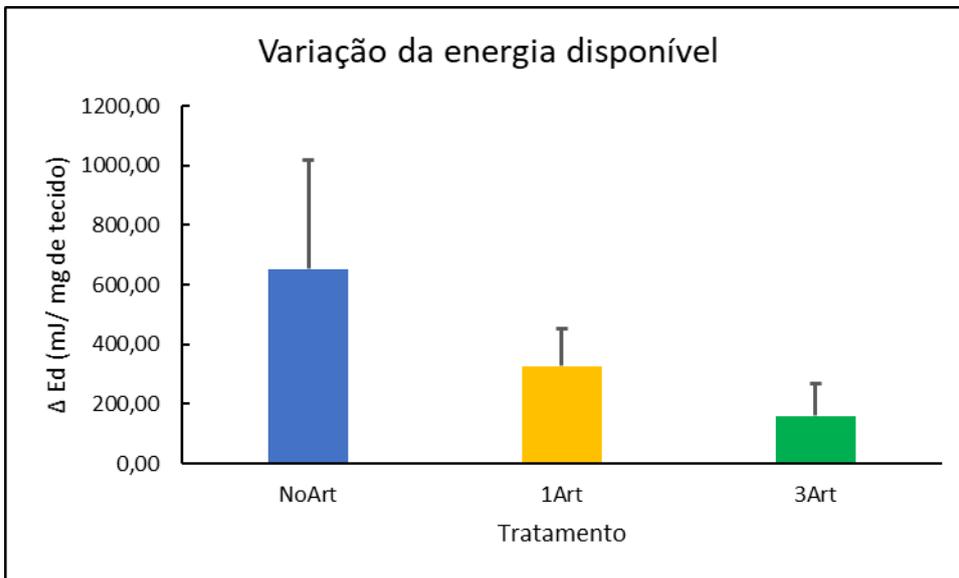
**Figura 14:** Variação da concentração de hidratos de carbono obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da concentração de proteínas é apresentada na Figura 15. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



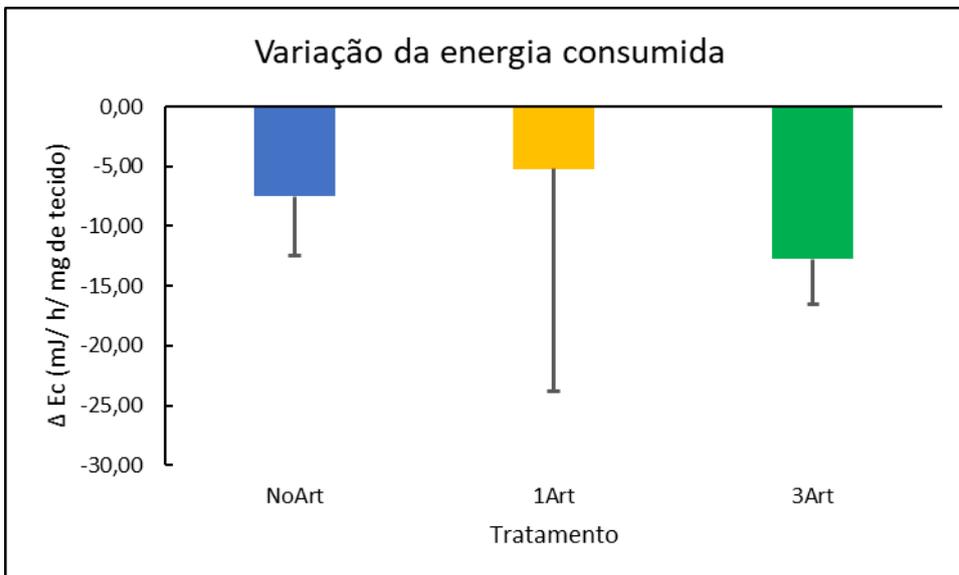
**Figura 15:** Variação da concentração de proteínas obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da energia disponível é apresentada na Figura 16. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



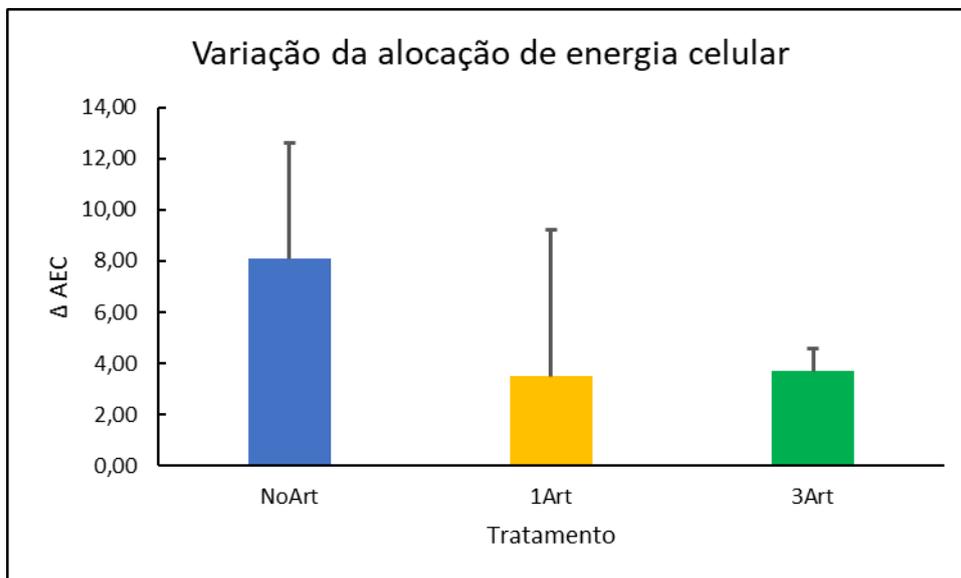
**Figura 16:** Variação da energia disponível obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

A variação da energia consumida é apresentada na Figura 17. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



**Figura 17:** Variação da energia consumida obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

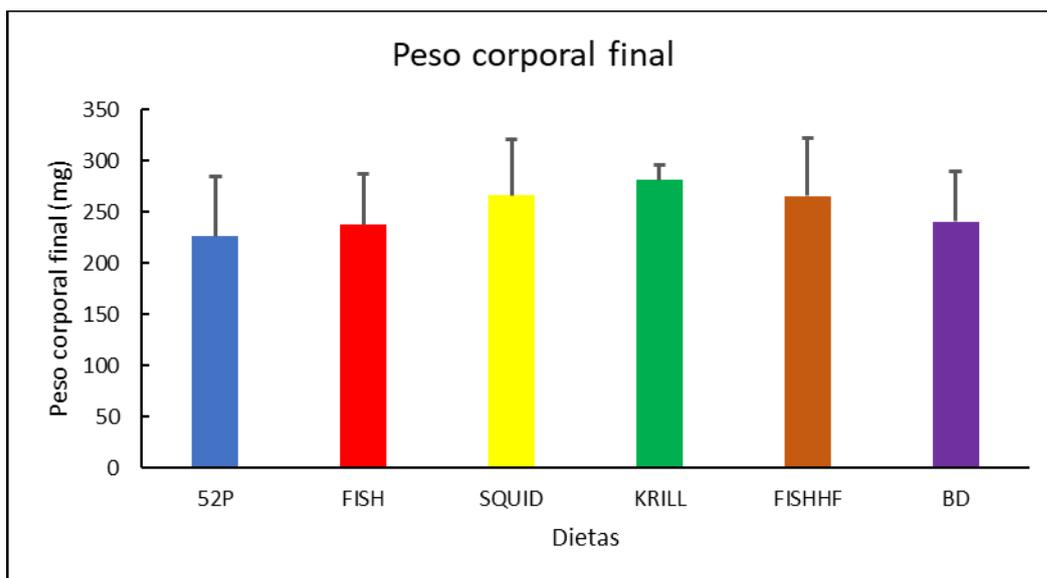
A variação da alocação de energia celular é apresentada na Figura 18. Não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos.



**Figura 18:** Variação da alocação de energia celular obtida em PL de *P. vannamei* aclimatados com três tratamentos. NoArt - apenas com dieta inerte, 1Art - dieta inerte e um dia de artémia recém eclodida, 3Art - ração inerte e artémia recém eclodida durante todo o ensaio.

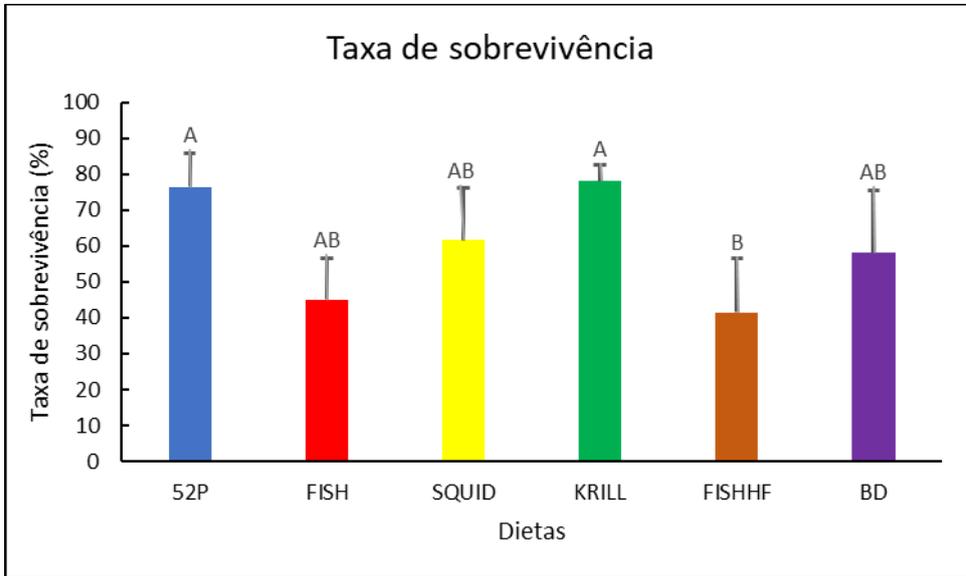
### 3.2. Ensaio 2 – Crescimento

Os resultados do peso corporal final são apresentados na Figura 19. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



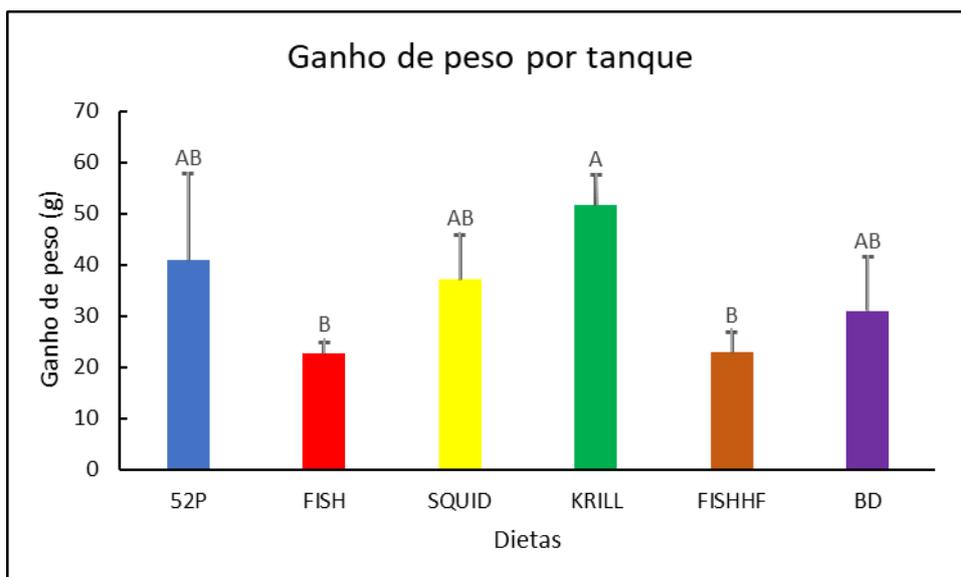
**Figura 19:** Peso corporal final obtido em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da taxa de sobrevivência são apresentados na Figura 20. Apenas existem diferenças significativas entre as dietas 52P e KRILL e a dieta FISHHF, no que toca à taxa de sobrevivência, apresentando a dieta FISHHF valores de sobrevivência significativamente inferiores.



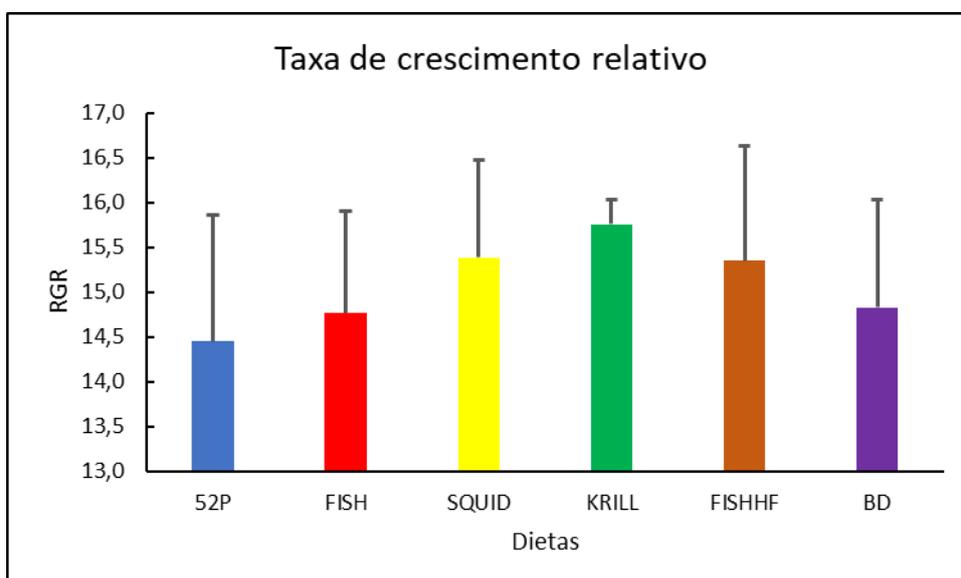
**Figura 20:** Taxa de sobrevivência obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados do ganho de peso por tanque são apresentados na Figura 21. A dieta KRILL é significativamente diferente das dietas FISH e FISHHF, produzindo valores mais elevados de ganho de peso.



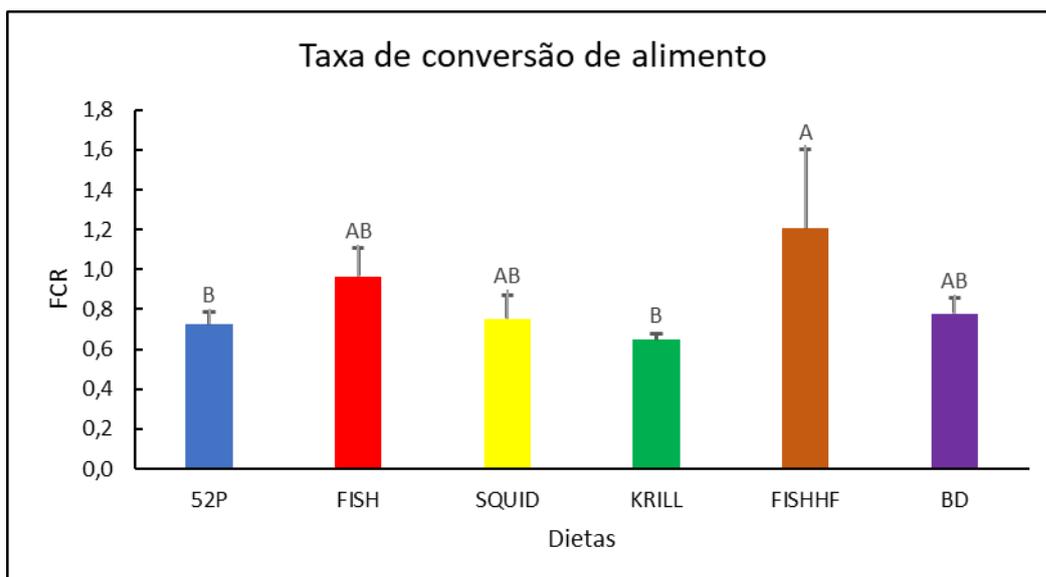
**Figura 21:** Ganho de peso por tanque obtido em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados da taxa de crescimento relativo (RGR) são apresentados na Figura 22. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



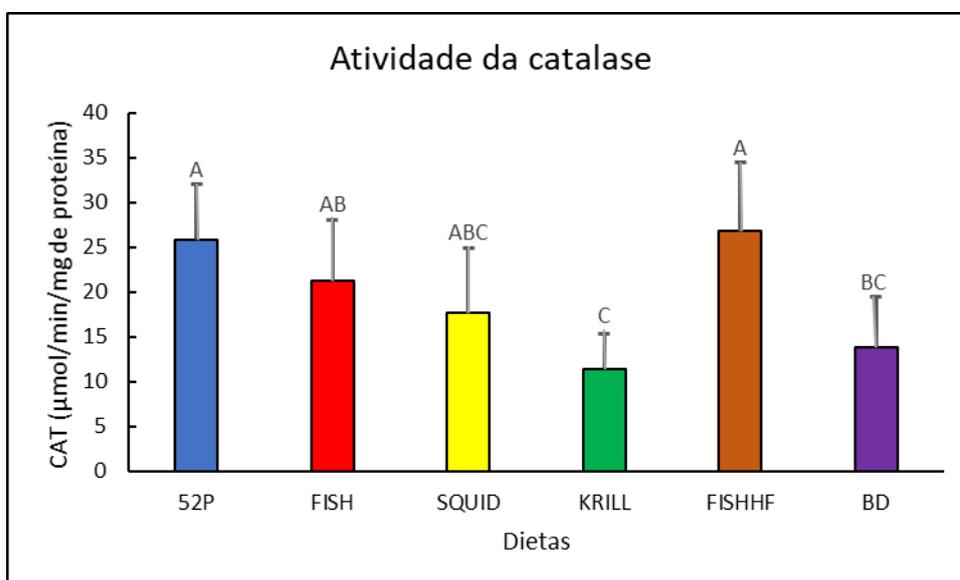
**Figura 22:** Taxa de crescimento relativo obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da taxa de conversão de alimento são apresentados na Figura 23. A dieta FISHHF é significativamente diferente das dietas 52P e KRILL.



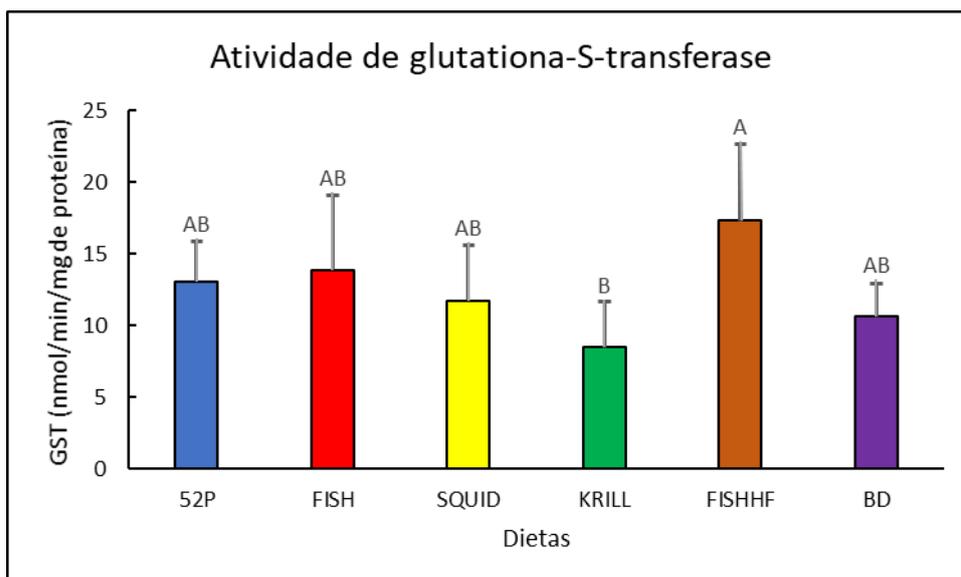
**Figura 23:** Taxa de conversão de alimento obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados da atividade da catalase são apresentados na Figura 24. As dietas 52P e FISHHF apresentam atividade de catalase significativamente superior às dietas BD e KRILL, e esta última apresenta um valor significativamente inferior à dieta FISH.



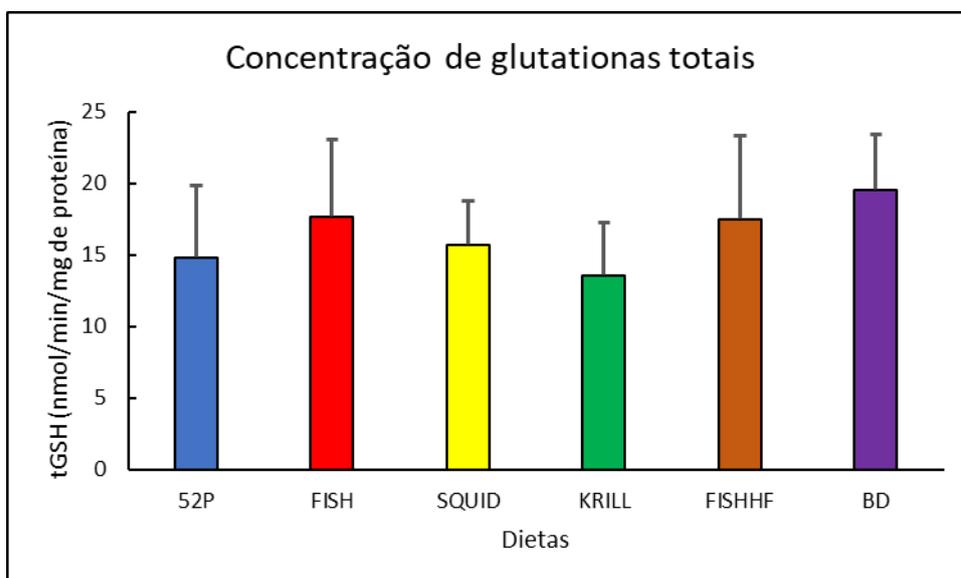
**Figura 24:** Atividade de catalase obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados da atividade de glutatona-S-transferase são apresentados na Figura 25. AS dietas KRILL e FISHHF são significativamente diferentes.



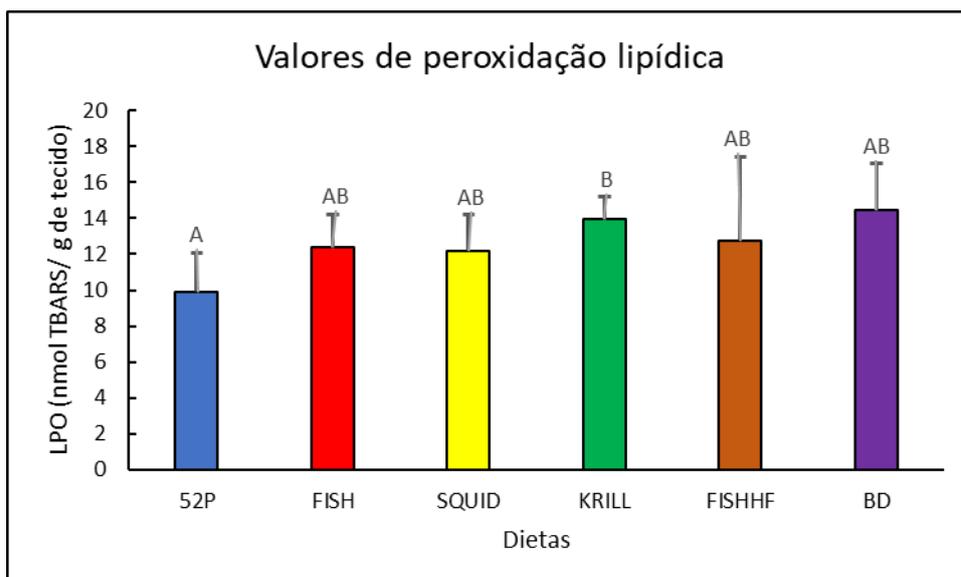
**Figura 25:** Atividade de glutatona-S-transferase obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados da concentração de glutatona total são apresentados na Figura 26. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



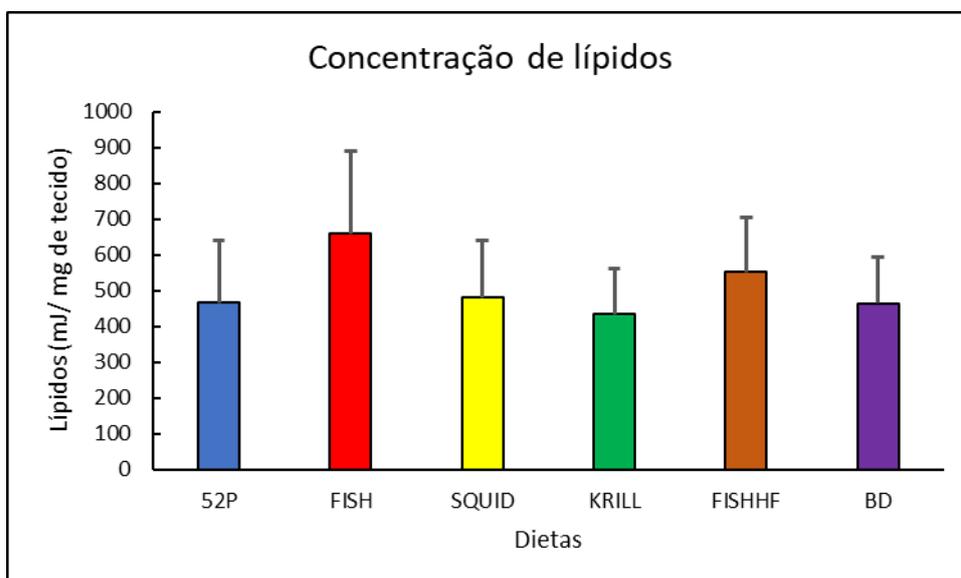
**Figura 26:** Concentração de glutatona total obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os valores de peroxidação lipídica são apresentados na Figura 27. A dieta 52P apresenta um valor de peroxidação lipídica significativamente inferior à dieta KRILL.



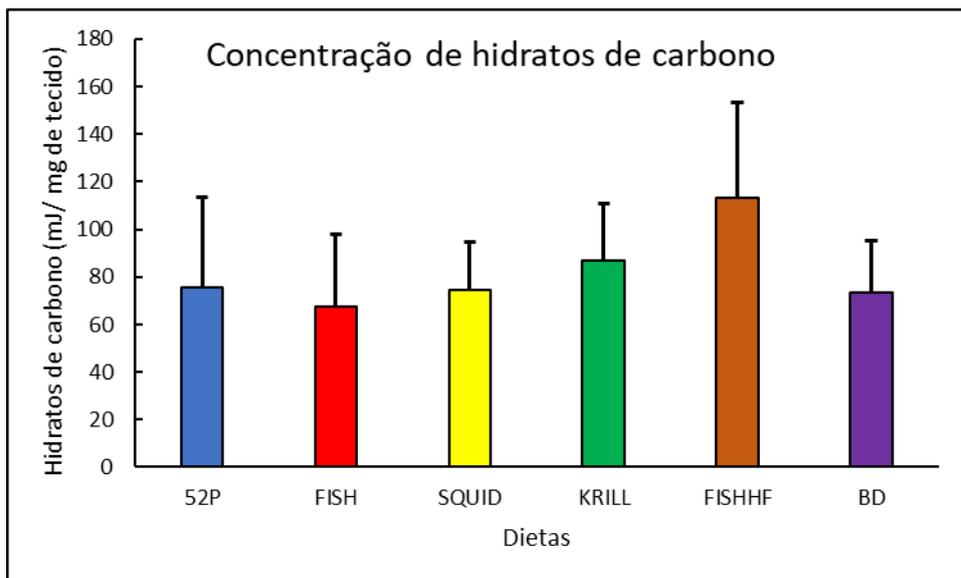
**Figura 27:** Valores de peroxidação lipídica obtidos em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias (Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os tratamentos  $p < 0.05$ ).

Os resultados da concentração de lípidos são apresentados na Figura 28. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



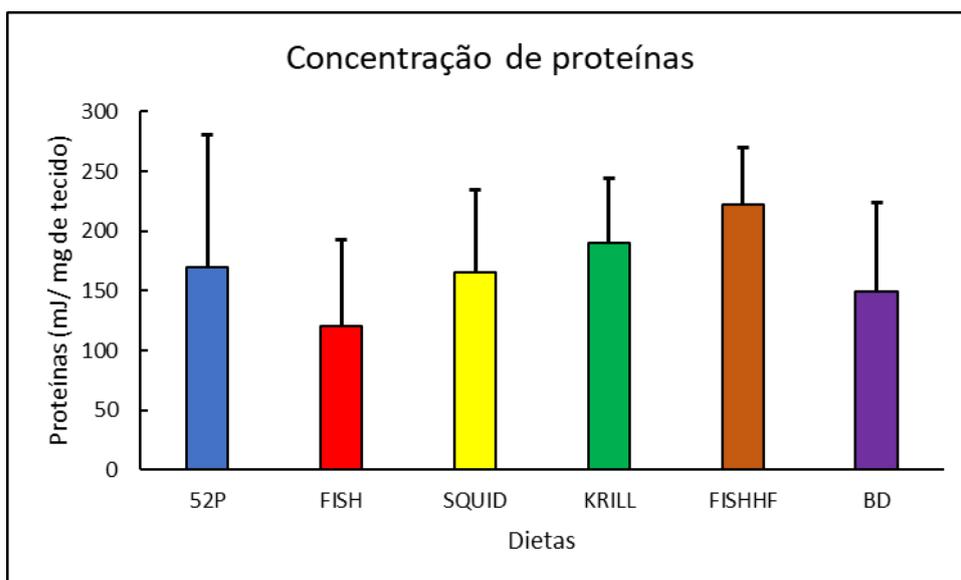
**Figura 28:** Concentração de lípidos obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da concentração de hidratos de carbono são apresentados na Figura 29. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



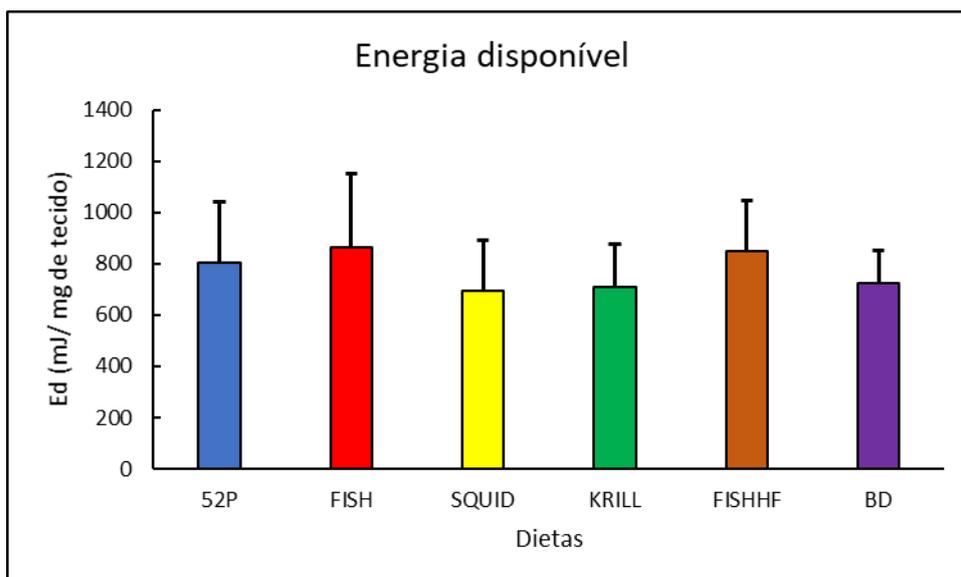
**Figura 29:** Concentração de hidratos de carbono obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da concentração de proteínas são apresentados na Figura 30. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



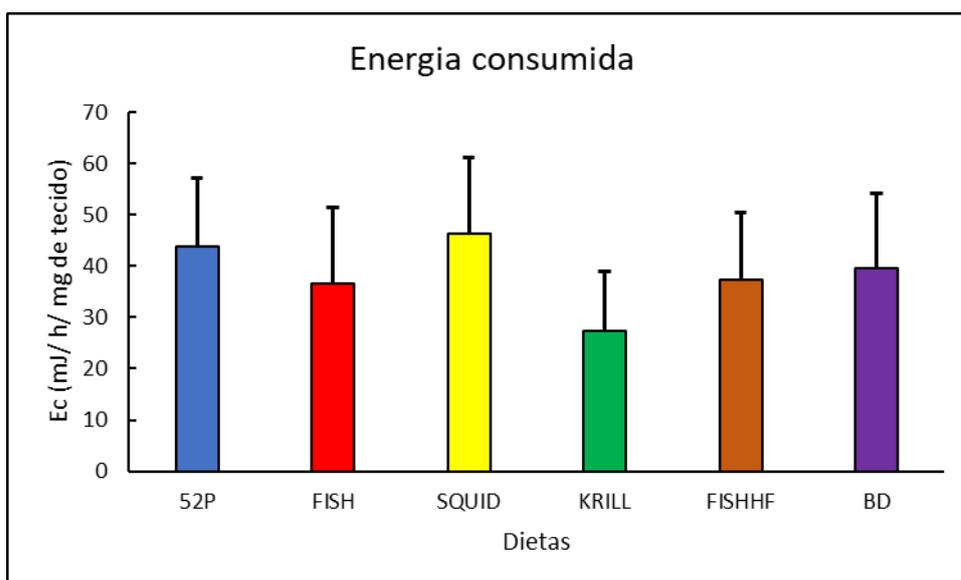
**Figura 30:** Concentração de proteínas obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da energia disponível são apresentados na Figura 31. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



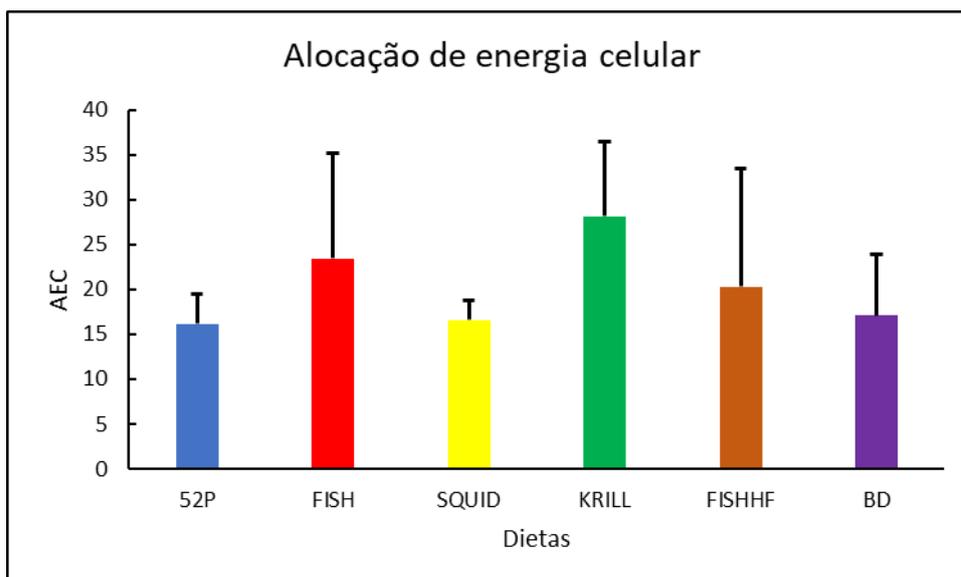
**Figura 31:** Energia disponível obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da energia consumida são apresentados na Figura 32. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



**Figura 32:** Energia consumida obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

Os resultados da alocação de energia celular são apresentados na Figura 33. Não se verificam diferenças significativas entre as dietas.



**Figura 33:** Alocação de energia celular obtida em PL de *P. vannamei* após ensaio de crescimento de vinte e um dias.

## 4. Discussão

### 4.1. Ensaio 1 - Aclimação

O ensaio de aclimação foi realizado com o objetivo de detetar diferenças na sobrevivência das pós-larvas, utilizando para isso diferentes estratégias de alimentação após a chegada. Embora as PL utilizadas neste ensaio estivessem a ser alimentadas exclusivamente com dietas inertes desde o seu assentamento, seria expectável que o fornecimento de náuplios de artémia vivos contribuísse para dissipar o seu comportamento canibal, uma vez que o longo período de inanição durante o transporte (mais de 24 horas) associado ao facto da existência de uma concentração de PL elevada após a chegada, gera um estado de stress que pode potenciar o canibalismo entre indivíduos (Supriyono et al., 2021). No entanto, isso não se verificou após os 3 dias de ensaio. Contudo, importa evidenciar que o método de contagem, por estimativa, utilizado para a distribuição inicial das PL nos tanques tem uma margem de erro elevada, que pode ter influenciado os resultados. Mas, devido ao tamanho muito reduzido das pós-larvas aquando da chegada, bem como à intenção de utilizar o maior número de réplicas possível, este foi o método selecionado por questões de exequibilidade. Por outro lado, nesta fase do desenvolvimento destes organismos, a ingestão dos animais mortos dentro dos tanques é um processo relativamente rápido, pelo que a mortalidade pode também estar ligeiramente subestimada, principalmente a mortalidade ocorrida durante o período noturno.

Um trabalho realizado por Xue et al. (2021), verificou um aumento da taxa de crescimento de *P. vannamei* com a utilização de uma dieta conjunta de alimento vivo e ração inerte. No entanto, também ficaram claros os maiores custos existentes com a produção de alimento vivo, pelo que opções menos dispendiosas, que não comprometam a eficiência, são usualmente os adotados em cenários de produção comercial.

No que se refere aos biomarcadores de stress oxidativo, embora sem diferenças significativas, verificou-se uma tendência de menor aumento da catalase, quanto menor é o fornecimento de artémia recém eclodida. Sendo esta variação mínima no tratamento sem artémia recém eclodida. Esta observação apoia os resultados de dano celular obtidos para a peroxidação lipídica, em que se verifica um dano celular significativamente maior no tratamento sem artémia recém eclodida.

Quanto à glutathione-S-transferase e à glutathione total, não só não se verificaram diferenças significativas, como também não foi possível verificar nenhuma tendência.

No que toca às variações de concentração de lípidos, hidratos de carbono e proteínas, seria conveniente comparar as mesmas com as composições das respetivas alimentações fornecidas. Embora tenha sido recolhida uma amostra da artémia utilizada, para avaliação da sua composição nutricional, à data da redação desta dissertação ainda não são conhecidos os resultados, pelo que não podem ser discutidas as variações das reservas energéticas das PLs utilizadas no ensaio.

Ocorreu um maior aumento da energia disponível e consequentemente da alocação de energia celular das PL aclimatadas apenas com dieta inerte, sendo possivelmente este, mais um indicador da melhor condição física destes animais.

#### 4.2. Ensaio 2 - crescimento

Neste ensaio, começando por analisar os resultados relativos ao desempenho de crescimento e sobrevivência, foram observados claros benefícios ao nível do ganho de peso por tanque, sobrevivência e taxa de conversão de alimento das PL de *L. vannamei*, alimentadas com as dietas 52P (controlo), SQUID, KRILL e BD. Assim, de entre os novos ingredientes testados destacam-se a lula e o krill como boas fontes de proteína para o desenvolvimento das PL.

Através da substituição parcial da farinha peixe por farinha de caranguejo vermelho (*Pleuroncodes planipes*), Goytortúa-Bores et al. (2006) obtiveram melhorias no crescimento e taxa de conversão de alimento nas fases juvenis de *P. vannamei*.

Por outro lado, Derby et al. (2016) demonstraram um aumento da atratividade e com isso um aumento do consumo de ração em *P. vannamei* através da adição de farinha de krill à

ração, ficando já aqui evidente o potencial deste ingrediente na formulação de rações para esta espécie.

Também o trabalho de Soares *et al.* (2021) mostraram um aumento do consumo de ração, e uma melhoria da taxa de crescimento, através da adição de farinha de krill a uma dieta à base de soja para a alimentação de *P. vannamei*.

Por outro lado, o aumento nos níveis de lípidos não apresentou benefícios no desenvolvimento das PL (FISH vs. FISHHF).

No que toca ao desempenho de crescimento e sobrevivência, as dietas 52P, KRILL e SQUID parecem ser os mais adequados para esta fase de desenvolvimento dos camarões. No entanto, serão em seguida discutidos os resultados relativos ao stress oxidativo e às reservas energéticas.

Verificou-se uma tendência para uma maior expressão de biomarcadores de stress oxidativo nas PL alimentadas com as dietas FISH e FISHHF, contrariamente aos resultados obtidos nas PL alimentadas com a dieta KRILL. Por outro lado, as PL alimentadas com a dieta KRILL evidenciaram valores elevados de peroxidação lipídica, o que eventualmente poderá ser explicado por uma falha da primeira e segunda linha de defesa, catalase e glutatonas, respetivamente, levando assim a um maior dano oxidativo nestas PL.

Por outro lado, este maior dano celular também pode ser relacionado com a elevada sobrevivência. Ou seja, outras dietas apresentam menor dano celular por apresentarem menor taxa de sobrevivência, morrendo assim os animais com maior dano celular. No caso da dieta KRILL a elevada sobrevivência, aliada ao maior dano celular, pode indicar uma maior tolerância dos animais ao dano celular, sem que ocorra morte.

Quanto à energia, verificamos que embora não seja significativa, a dieta KRILL apresenta um valor mais baixo de energia consumida e conseqüentemente maior valor de alocação de energia celular, o que reforça a ideia de um menor stress oxidativo obtido com esta dieta, já que a um maior stress está associado maior consumo de energia de forma a lidar como mesmo.

## **5. Conclusões**

Do ensaio de aclimação concluiu-se que a curto prazo a utilização de artémia recém eclodida no processo de aclimação de PL de *P. vannamei* (3Art), apenas acrescentou vantagem significativa a nível do dano celular (3Art). No entanto, esta vantagem é contrabalançada por uma tendência para aos animais aclimatados apenas com dieta inerte (NoArt) apresentarem melhores resultados em vários dos outros parâmetros analisados.

Conclui-se assim que o dispêndio de tempo e recursos na eclosão de artémia não é justificado pelos seus benefícios a curto prazo.

Do ensaio de crescimento concluiu-se que, das novas dietas testadas, a que produziu melhores resultados foi a KRILL. Concluiu-se também que a dieta baseada em farinha de peixe (FISH), comumente utilizada como fonte de proteína nas rações utilizadas em aquicultura, não é de todo a melhor opção para as PL de *P. vannamei*, não melhorando com a adição de maiores concentrações de gorduras (FISHHF).

Posto isto, com recurso a novos ensaios de confirmação e comparando a dieta KRILL com as dietas já existentes no mercado, poderemos encontrar nesta uma nova opção para a otimização do crescimento das PL de *P. vannamei*.

## 6. Bibliografia

- Ayisi, C. L., Hua, X., Apraku, A., Afriyie, G., & Kyei, B. A. (2017). Recent Studies Toward the Development of Practical Diets for Shrimp and Their Nutritional Requirements. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(3), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2017.09.004>
- Cook, H. L., & Murphy, M. A. (1969). The Culture of Larval Penaeid Shrimp. *Transactions of the American Fisheries Society*, 98(4), 751–754. doi:10.1577/1548-8659(1969)98[751:tcolps]2.0.co;2
- Derby, C. D., Elsayed, F. H., Williams, S. A., González, C., Choe, M. N., Bharadwaj, A. S., & Chamberlain, G. W. (2016). Krill meal enhances performance of feed pellets through concentration-dependent prolongation of consumption by Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 458, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.028>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. In *Fao*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2018). World Fisheries and Aquaculture Sofia Report. Retrieved from [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
- Gladics, A. J., Melvin, E. F., Suryan, R. M., Good, T. P., Jannot, J. E., & Guy, T. J. (2017). Fishery-specific solutions to seabird bycatch in the U.S. West Coast sablefish fishery. *Fisheries Research*, 196(April), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.08.015>
- Goujon, A. (2018). Human population growth. *Encyclopedia of Ecology*, 4(March 2018), 344–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10755-9>
- Goytortúa-Bores, E., Civera-Cerecedo, R., Rocha-Meza, S., & Green-Yee, A. (2006). Partial

- replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256(1-4), 414–422. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.02
- Inácio, L. A. (2018). Efeito da temperatura no processo de depuração de *Ruditapes decussatus* cultivadas em zonas de produção com classificação C. Universidade de Aveiro.
- Pereira, V. S. A. S. (2016). Efeitos protetores de suplementação alimentar com macroalgas marinhas na integridade genética de dourada (*Sparus aurata*). Universidade de Aveiro.
- Rodrigues, A. C. M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., ... Pestana, J. L. T. (2015). Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 508, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Rojo-Arreola, L., García-Carreño, F., Romero, R., & Dominguez, L. D. (2020). Proteolytic profile of larval developmental stages of *Penaeus vannamei*: An activity and mRNA expression approach. *PLoS ONE*, 15(9 September), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239413>
- Soares, R., Peixoto, S., Davis, R. P., & Davis, D. A. (2021). Feeding behavior and growth of *Litopenaeus vannamei* fed soybean-based diets with added feeding effectors. *Aquaculture*, 536, 736487. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.73
- Supriyono, E., Rasul, Budiardi, T., Hastuti, Y. P., Adiyana, K., & Thesiana, L. (2021). A study on the effect of different colours of culture tanks in nursery, on the production performance, biochemical composition of flesh and physiological responses of whiteleg shrimp ( *Litopenaeus vannamei* ). *Aquaculture Research*. doi:10.1111/are.15246
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2013). Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 22–38. <https://doi.org/10.1080/10641262.2012.753405>
- Xue, S., Ding, J., Li, J., Jiang, Z., Fang, J., Zhao, F., & Mao, Y. (2021). Effects of live, artificial and mixed feeds on the growth and energy budget of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 19(November 2020), 100634. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100634>