

Rui Miguel Dos Santos Pereira

O efeito da qualidade da proteína na
condição de juvenis de corvina
(*Argyrosomus regius*)



Faculdade de Ciências e Tecnologia

2018

Rui Miguel Dos Santos Pereira

O efeito da qualidade da proteína na
condição de juvenis de corvina
(*Argyrosomus regius*)

Dissertação para obter o grau
Mestre em Aquacultura e Pescas
– especialização em
Aquacultura, submetido à
Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade do
Algarve.

Orientadores:

Doutora Laura Ribeiro, IPMA

Doutor Paulo Gavaia, UALG



Faculdade de Ciências e Tecnologia

2018

O efeito da qualidade da proteína na condição de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*).

Declaração da autoria desta dissertação:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluídas.

X

© 2018 Rui Pereira

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível sem a ajuda do seguinte grupo de pessoas:

- À minha orientadora, Doutora Laura Ribeiro (IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera), por ter sido incansável desde do momento que entrei na EPPO e durante toda esta aventura, acompanhando-me e partilhando todo o conhecimento necessário para a realização deste ensaio, a quem muito se deve a finalização desta tese.
- Ao laboratório do Doutor Francisco Ruano no IPMA de Algés, por me ter cedido o espaço e equipamento.
- Ao Doutor Jorge Dias e à SPAROS, Lda. pelo fornecimento das dietas utilizadas neste ensaio;
- À Marisa Barata que desde do primeiro dia sempre esteve disponível para ajudar no ensaio e ajudar a esclarecer qualquer dúvida sobre o ensaio ou construção da tese.
- A todos os elementos da EPPO por me terem acolhido e por serem um grupo de trabalho espetacular.
- À D. Lurdes, que me acolheu na sua casa e tratou-me como seu filho;
- À Sara por ter sido a melhor colega de casa e do ensaio que poderia ter tido, e pela construção de uma grande amizade;
- Ao Ivo, por ter estado sempre disponível para ajudar no trabalho e por ter estado ao meu lado também nos momentos de diversão, ao grande amigo que se tornou.
- Aos meus pais que lutaram e tornaram isto possível e a quem dedico todo o meu trabalho.
- Ao meu irmão por ser a grande pessoa que é, por ser a minha alegria e a quem tenho muito orgulho do homem que se está a tornar.
- À minha namorada que sempre esteve ao meu lado, apesar de estarmos tão distantes e que sempre me apoio nos momentos piores desta aventura.
- Ao meu primo André que foi fundamental toda a ajuda e conselhos que me deu para finalizar a tese.
- A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram este trabalho possível.
- Ao projecto DIVERISAQUA (ref. 16-02-01-FEAM-66, MAR2020, Portugal).

Keywords: meagre; alternative ingredients, industry by-products; protein quality

Abstract

In the present study the effect of dietary protein quality on Meagre growth performance and physiological response, was assessed through growth indexes and the analysis of haematological and histological parameters (liver and intestine)

The feeds were isoenergetic and isoproteic (approximately 45% protein). Diet formulation was identical for both diets (45P and 45PALT), except that 45PALT diet used feather meal and blood pork meal as ingredients and had higher levels of soy 48 meal when compared to 45P diet.

Diets were tested in triplicate. A total of 576 meagre juveniles with an initial weight of 55.5 ± 6.4 g, were distributed by 6 tanks of 1 m³ in water flow through system and reared for a period of 12 weeks. Fish were fed 2 / 3 times a day until satiation (or *ad libitum*). Water quality parameters (oxygen and temperature) were monitored on a daily basis, whereas nitrogen compounds were controlled every 2 weeks. Growth parameters were assessed collected very 4 weeks, when blood samples of 12 fish per treatment were also collected for haematocrit, haemoglobin and cell count determinations. At the final sampling after blood collection fish were sacrificed to collect liver and intestine for histological analysis.

The results obtained suggest an influence of the quality of the protein to the feed conversion ratio and accumulation of lipids in liver ($P < 0,05$), this was an unexpected result since the treatments subjected to the ration with ingredients of better quality (45P) were those that had a greater accumulation of lipids in liver. The haematological parameters and the intestine histology didn't show significant differences between treatments.

Future studies using biomarkers in order to verify the condition to the cellular selector of the intestine will be performed.

Palavras-chave: corvina, ingredientes alternativos, subprodutos da indústria, qualidade de proteína

Resumo

Atualmente a aquacultura enfrenta um grande desenvolvimento na área da alimentação e nutrição, sendo o principal impulsionador deste desenvolvimento o preço do principal componente das rações, a proteína, sendo a farinha de peixe a fonte de aminoácidos essenciais e não essenciais mais completa que se conhece, mas tendo a desvantagem de ter elevados custos devido à sobre-exploração. A investigação de novas fontes de proteína torna-se assim, fulcral para um aumento da eficiência e rentabilidade da indústria. A corvina, *Argyrosomus regius*, é uma espécie que apresenta um elevado crescimento, em temperaturas adequadas ao seu perfil térmico, desta forma é uma espécie promissora para produção em larga escala no Mediterrâneo.

O presente estudo avalia a resposta fisiológica do crescimento, dos parâmetros hematológicos e histológicos (fígado e intestino) da corvina quando alimentada com duas dietas diferentes com proteínas com diferentes qualidades.

As rações utilizadas eram isoenergéticas e isoproteicas (aproximadamente 45% de proteína). As rações continham os mesmos ingredientes e quantidades exceto a farinha de penas e farinha de sangue de porco que estava apenas presente na ração 45PALT. A ração 45P tinha também menos soja 48 que a ração 45PALT.

As dietas foram testadas em triplicados. Um total de 576 corvinas juvenis com um peso médio inicial de $55,5 \pm 6,4$ g, foram distribuídos por 6 tanques com 1 m^3 num sistema contínuo de fluxo de água mantidos durante 12 semanas. Parâmetros de crescimento foram avaliados a cada 4 semanas, tendo sido calculados a taxa de crescimento específico, índice de conversão alimentar, índice de condição, índice hepatossomático e o índice intestinal. Foi também feita a colheita de sangue de 12 peixes por ração para realizar o hematócrito, medição da concentração de hemoglobina e contagem de células. Os peixes após a colheita de sangue foram sacrificados de forma a coletar amostras de fígado e intestino para análise histológica, utilizando colorações de hematoxilina-eosina, coloração de PAS e coloração de Azul de Alciano.

Os resultados obtidos sugerem a influência da qualidade da proteína no índice de conversão alimentar (ICA) ($P < 0,05$) e acumulação dos lípidos no fígado ($P < 0,05$), sendo o resultado do ICA já esperado, demonstrando a melhor qualidade de proteína utilizada na ração 45P, mas sendo o resultado da acumulação de lípidos contrário ao esperado,

tendo em conta que o tratamento com melhor qualidade de proteína (45P) foi aquele em que foi observado maior acumulação de lípidos no fígado. A substituição da proteína de melhor qualidade com as farinhas de penas e de sangue de porco foi um sucesso, uma vez que não afetou o crescimento, os parâmetros hematológicos e a morfologia do intestino.

Estudos futuros, utilizando biomarcadores, poderão permitir verificar a condição ao nível celular do intestino e verificar alterações no sangue.

Índice

1. Introdução	- 1 -
1.1 Estado atual da aquicultura.....	- 1 -
1.2 Corvina (<i>Argyrosomus regius</i> , Asso, 1801)	- 3 -
1.3 Produção de corvina	- 3 -
1.4 Alimentação e Nutrição em aquicultura	- 4 -
1.4.1 Matérias primas alternativas na formulação de dietas para corvinas	- 5 -
1.5 Condição animal.....	- 7 -
1.5.1 Sistema Gastrointestinal	- 7 -
1.5.1.1 Fígado.....	- 7 -
1.5.1.2 Intestino.....	- 8 -
1.5.2 Parâmetros sanguíneos	- 9 -
2. Objetivos do estudo.....	- 10 -
3. Material e Métodos	- 11 -
3.1 Condições de cultivo	- 11 -
3.1.1 Material biológico e sistema de cultivo.....	- 11 -
3.1.2 Desenho experimental	- 11 -
3.2 Amostragem	- 12 -
3.3 Métodos analíticos	- 13 -
3.3.1 Parâmetros biométricos	- 13 -
3.3.2 Parâmetros hematológicos.....	- 14 -
3.3.3 Histologia	- 16 -
3.4 Análise Estatística	- 17 -
4. Resultados	- 17 -
4.1 Crescimento e índices de condição	- 17 -
4.2 Parâmetros hematológicos.....	- 23 -
4.3 Parâmetros Histológicos.....	- 26 -
5. Discussão.....	- 28 -
5.1 Crescimento e índices de condição	- 29 -
5.2 Parâmetros Hematológicos.....	- 30 -
5.3 Parâmetros Histológicos.....	- 31 -
5.4 Conclusões	- 32 -
6. Referências Bibliográficas	- 33 -

1. Introdução

1.1 Estado atual da aquacultura

A aquacultura mundial em 2014 produziu cerca de 73 milhões de toneladas de pescado (peixe, crustáceos, e outros animais aquáticos como anfíbios), representando 44,1% da produção mundial de pescado (pescas e aquacultura), com um valor estimado de mercado de 160,2 mil milhões de dólares americanos. Cerca de 35 países, dos quais fazem parte China, Índia, Vietnam, Bangladesh e Egito (cinco dos maiores produtores em aquacultura), produzem mais peixes em aquacultura do que capturam peixes selvagens através da pesca. Estima-se que em 2014 foram produzidas cerca de 580 espécies em aquacultura, sendo cerca de 362 espécies de peixes teleósteos, 104 espécies de moluscos, 62 de crustáceos, 6 rãs e répteis, 9 invertebrados aquáticos e 37 plantas marinhas (FAO, 2016).

A produção mundial em aquacultura tem vindo a aumentar desde 1985 até 2014 (Fig. 1.1), verificando-se um aumento exponencial de produção no continente asiático, tendo este apresentado em 2014 uma produção *per capita* igual à soma das produções do continente. Entre 1961 e 2013 verificou-se um aumento na produção em aquacultura ao nível mundial representando um acréscimo de 3,2% anual de peixe disponível para consumo humano, contrariando a estagnação das pescas. Dados de 1960 até 2013 apontam para um crescimento no consumo mundial de pescado de 9,9 kg *per capita* em 1960 para 14,4 kg em 1990 e 19,7 kg em 2013, com previsões para 2015 de 20 kg *per capita* de consumo de pescado. Este aumento pode ser explicado não só pelo aumento de produção, mas também pelo desenvolvimento das cadeias de distribuição (ligações internacionais), aumento da população mundial e pelo desenvolvimento de países não industrializados, que permitiu um aumento do nível de vida da população e criou condições que alteraram os hábitos de consumo, colocando o pescado num lugar de mais destaque na alimentação (FAO, 2016).

Ao nível da União Europeia em 2012 houve um aumento de 3,4% da produção em aquacultura face ao ano anterior, estando 71% concentrada em quatro países: Espanha, Reino Unido, França e Grécia. As principais espécies produzidas são o salmão atlântico, ostras, dourada, robalo, truta e os mexilhões mediterrânicos (STECF, 2014).

Ao nível da União Europeia, Portugal é um dos países com maior consumo *per capita*, estando ao nível da Noruega (Fig. 1.2). Tendo em conta estes dados, é importante satisfazer as necessidades de consumo, e dada a estagnação do volume de pescado obtido

através das pescas, a alternativa é o aumento da produção de peixe em aquacultura ou procura de espécies com crescimento mais rápido.

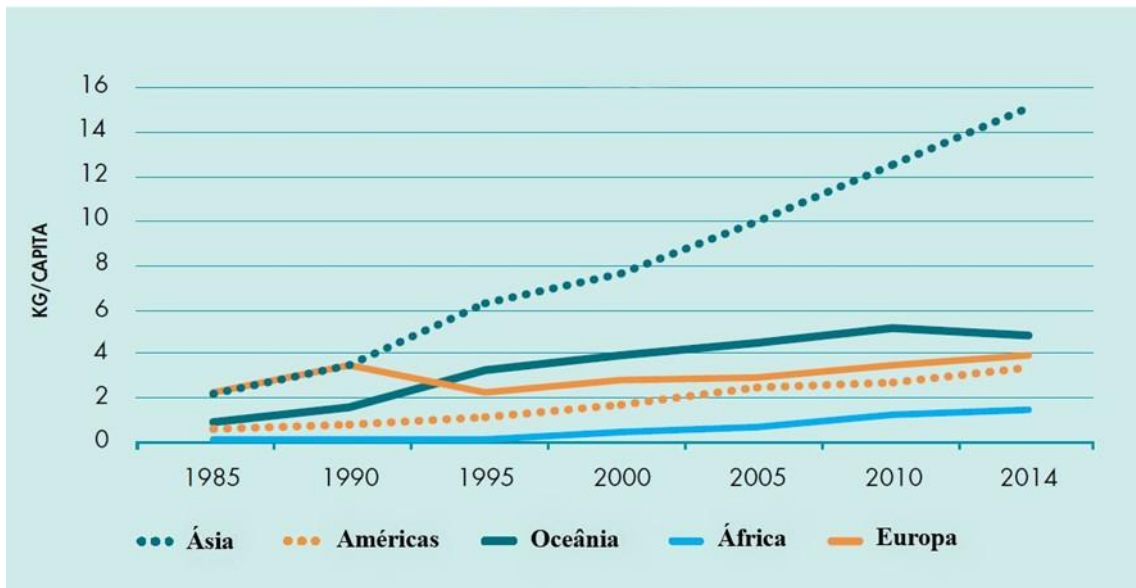


Figura 1.1 Produção Mundial *per capita* em aquacultura (adaptado de FAO, 2016)

De forma a satisfazer as necessidades de consumo é importante aumentar a produção de pescado em aquacultura, tanto na vertente de aumento de produção como na procura de espécies de crescimento mais rápido, dada a estagnação do volume nas pescas.

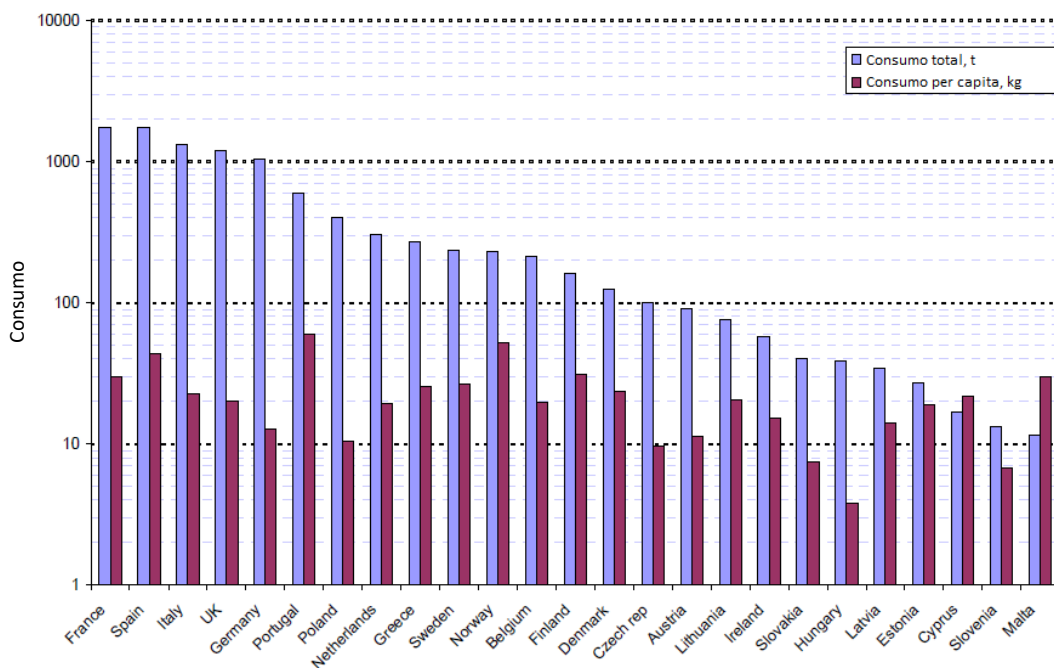


Figura 1.2 Consumo de pescado *per capita* na União Europeia e Noruega (adaptado de Bostock et al., 2008)

1.2 Corvina (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801)

A corvina (*Argyrosomus regius*) pertence à família Sciaenidae, é um anádromo semi-pelágico que pode atingir os dois metros de comprimento e pesar 50kg. Esta espécie ocorre em águas pouco profundas junto às regiões continentais, podendo como outras espécies desta família, entrarem nos estuários. Algumas destas espécies são capazes de produzir sons usando a bexiga gasosa como câmara de ressonância. Esta espécie está distribuída largamente por todo o mar Mediterrânico sendo os maiores exemplares encontrados ao largo da costa da sub-região África Ocidental. O seu crescimento acontece principalmente no verão (pico de crescimento em temperaturas entre os 17 e 21°C) e a sua atividade alimentar reduz drasticamente em temperaturas abaixo dos 15°C (FAO, 2005).

Sendo uma espécie anádroma, os adultos durante a época de reprodução (finais de maio) entram nos estuários para desovar, e entre junho e julho saem dos estuários, mantendo-se na zona costeira para se alimentar (até ao início do outono), regressando para águas mais profundas quando se inicia o inverno. O encontro de juvenis a sair do estuário e os adultos a entrar no mesmo dá-se entre maio e outubro quando a água está entre os 13 e 14°C (FAO, 2005).

1.3 Produção de corvina

A produção de corvina começou em França e Itália nos anos 90, sendo atualmente uma das espécies mais promissoras para produção em larga escala na Europa. O ciclo de produção em aquacultura da corvina já é totalmente descrito (Fig. 1.3). Esta espécie em termos de mercado é bastante atrativa devido à forma do peixe, aos bons níveis nutricionais, sendo considerado um peixe magro (baixo conteúdo lipídico), com bom sabor e textura firme que permite vários tipos de confeção (Giogios et al 2013 e Couto et al 2016). As técnicas de produção de corvina são idênticas a outras espécies como a dourada e o robalo, sendo utilizados tanques de terra com um metro de profundidade e revestidos com uma capa de PVC de forma a evitar a abrasão da pele (FAO, 2005-2016). Os tanques podem ser circulares ou retangulares e contêm densidades de 50 peixes por m³ com cerca de 100g, que nestas condições atingem as 800-1200 g em 24 meses. Podem ainda ser produzidas em jaulas “offshore” em densidades menores (cerca de 10-15 peixes por m³) (FAO, 2005 e 2016).

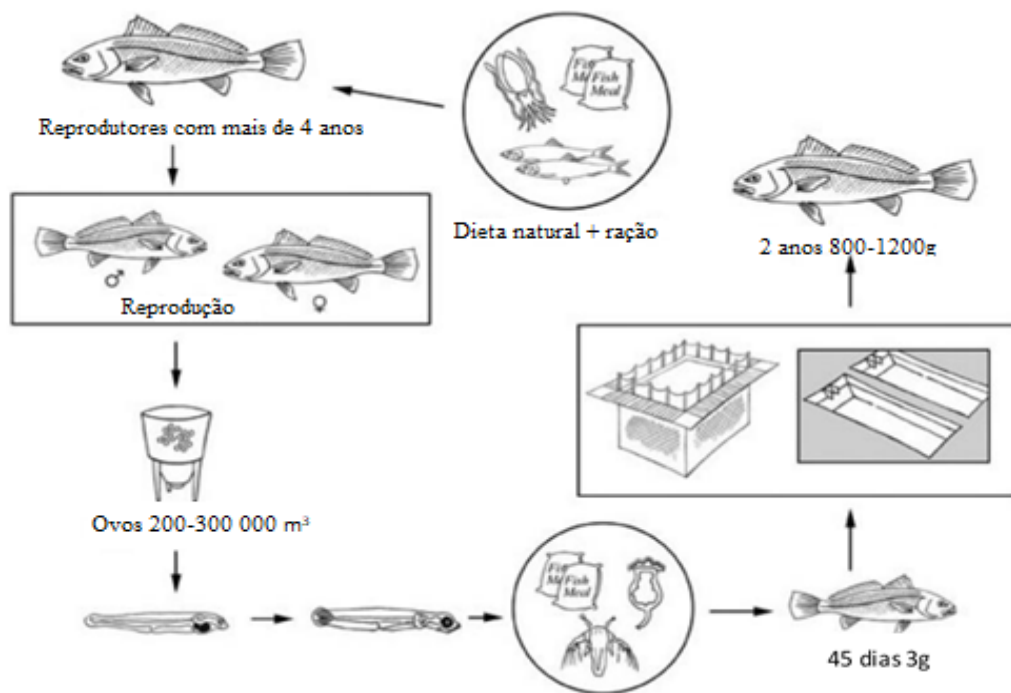


Figura 1.3 Ciclo de produção de corvina (*Argyrosomus regius*) em aquicultura (FAO, 2005 e 2016)

1.4 Alimentação e Nutrição em aquicultura

A alimentação fornece a matéria-prima para a manutenção da vida. Os nutrientes fornecidos na alimentação são usados para a formação de tecidos e para produção de energia (atividade metabólica) por anabolismo e catabolismo, respetivamente. Os hidratos de carbono, lípidos e proteínas são classificados como energéticos e de crescimento e, os minerais, vitaminas, água e oxigénio como nutrientes não energéticos (Pillay, 2005). A digestão envolve a conversão dos nutrientes energéticos, que ocorrem na natureza como macromoléculas, para moléculas com menor tamanho capazes de serem absorvidas pelas membranas do trato gastrointestinal, transportadas para o sangue e posteriormente distribuídas por todas as células do organismo (Pillay, 2005). Esta conversão é feita através da atividade enzimática, convertendo proteínas em aminoácidos ou péptidos com poucos aminoácidos, os hidratos de carbono em açúcares simples e os lípidos em glicerol e ácidos gordos (Pillay, 2005).

A investigação na formulação das rações é uma das áreas mais importantes na aquicultura, sendo fundamental para o aumento da digestibilidade e consequente aumento do índice de conversão alimentar. O valor nutricional dos alimentos é medido através da presença de nutrientes energéticos e não energéticos, sendo determinado também pela capacidade de digestão e absorção do animal, que está dependente do estado físico das rações e, do tipo e da quantidade de enzimas no trato digestivo (Pillay, 2005).

As proteínas são a principal fonte de azoto e aminoácidos essenciais, correspondendo a 50% da alimentação de peixes carnívoros. A proteína tem um valor nutricional nos peixes de 4,5 kcal/g sendo as necessidades nutricionais larvares e dos juvenis superiores, diminuindo ao longo do desenvolvimento. Os requerimentos proteicos são influenciados por diversos fatores nomeadamente a temperatura da água, tamanho corporal, densidade populacional e níveis de oxigénio dissolvido. Os aminoácidos indispensáveis para os peixes são a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, trionina, triptofano e valina. A qualidade de proteína pode então ser avaliada de acordo com o perfil de aminoácidos da fonte proteica (Glencross, 2016).

Os ingredientes usados como fontes de proteína ou de óleos podem ter origem animal ou origem vegetal, havendo vários com potencial para uso nas rações em aquacultura, sendo que para conseguir uma boa otimização destes recursos é necessário perceber a composição química dos ingredientes de modo a compreender os possíveis impactos em cada espécie (Glencross, 2016).

O desenvolvimento de técnicas que aperfeiçoem a capacidade de absorção de óleos e o aparecimento de técnicas de gelatinização contribuem para um aumento da eficiência das rações e consequente diminuição dos custos operacionais de uma aquacultura (Meyers, 1994).

1.4.1 Matérias primas alternativas na formulação de dietas para corvinas

Um dos principais ingredientes das rações para peixe em aquacultura são farinhas de peixe, sendo a fonte mais completa de aminoácidos essenciais e não essenciais que se conhece. Durante o crescimento da aquacultura durante os anos 90 e até inícios do século XXI o uso de farinha de peixe aumentou significativamente, tendo desviado este ingrediente de rações para produção de suínos e aves (FAO, 2016). Dados atuais indicam que a produção de óleo e farinha de peixe irá permanecer constante, não se prevendo qualquer alteração significativa (FAO, 2016). Isto levou à especulação que o crescimento constante da aquacultura ao longo dos anos fosse invertido, devido à falta da mesma e consequente aumento do preço. Apesar disto, atualmente não se prevê que serão fatores limitantes para o crescimento da aquacultura, tendo em conta que a tendência é reduzir a inclusão de ingredientes marinhos (óleo e farinha de peixe) nas dietas dos peixes produzidos em aquacultura (FAO, 2016). Sendo estes cada vez mais reservados apenas para estados críticos do ciclo de vida do peixe, nomeadamente para reprodutores e em

fases larvares, de forma a garantir uma performance ótima e diminuindo o custo de produção (Jackson, 2012).

A investigação da nutrição em aquacultura é focada principalmente na utilização de ingredientes alternativos como produtos vegetais (farinha de soja) e subprodutos da indústria pecuária e suinicultura (farinha de penas e farinha de sangue de porco, respetivamente) de forma a formular rações viáveis sendo apontado como essencial para o futuro da aquacultura, apresentando uma melhor relação custo/benefício (em novembro de 2016 o rácio de preço entre a farinha de peixe e a farinha de soja era de 4,7 para 1) (Pillay, 2005; Gatlin et al., 2007; FAO, 2016; FAO/GLOBEFISH, 2016).

A utilização de rações com ingredientes alternativos de forma a substituir a farinha de peixe e óleo de peixe é considerada viável em várias espécies, conseguindo obter resultados idênticos de crescimento, tal como descreve Bonaldo et al. (2006) em linguado egípcio (*Solea aegyptiaca*). A fraca digestibilidade e o fraco perfil de aminoácidos da farinha de penas e da farinha de sangue de porco podem induzir alterações fisiológicas nos peixes. Como observado em estudos anteriores a utilização de proteínas com menor qualidade que a farinha de peixe pode provocar alterações na estrutura do epitélio intestinal (ex: aumento da deposição de lípidos na *lamina propria* do intestino anterior, alteração acentuada no metabolismo de lípidos e síntese de lipoproteínas), sendo deste exemplo a utilização de ingredientes vegetais em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Torrecilhas et al., 2016).

A corvina criada em condições de temperatura adequadas para a mesma, apresenta um elevado crescimento e uma boa taxa de conversão de ração sendo considerada uma espécie promissora para a produção em larga escala no Mediterrâneo (Ribeiro et al., 2013). É descrita como uma espécie com hábitos carnívoros, sendo que estudos recentes demonstram que os juvenis de corvina necessitam de uma dieta rica em proteína (50%), não requerendo níveis elevados de lípidos (17%) (Chatzifotis et al., 2010; Chatzifotis et al., 2012). Estudos de substituição de 50% da fonte proteica e lipídica por proteínas de plantas e óleos vegetais na ração, demonstram que o crescimento da corvina não é afetado existindo inclusive um aumento significativo de eficiência alimentar da retenção de proteínas e lípidos (Ribeiro et al., 2015). Adicionalmente, a morfologia intestinal, atividade enzimática gastrointestinal e os indicadores de stress hematológicos também não são afetados por esta substituição (Ribeiro et al., 2015). Estévez et al. (2011) verificou que é possível substituir o conteúdo proteico animal por vegetal das rações até 76,2%, sem afetar o crescimento ou o índice de conversão alimentar, sendo que acima destes

valores será necessário suplementar com pelo menos 5% de hidrolisado de proteína de peixe. Para além dos efeitos nos parâmetros biométricos, histológicos e hematológicos também na qualidade organoléptica não se verificam alterações (Francesco et al., 2007).

1.5 Condição animal

Vários trabalhos que têm descrito alterações na condição dos peixes marinhos alimentados com dietas com inclusão de ingredientes não marinhos, apesar de não terem sido observados decréscimos significativos no crescimento, podem provocar inflamação no intestino (enterite), aumento da produção de muco e alterações no microbiota do intestino posterior, deposição de lípidos no fígado e consequente aumento dos hepatócitos (Robaina et al, 1997; Abdel-Warith et al., 2001; Hedrera et al., 2013; Torrecilhas et al., 2016). É assim, importante avaliar a performance de crescimento, mas também a performance global, ou seja, a condição animal e fisiológica. Para avaliar a condição animal é necessário avaliar parâmetros fisiológicos (alterações na morfologia do intestino e/ou fígado) e hematológicos para além da performance de crescimento.

1.5.1 Sistema Gastrointestinal

O sistema gastrointestinal é uma estrutura complexa formada por diversos órgãos, pelo epitélio gastrointestinal, microbiota residente e células do sistema imunológico, sendo a presença destes componentes imprescindível para o normal funcionamento deste sistema. O epitélio gastrointestinal funciona como uma barreira física e química protegendo de organismos patogénicos e da proliferação descontrolada do microbiota residente (Kagnoff e Eckman, 1997; Bevins et al., 1999). A conservação da integridade destes componentes contribui para a manutenção das condições internas favoráveis à atividade de ambos, ajudando a manter a homeostasia do sistema gastrointestinal (Kagnoff e Eckman, 1997).

O sistema gastrointestinal de peixes carnívoros é composto por boca, faringe, esófago, estômago, cecos pilóricos, intestino e glândulas anexas como fígado e pâncreas (Merrifield e Ringø, 2014). Tendo em conta estudos anteriores os órgãos mais afetados aquando de alterações alimentares são o intestino e o fígado (Ribeiro et al., 2015; Merrifield e Ringø, 2014).

1.5.1.1 Fígado

O fígado é um órgão muito importante na digestão (produção de bilis), na reprodução (vitelogenese), armazenamento de lípidos, hidratos de carbono, vitamina A e

ferro, na defesa imunitária, na desintoxicação e no catabolismo de azoto (Munshi e Dutta, 1996). É também, um órgão suscetível a variações de parâmetros ambientais e biológicos, como as biotoxinas, poluentes, agentes patogénicos, qualidade e quantidade de comida e parâmetros físico-químicos (Munshi e Dutta, 1996). Fatores ambientais naturais, como as biotoxinas e xenobióticos de origem humana atuam no fígado induzindo alterações ao nível metabólico e estrutural do órgão, estas alterações poderão provocar a intoxicação do organismo, podendo causar doença ou levar à morte (Munshi e Dutta, 1996). Estas alterações permitem que este órgão seja considerado um bom indicador para avaliar a condição do indivíduo.

O fígado nos peixes pode estar dividido em 3 lóbulos na maioria dos peixes ou não estar dividido como foi observado em *Oncorhynchus mykiss*, *Liza spp.*, e *Lutjanus bohar* (Robertson and Wexler, 1960; Biagianti-Risbourg, 1991). Este órgão, está localizado na cavidade abdominal sendo o tamanho e forma adaptados ao espaço não ocupados por outros órgãos. Apresenta uma cor avermelhada devido a uma vascularização vasta, podendo apresentar uma cor amarelada em níveis elevados de deposição de gordura (Munshi e Dutta, 1996).

O fígado é composto por hepatócitos que apresentam grande variação interespecífica, têm um diâmetro médio de 20 μm , com núcleo redondo ou oval localizado na periferia da célula e um hialoplasma que inclui uma quantidade variável de produtos e reserva, como o glicogénio ou lípidos (Munshi e Dutta, 1996).

1.5.1.2 Intestino

O intestino tem como principal função a decomposição dos nutrientes em moléculas simples através de enzimas hidrolíticas, de forma a serem absorvidas e utilizadas no metabolismo (Ribeiro et al., 2015). Pode ser separado em duas regiões (anterior e posterior), mas a delimitação entre ambas não é tão distinta como em outros vertebrados. Em algumas espécies a região anterior pode ser diferenciada tendo em conta que o seu diâmetro pode ser maior (comparando com a região posterior), pela presença de válvula espiral, em peixes cartilagosos, pela presença de cecos pilóricos e/ou grandes densidades de células glandulares no epitélio (Buddington, 1997). Quanto maior a área de superfície, maior a área exposta ao conteúdo do lúmen do intestino e, consequentemente maior área de absorção. A organização celular da mucosa intestinal também é um mecanismo de incremento da superfície de absorção tendo

microvilosidades alinhados na membrana apical dos enterocitos que ampliam a mesma, sendo a dimensão dos mesmos dependente da dieta e das condições ambientais (Buddington, 1997). A estrutura intestinal pode variar muito, mesmo em espécies com os mesmos hábitos alimentares. Por exemplo nos peixes carnívoros, a necessidade proteica varia entre espécies, mas têm em comum uma dieta baixa em hidratos de carbono, sendo os mecanismos de digestão parecidos, tendo uma grande atividade de protéases e uma taxa elevada de transporte de aminoácidos, mas a fraca capacidade de absorção de hidratos de carbono (Nonnote et al., 1995). Os peixes carnívoros aparentemente perderam ou nunca desenvolveram capacidades de adaptação a alterações na composição da dieta ao longo da sua evolução, conseqüentemente a possibilidade de utilizar rações com maior quantidade de hidratos de carbono e fontes proteicas de menor qualidade é limitada. (Nonnote et al., 1995; Buddington, 1997; Torrecilhas et al., 2016).

1.5.2 Parâmetros sanguíneos

O sistema circulatório nos vertebrados permite o transporte de nutrientes (metabolismo) e trocas gasosas, sendo os seus constituintes um indicador fundamental e sensível para monitorizar alterações ao nível fisiológico e patológico (Ribeiro et al., 2015). Em peixes, estas alterações poderão ocorrer tanto por fatores internos como externos, como técnicas laboratoriais de extração e análise dos parâmetros sanguíneos, variações sazonais, doenças e stress (Fazio et al., 2012). Foram observadas situações de deficiência de nutrientes, malnutrição ou anemia que afetam diretamente os parâmetros hematológicos nomeadamente os eritrócitos. Por exemplo, a deficiência de ácido fólico afeta a formação de eritrócitos reduzindo a contagem dos mesmos, tendo sido observado que esta alteração não afeta os valores do hematócrito pois os eritrócitos nestas condições aumentam de volume (Sonia et al., 2007). A presença de um agente patogénico pode diminuir significativamente os valores do hematócrito e aumentar significativamente a presença de linfócitos sugerindo possíveis infeções (Ribeiro et al., 2015; Sonia et al., 2007).

Todos os peixes possuem dois tipos principais de células sanguíneas: eritrócitos e leucócitos. Na maioria dos peixes teleósteos, o hematócrito varia entre 20 e 40%, apresentando os eritrócitos um comprimento entre 8 e 15µm, com forma oval e núcleo compactado (Fänge, 1992). Relativamente aos leucócitos a maioria dos peixes possui grandes quantidades destes, em tecidos linfoides específicos, em órgãos, infiltrados na pele, membranas mucosas e tecido conjuntivo (Fänge, 1984 e 1987). O sangue dos peixes

é extraordinariamente rico em leucócitos, sendo que em peixes teleósteos a sua concentração varia entre 15 e 135×10^3 cél/ μL (Kisch, 1951). Os leucócitos podem ser divididos em quatro grandes tipos celulares: granulócitos, linfócitos, monócitos e trombócitos. Em peixes teleósteos os granulócitos constituem entre 4,5% e 18% dos leucócitos no sangue podendo ser divididos em três categorias, neutrófilos, eosinófilos e basófilos (Hines e Spira, 1973). Os neutrófilos apresentam numerosos grânulos no citoplasma que coram de rosa, vermelho, ou violeta em esfregaços (Roubal, 1986). Os eosinófilos contêm grânulos citoplasmáticos que coram através de corantes ácidos, sendo escassos ou mesmo inexistentes em circulação, estando normalmente presentes em tecidos ou na cavidade peritoneal, tendo uma função imunológica contra bactérias (Jordan e Speidel, 1924). Os basófilos apresentam grânulos que coram através de corantes básico sendo o seu número escasso na corrente sanguínea (Fänge, 1992). Os linfócitos apresentam um citoplasma sem grânulos que cora de azul em esfregaços sanguíneos, apresentando um comprimento entre 4,5 e 8,2 μm constituindo entre 50 a 80% dos leucócitos (Ellis, 1977). Os monócitos são células fagocitárias móveis, sendo normalmente maiores que os outros leucócitos, constituindo uma pequena fração dos leucócitos sanguíneos dos peixes podendo mesmo estar ausentes em algumas espécies (Fänge, 1992). Os trombócitos são semelhantes a eritrócitos sem hemoglobina (despigmentados), apresentando um citoplasma sem grânulos que cora de azul acinzentado, sendo difíceis de distinguir linfócitos através de microscopia ótica, podendo constituir entre 0 e 7% dos leucócitos (Boyar, 1962).

2. Objetivos do estudo

Avaliar o efeito de ingredientes alternativos à farinha de peixe na condição fisiológica da corvina, monitorizando o crescimento e índices de condição.

Estudar o efeito dos ingredientes alternativos na condição de juvenis de corvina, através da análise de parâmetros hematológicos e alterações da estrutura do fígado e do intestino de forma a tentar estabelecer uma relação entre os parâmetros hematológicos e lesões nos tecidos. Comparar os resultados da análise de sangue, fígado e trato digestivo e verificar a existência de alguma relação entre ambos, de forma a verificar a fiabilidade da utilização destes ingredientes alternativos na alimentação da corvina.

3. Material e Métodos

3.1 Condições de cultivo

O ensaio realizou-se na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) entre outubro de 2016 e janeiro de 2017. A experiência foi conduzida de acordo com as diretrizes europeias para a proteção dos animais usados em ensaios científicos (Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia).

3.1.1 Material biológico e sistema de cultivo

Foram utilizados 6 grupos de 96 juvenis de corvina com um peso inicial de $55,5 \pm 6,4$ g, pertencentes a um lote produzido na EPPO, sendo distribuídos por 6 tanques circulares de fibra de vidro de 1 m^3 . O caudal utilizado em todos os tanques foi de 12 L/1 min, resultando numa taxa de renovação de aproximadamente 50% por hora. A temperatura da água e o oxigénio foram registados automaticamente; a temperatura da água manteve-se nos $24 \pm 1,2$ °C, enquanto o oxigénio manteve-se nos $7,0 \pm 3,5$ mg/L. Os tanques estavam equipados com um sensor de oxigénio, o qual ativava a injeção de oxigénio caso os valores de oxigénio dissolvido atingissem os 4,2 mg/L. Ao longo do ensaio foram recolhidas amostras de água de duas em duas semanas, para analisar a quantidade máxima de amónia presente nos tanques. Por último, a limpeza dos tanques foi efetuada uma vez por dia, realizando-se duas purgas, uma de manhã e uma ao final do dia.

As corvinas foram alimentadas “*ad libitum*” três vezes por dia: às 9h, às 12h e às 16h. De forma a aferir a ração consumida, foi registada a quantidade de ração em excesso no fundo do tanque após o período da refeição (1h) diariamente durante uma semana, todos os meses do período experimental.

3.1.2 Desenho experimental

Foram utilizadas duas rações experimentais para a alimentação das corvinas, produzidas pela SPAROS, a ração 45P e a 45PALT. As rações eram isoenergéticas e isoproteicas (aproximadamente 45% de proteína), tendo na sua composição diferentes ingredientes (ambas as rações com ingredientes alternativos à farinha de peixe). Quanto às diferenças entre rações, destaca-se no caso da ração 45P, ingredientes vegetais tratados como o concentrado de proteína de soja, menor concentração de farinha de soja 48 e a presença de glúten de trigo, na ração 45PALT, destaca-se a presença de subprodutos da indústria pecuária e de suinicultura como a farinha de penas e farinha de sangue de suínos,

e maior concentração de farinha de soja 48 (Tabela 3.1). As rações foram atribuídas aleatoriamente a cada tanque.

Tabela 3.1 - Composição (%) das rações 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Ingredientes	45P (%)	45PALT (%)
Farinha de peixe LT Diamante	15.00	15.00
Farinha de peixe 60	10.00	10.00
Farinha de penas	-	5.00
Farinha de sangue de suínos	-	5.00
Farinha de aves 65	7.20	7.20
Concentrado de proteína de soja	14.00	-
Glúten trigo	3.00	-
Glúten de milho	7.00	7.00
Farinha de soja 48	11.50	19.00
Trigo	12.00	12.00
Feijão-fava	6.00	6.00
Óleo de peixe	5.00	5.00
Óleo de colza	6.70	6.00
Vitaminas & Minerais Premix	1.00	1.00
Lecitina de soja	0.50	0.50
MCP	0.20	0.40
L-lisina	0.40	0.40
DL-Metionina	0.50	0.50
Composição Alimentar	45P (%)	45PALT (%)
Proteína	44.48	44.49
Matéria Gorda	16.03	16.02
Fibra	1.22	1.10
Cinza	9.12	9.24
Energia	19.44	19.10
Total de fósforo	1.27	1.24

3.2 Amostragem

O ensaio foi realizado num período de três meses, sendo realizadas seis amostragens: inicial, 1ª semana, 2ª semana, 4ª semana, 8ª semana, 12ª semana (= final).

Em cada amostragem recolheram-se 4 peixes de cada tanque, com o auxílio de um chalavar, sendo de imediato anestesiados por imersão em água com fenoxietanol a uma concentração de 800ppm. Depois de anestesiados, procedeu-se à colheita de sangue pela veia caudal utilizando seringas heparinizadas. De seguida, obtiveram-se dados biométricos (comprimento total e peso de cada peixe), tendo sido sacrificados usando um

bisturi para seccionar a zona cerebral, procedendo-se à dissecação dos peixes de forma a recolher o intestino e fígado para análise histológica.

O cálculo da biomassa para cada tanque foi realizado a cada 4 semanas de ensaio, para se calcular o ganho em biomassa.

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Parâmetros biométricos

De forma a verificar a condição fisiológica dos peixes foram calculados diversos índices biométricos.

A taxa de crescimento específico (TCE) é um indicador do crescimento num determinado período. Podendo ser calculado segundo Ståle et al (1998):

$$TCE (\%/dia) = \frac{100(\ln \text{ peso corporal médio final (g)} - \ln \text{ peso corporal médio inicial (g)})}{N^{\circ} \text{ de dias}}$$

O índice de conversão alimentar (ICA) é utilizado para avaliar a eficiência da ração na sua conversão em peso corporal. Sendo calculado segundo Ribeiro et al (2015):

$$ICA = \frac{\text{total da ração consumida (g)}}{\text{total de peso ganho (g)}}$$

O índice de condição (IC) é um indicador do desenvolvimento fisiológico do individuo, sendo utilizado para verificar o normal desenvolvimento do organismo. Sendo calculado segundo Ribeiro et al (2015):

$$IC = \frac{\text{peso corporal (g)}}{\text{comprimento total (cm)}}$$

O índice hepatossomático (IHS) é utilizado para avaliar a acumulação de lípidos nas células hepáticas, permitindo avaliar o estado fisiológico do organismo. Sendo obtido segundo Ribeiro et al (2015):

$$IHS = \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso corporal (g)}}$$

O índice intestinal ou índice somático intestinal (II) é utilizado para avaliar possíveis variações no peso do estômago e intestino e consequente capacidade de digestão do organismo. Sendo calculado segundo Ribeiro et al (2015):

$$II = \frac{\text{peso do estômago (g)} + \text{peso do intestino (g)}}{\text{peso corporal (g)}}$$

3.3.2 Parâmetros hematológicos

A recolha de sangue foi realizada individualmente para microtubos de 1,5 mL previamente heparinizados, os quais foram mantidos em gelo até à centrifugação.

Para a realização dos esfregaços foram utilizados 5 μ L da amostra de sangue numa lâmina de vidro. Após 12h de secagem ao ar, foi realizado a técnica de coloração de Wright-Giemsa, esta técnica consiste na imersão dos esfregaços (usando um “rack” de coloração) em corante Wright puro durante um minuto, seguida de imersão numa solução de tampão fosfato (pH 6,8-7,2) durante quatro minutos. Finalmente, após secagem ao ar, as amostras foram fixadas com DPX. A observação dos esfregaços foi realizada num microscópio ótico (Nikon Eclipse Ci com ampliação x1000) sendo contados o número de eritrócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) em cinco áreas aleatórias da amostra (figura 3.1 e 3.2).

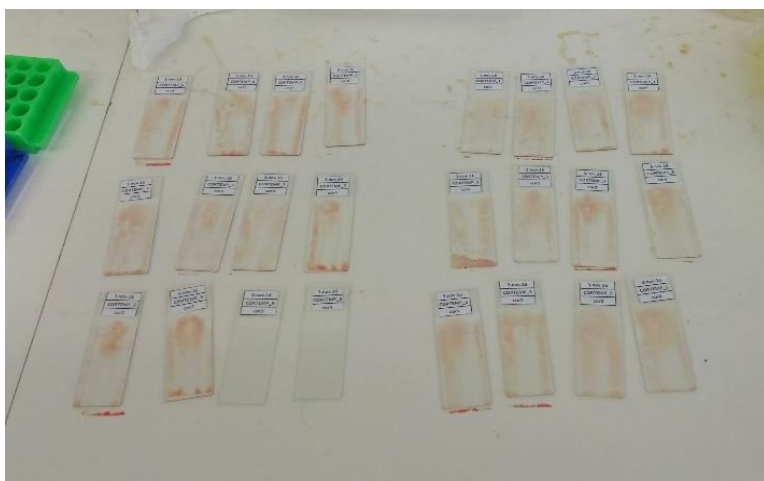


Figura 3.1 Preparação dos esfregaços de sangue de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*)

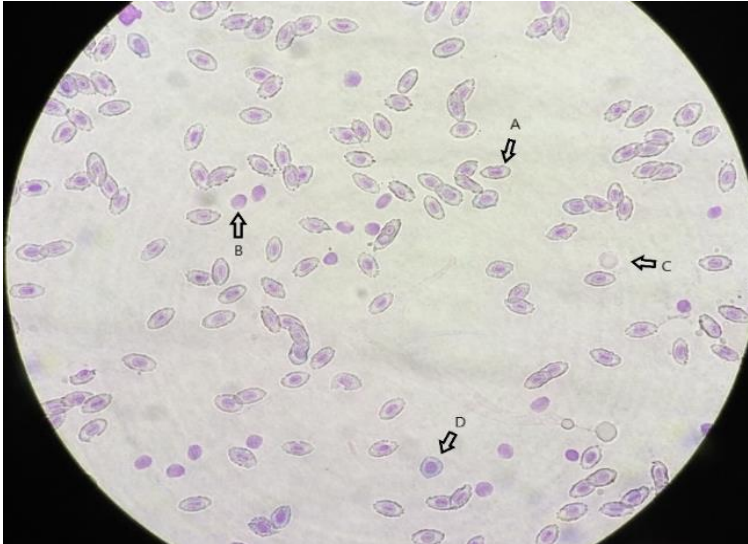


Figura 3.2 Observação de microscopia ótica de uma amostra de esfregaço de sangue de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*). A – Eritrócito; B – Eosinófilo; C – Linfócito; D – Neutrófilo. Ampliação 1000x

Para a contagem de células vermelhas retirou-se 5 μ L de sangue da amostra para os microtubos já preparados com 995 μ L de PBS (fator de diluição de 1:100) para se proceder à contagem de células. Foi utilizado um microscópio ótico (Nikon Eclipse Ci com ampliação x400) e uma câmara de Bürker, tendo sido contados 5 campos de cada amostra.

Foi ainda determinado o hematócrito (Fig.3.3 – A) para cada amostra. Para isso, recolheu-se o sangue de cada amostra com capilares (75 mm Super Rior, Germany). Os quais foram posteriormente centrifugados numa centrifuga de hematócrito (EBA 21 Hettich, Germany) durante 5 min a 10000 rpm (Ribeiro et al, 2015). Após a centrifugação o hematócrito, foi calculado como a razão entre a medida o volume total do sangue no capilar e o volume de células sanguíneas depositadas após a centrifugação multiplicando por 100. Tendo em conta que a percentagem de glóbulos vermelhos é sensivelmente 100% da concentração de células sanguíneas depositadas foi considerado os resultados do hematócrito como a % (v/v) de glóbulos de vermelhos presentes no sangue.

A hemoglobina (Fig. 3.3 – B) foi determinada pelo método de Drabkin (SPINREACT). O princípio deste método consiste na oxidação da hemoglobina pelo ferrocianido de potássio em metahemoglobina, a qual é convertida em cianometahemoglobina, pelo ciano de potássio. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de hemoglobina no sangue. Da amostra inicial de sangue de cada peixe, recolheram-se 20 μ L para tubos de 5 mL. A estes tubos adicionou-se 5 mL da solução de trabalho do reagente de Drabkin, previamente preparada. Utilizaram-se dois

controles: branco - 5 mL da solução de trabalho do reagente Drabkin; standard - 20 μ L de calibrador + 5 mL da solução de trabalho do reagente Drabkin. Após homogeneizar as suspensões, foram incubadas 3 min à temperatura ambiente e, de seguida, foram retirados 300 μ L de cada tubo para um poço. Finalmente foi lida absorvância das amostras e do calibrador contra o branco (Thermo Scientific Multiskan GO).

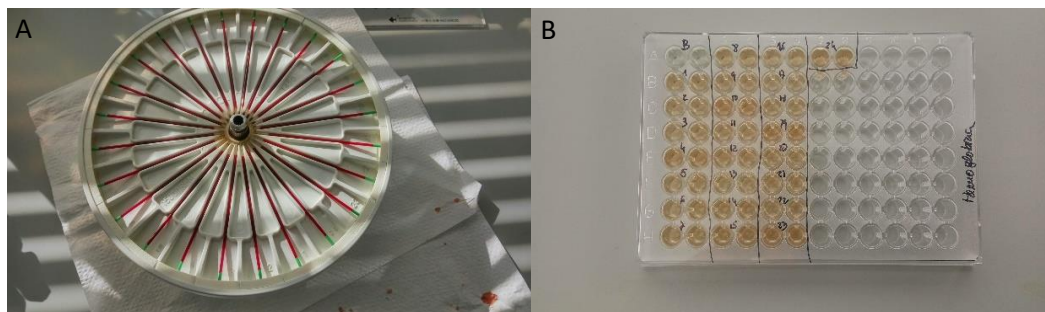


Figura 3.3 Tratamentos das amostras de sangue de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*). A – Hematócrito; B – Hemoglobina.

3.3.3 Histologia

Foram recolhidas amostras de intestino anterior, intestino posterior e fígado. Estas amostras foram fixadas numa solução de formaldeído a 10% (pH 7,2) durante 24h, lavadas com solução PBS (1:100) três vezes durante 15 min (para retirar os resíduos de formaldeído) e armazenadas em álcool a 70%. Posteriormente as amostras foram embebidas em parafina para se obter blocos para cada tecido. Quanto à organização dos blocos, foram formados seis blocos por cada tanque, sendo dois blocos com as amostras de intestino anterior, dois blocos com intestino posterior e dois blocos com as amostras de fígado. Foram realizados cortes histológicos de secções com 7 μ m num micrótomo MicroTec CUT 4000, os quais foram posteriormente corados com as técnicas da Hematoxilina-Eosina para uma observação histológica geral, de PAS (ou reagente de Schiff) e de Azul Alcian pH 2.5 para visualizar estruturas ricas em glicogénio e mucopolissacarídeos (neutro e ácidos), respetivamente (Martoja e Martoja-Pierson, 1970).

De cada bloco foram realizados 4 cortes, perfazendo um total de 72 cortes por tratamento. Os cortes foram analisados num microscópio ótico (Motic BA410) de forma a caracterizar a morfologia celular dos diferentes tecidos, tendo ainda sido quantificados os valores médios do tamanho dos hepatócitos, nas secções do fígado, e do comprimento das pregas intestinais, nas secções do intestino, através da análise de imagem recorrendo ao software Motic Images Plus 2.0 ML (Fig. 3.4).

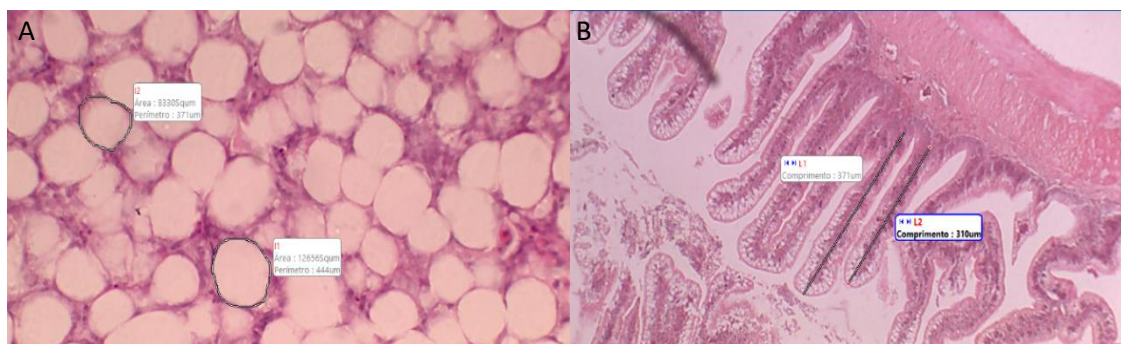


Figura 3.4 – Observação cortes histológicos de porções de fígado e intestino de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*). Medição da área dos hepatócitos (A) e do comprimento das pregas intestinais (B) obtidas através do software Motic Images Plus 2.0 ML. Ampliação 400x.

3.4 Análise Estatística

Os dados de crescimento, índices de condição e parâmetros hematológicos e histológicos foram apresentados como a média dos replicados \pm desvio padrão. Estes dados foram analisados através da Two-away ANOVA, considerando como fatores a qualidade da proteína e o tempo de alimentação. Apesar de terem sido feitas 6 amostragens, para a Two-Way ANOVA apenas se consideraram as amostragens mensais. Os parâmetros expressos em percentagens foram sujeitos a uma transformação arc seno da raiz quadrada. Quando os efeitos dos tratamentos foram significativos ($P < 0,05$) procedeu-se à comparação de médias utilizando o teste de Tuckey. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS (v25, IBM, USA).

4. Resultados

4.1 Crescimento e índices de condição

Ao longo do ensaio morreram 32 peixes no tratamento 45P e 30 peixes no tratamento 45PALT, sendo que todas as mortes foram devido a fuga dos tanques e não ao devido ao tratamento. No ensaio foi observado um aumento de peso em ambos os tratamentos, sendo que o peso médio inicial era de $55,5 \pm 6,4$ g. No tratamento 45P foi observado um incremento percentual em relação ao peso médio inicial de aproximadamente 136,6% na décima segunda semana, atingindo um valor médio de $131,3 \pm 25,7$ g. No tratamento 45PALT foi também observado um aumento do peso médio inicial, sendo que no final das 12 semanas o peso médio atingiu as $107,1 \pm 14,0$ g correspondendo a um aumento de 93,0% em relação ao peso inicial. Tendo em conta estes resultados, a diferença final entre os tratamentos é de 18,4%, no entanto não se observaram diferenças significativas entre tratamentos ($P > 0,05$) (Fig. 4.1).

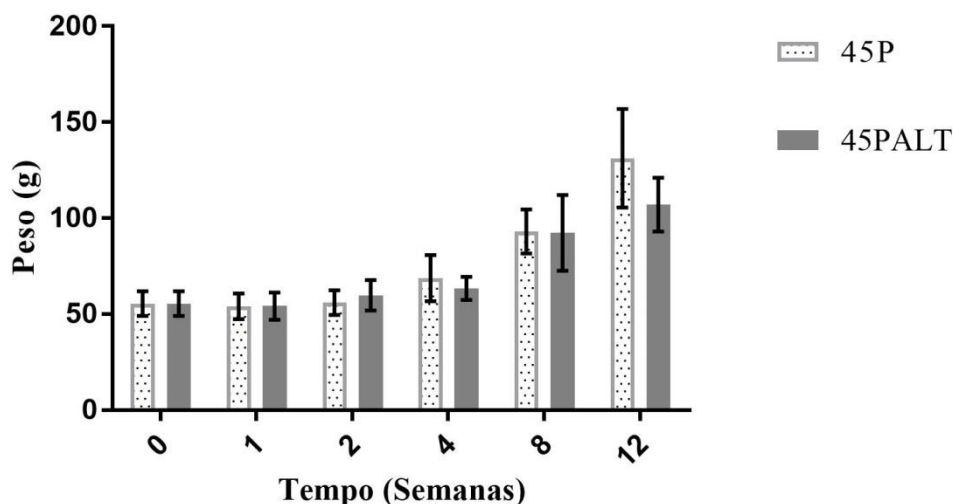


Figura 4.1 - Peso médio observado (g) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Observou-se uma diminuição do comprimento total na amostragem da primeira semana e aumento nas seguintes amostragens em ambos os tratamentos, sendo o comprimento médio inicial de $17,6 \pm 0,6$ cm. No tratamento 45P, o comprimento total médio sofreu um crescimento percentual, tendo atingido 31,4% na décima segunda semana em relação aos valores iniciais, correspondendo a $23,2 \pm 1,5$ cm. No tratamento 45PALT foi também observado um aumento ao longo do ensaio, tendo aumentado 25,8% até à décima segunda semana correspondendo a um comprimento médio de $22,2 \pm 0,8$ cm. A diferença obtida entre os tratamentos no final do ensaio foi de 4,2%, não sendo significativamente diferente ($P > 0,05$) (Fig. 4.2).

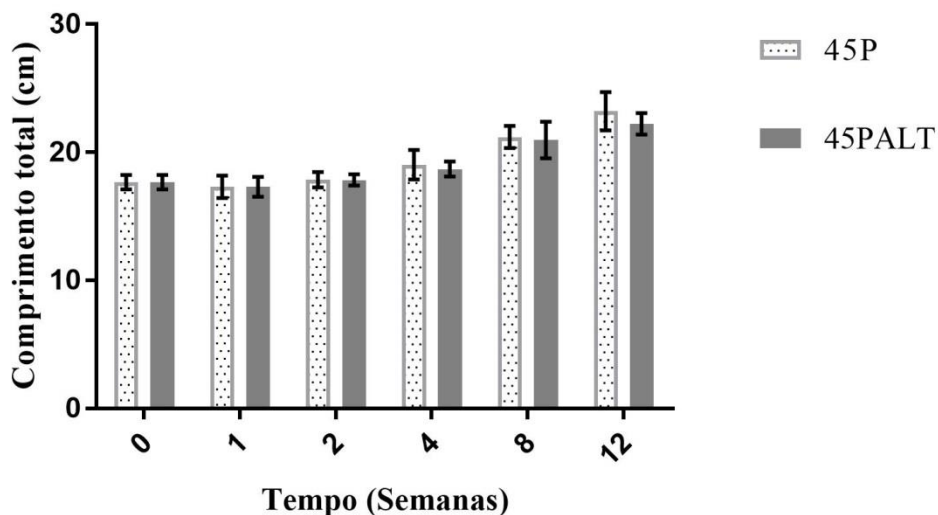


Figura 4.2 - Comprimento total médio observado (cm) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas), alimentados com dietas com o mesmo nível de proteína mas diferentes formulações: 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Para a taxa de crescimento específico (TCE) não se obtiveram resultados significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre tratamentos (Fig. 4.3). No tratamento 45P foi obtido uma taxa de crescimento específico (TCE) média de $0,90 \pm 0,059$ %/dia nas primeiras quatro semanas, de $0,95 \pm 0,10$ %/dia na oitava semana e ao fim de duas semanas $0,89 \pm 0,063$ %/dia. No tratamento 45PALT nas primeiras quatro semanas observou-se uma TCE de $0,083 \pm 0,050$ %/dia, na oitava semana $0,84 \pm 0,056$ %/dia e na décima segunda semana $0,76 \pm 0,031$ %/dia.

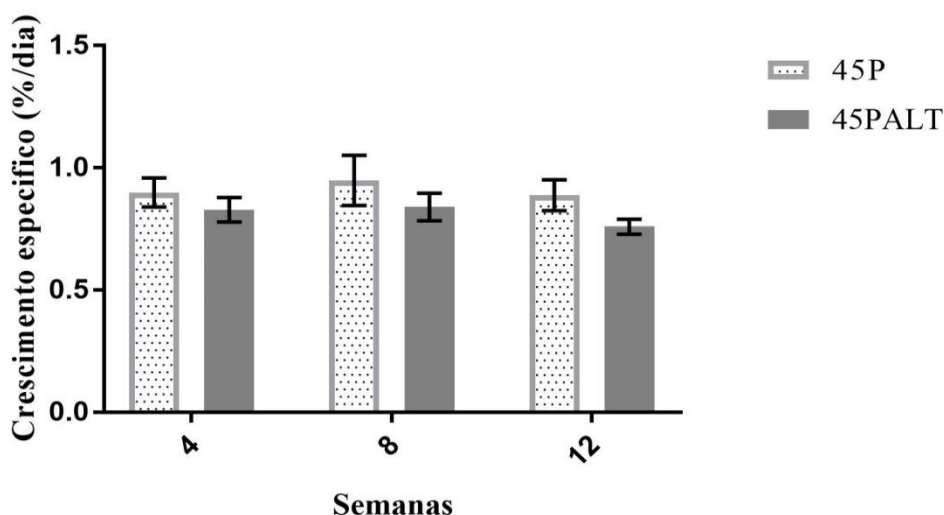


Figura 4.3 Crescimento específico (%/dia) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) ao fim de quatro, oito e doze semanas alimentadas com as rações 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

No índice de conversão alimentar (ICA) observaram-se diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,05$) (Fig. 4.4). No tratamento 45P obteve-se ao fim das primeiras quatro semanas um valor de $1,71 \pm 0,25$, na oitava semana $1,69 \pm 0,09$ e na décima segunda semana um valor e $1,71 \pm 0,09$. Quanto ao tratamento 45PALT foi obtido na quarta semana um ICA de $2,19 \pm 0,23$, na oitava semana de $2,10 \pm 0,28$ e na décima segunda semana $2,35 \pm 0,35$.

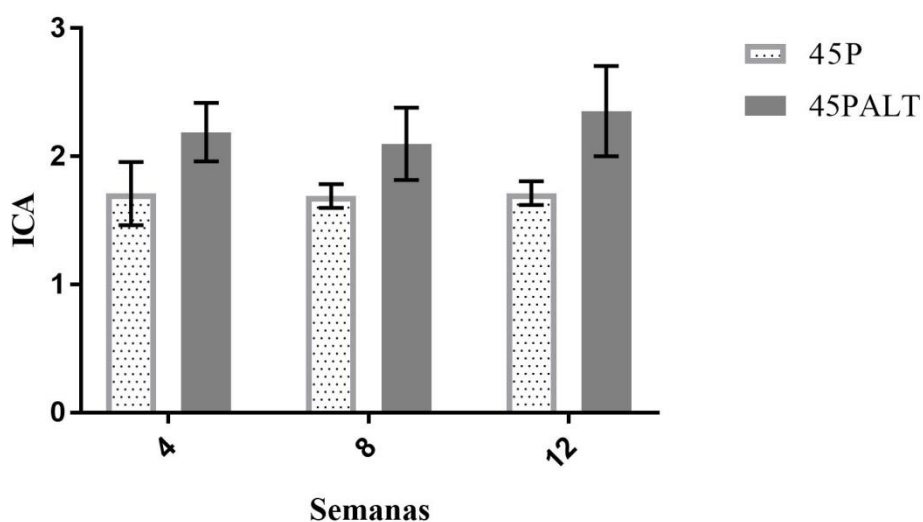


Figura 4.4 Índice de conversão alimentar (ICA) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) ao fim de quatro, oito e doze semanas alimentadas com as rações 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

No índice de condição (IC) observou-se uma variação ligeira em ambos os tratamentos, ao longo do ensaio, sendo o valor médio inicial para o IC de $1,01 \pm 0,08$. Tendo em conta o valor inicial do IC, o tratamento 45P sofreu um aumento de 3,48% ao fim de 12 semanas, correspondendo a $1,04 \pm 0,07$. Verificou-se no tratamento 45PALT uma diminuição de 3,40% ao fim de doze semanas, tendo sido obtido $0,97 \pm 0,07$. A diferença entre tratamentos foi de 6,65%, não sendo significativamente diferente ($P > 0,05$) (Fig. 4.5).

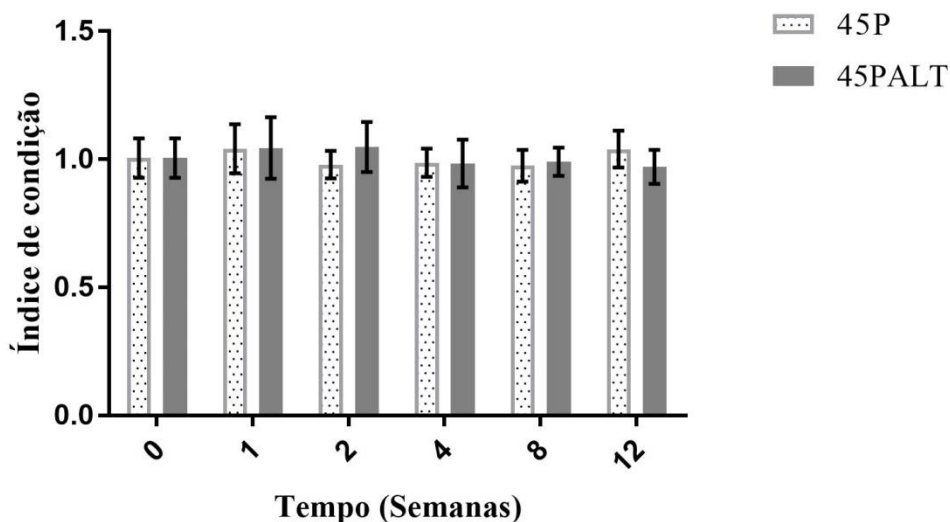


Figura 4.5 - Índice de condição de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Quanto ao índice hepatossomático (IHS), verificou-se um decréscimo ao longo do ensaio em ambos os tratamentos, sendo o valor inicial de $3,34 \pm 1,12$. No tratamento 45P observou-se uma redução percentual ao fim de 12 semanas de 26,65% face ao valor inicial, atingindo $2,45 \pm 0,771$. No tratamento 45PALT houve também uma diminuição do IHS, de 20,01% ao fim das 12 semanas, tendo como valor médio de IHS final de $2,67 \pm 0,0654$. Observou-se assim, uma diferença de 22,00% entre tratamentos, não sendo significativamente diferentes ($P > 0,05$), tendo a interação entre tratamentos e amostragem obtido diferenças significativas ($P < 0,05$) (Fig. 4.6).

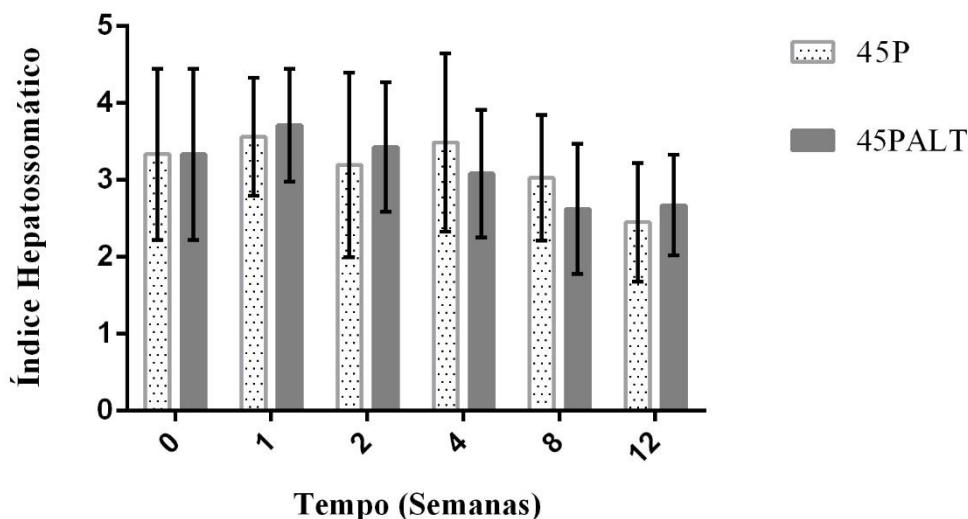


Figura 4.6 - Índice hepatossomático de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Nos valores obtidos para o índice intestinal (II) foi observado uma diminuição em ambos os tratamentos, tendo como valor inicial de II $2,09 \pm 0,161$. No tratamento 45P foi observado uma diminuição de 33,00% ao fim de 12 semanas, correspondendo a $1,76 \pm 0,225$. Sendo igualmente observado, no tratamento 45PALT, uma diminuição de 31% no fim do ensaio, obtendo um valor médio de II de $1,78 \pm 0,001$. Obtendo-se assim uma diferença de 2% entre tratamentos, não sendo significativamente diferentes ($P > 0,05$) (Fig. 4.7).

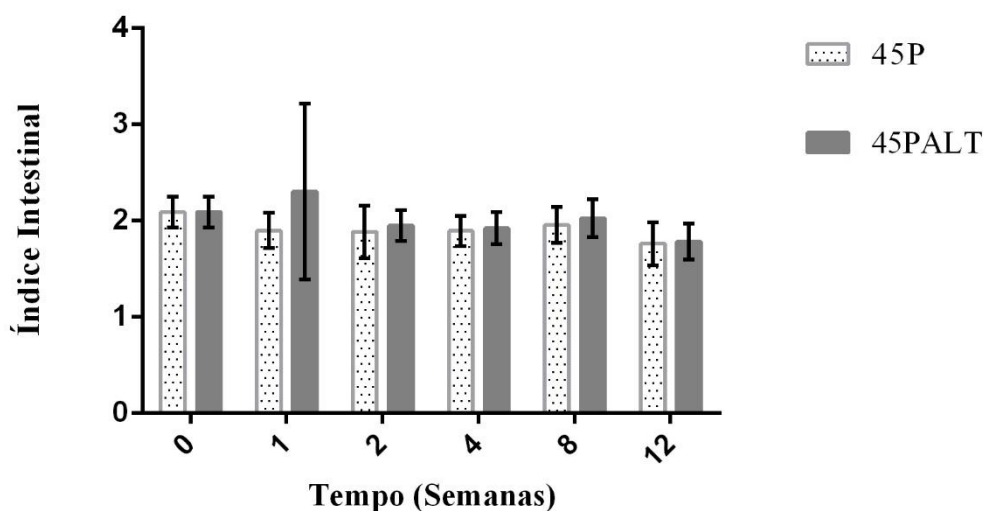


Figura 4.7 - Índice intestinal de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

4.2 Parâmetros hematológicos

Nos resultados obtidos para o hematócrito foi observado uma conservação dos valores ao longo do ensaio, tendo como valor médio inicial $24,8 \pm 4,0\%$ de eritrócitos (Fig. 4.8). Verificou-se um aumento percentual de eritrócitos no tratamento 45P de 4,6% na última amostragem, correspondendo a um valor de 26,0% de eritrócitos. No tratamento 45PALT foi observado uma variação dos valores ao longo do ensaio, tendo tido um incremento de 7,6% na amostragem final, obtendo um valor médio de 26,7% eritrócitos, tendo-se obtido uma diferença de 3% no final do ensaio entre tratamentos, não sendo diferentes significativamente ($P > 0,05$).

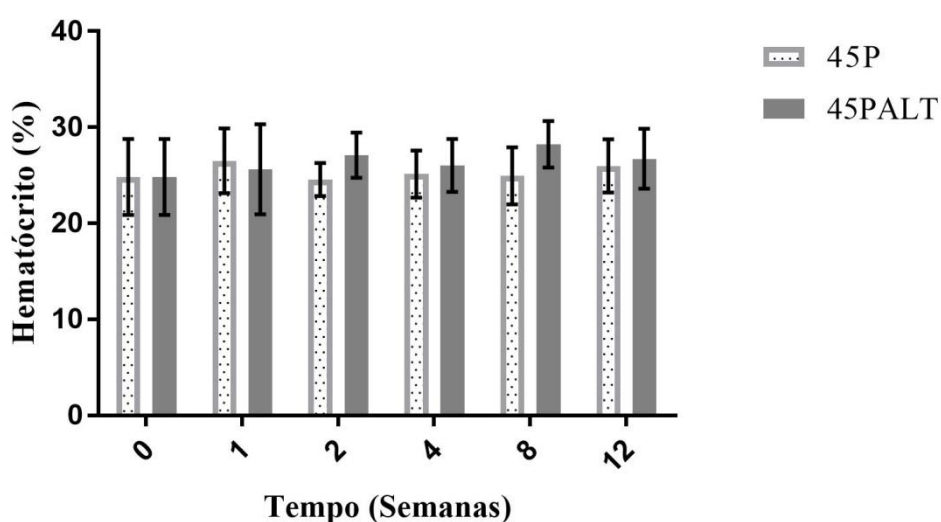


Figura 4.8 - Hematócrito (%) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio ($t=0$) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Na contagem de células vermelhas na câmara de Bürker obteve-se um valor médio inicial de $1,34 \pm 0,44 \times 10^6$ cel/ μ L por peixe (Fig. 4.9). Observou-se $1,32 \pm 0,35 \times 10^6$ cel/ μ L na décima segunda semana do tratamento 45P, verificando-se uma diminuição de 2,2% em relação ao valor inicial. Contrariamente, no tratamento 45PALT houve um aumento de 1,7% no número de células vermelhas, subindo para $1,36 \pm 0,58 \times 10^6$ cel/ μ L na última amostragem. Foi verificado também na quarta semana o valor médio máximo de células vermelhas para ambos os tratamentos, tendo sido obtido para o 45P um valor médio de $1,68 \pm 0,33 \times 10^6$ cel/ μ L e $1,74 \pm 0,73 \times 10^6$ cel/ μ L no tratamento 45PALT. Estes resultados representam uma diferença aproximada de 4% entre tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas ($P > 0,05$).

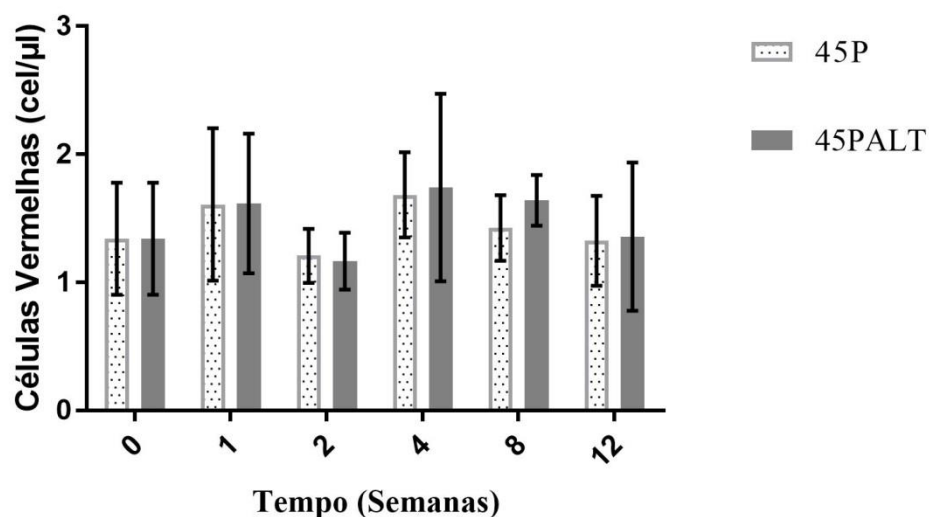


Figura 4.9 Contagem de células vermelhas na câmara de Bürker (cel/ μ L) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Os resultados obtidos nos esfregaços demonstram uma variação quase inexistente ao longo do ensaio da percentagem de eritrócitos em relação aos outros elementos do sangue (glóbulos brancos, plaquetas), sendo o valor inicial de $98,33 \pm 0,878$ % (Fig. 4.10). No tratamento 45P houve uma diminuição de 2,45% ao longo do ensaio atingindo na décima segunda semana um valor médio de aproximadamente $95,92 \pm 1,542$ % de eritrócitos. No tratamento 45PALT observou-se também uma diminuição ligeira de 1,87% dos valores médios de eritrócitos para aproximadamente $96,49 \pm 1,220$ % na última amostragem. Obteve-se uma diferença de 0,59% entre tratamentos, não sendo observadas diferenças significativas ($P > 0,05$). Quanto à percentagem de leucócitos não foi observada variação ao longo período de amostragem, nem se verificou uma diferença significativa entre tratamentos ($P > 0,05$).

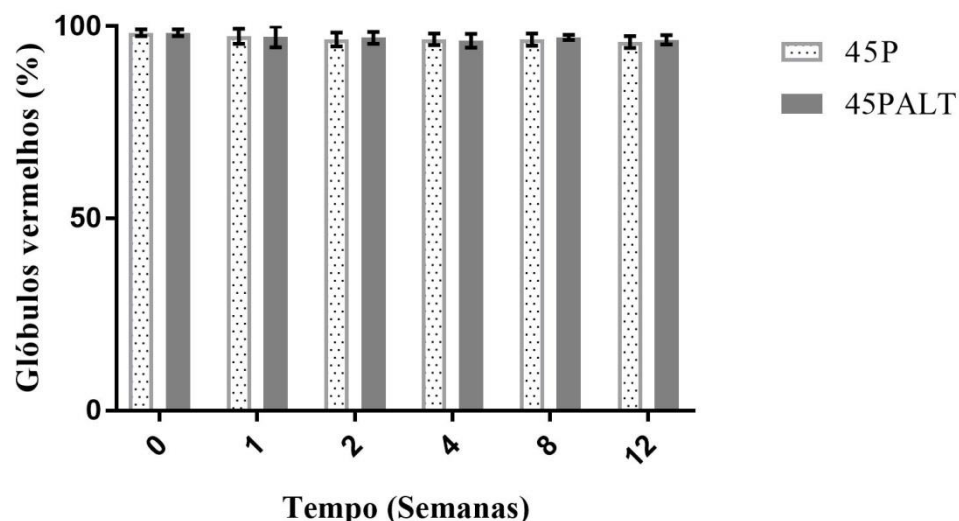


Figura 4.10 Percentagem de glóbulos vermelhos em esfregaços de sangue de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Quanto à hemoglobina, foi observado uma diminuição da concentração em ambos os tratamentos, sendo o valor médio inicial de $6,0 \pm 1,9$ g/dl (Fig. 4.11). No final do ensaio o tratamento 45P obteve um valor médio de $3,3 \pm 0,77$ g/dl de hemoglobina, correspondendo a uma diminuição de 44,5% em relação ao valor inicial. No tratamento 45PALT foi também observado uma diminuição, de 42,4%, ao longo do ensaio, tendo obtido um valor médio de $3,4 \pm 0,60$ g/dl na última amostragem. Em ambos os tratamentos observou-se um pico de aumento da concentração de hemoglobina na oitava semana, voltando a diminuir na amostragem final. Obteve-se uma diferença de 3,6% entre tratamentos, não tendo sido verificado diferenças significativas entre tratamentos ($P > 0,05$).

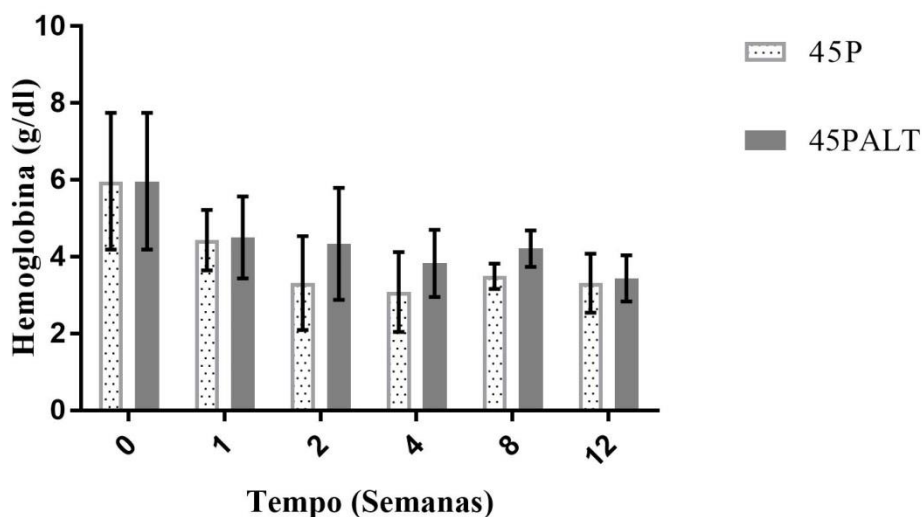


Figura 4.11 Concentração de hemoglobina (g/dL) no sangue de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início do ensaio (t=0) e no decorrer do ensaio (uma, duas, quatro, oito e doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

4.3 Parâmetros Histológicos

Com base nas observações através de microscópio ótico dos cortes de fígado colorados com hematoxilina-eosina, foram observados claros sinais de esteatose celular (Fig. 4.12). O tratamento 45P apresenta células com estrutura tipo poligonal em que os vacúolos ocupam a maior parte da célula e o tratamento 45PALT apresenta vacúolos com estrutura tipo oval em que o vacúolo também ocupa a maior parte da célula. Tendo em conta a observação dos cortes com coloração de PAS, a constituição do vacúolo é essencialmente lípidos (cerca de 95%). Foram ainda observados vestígios de tecido pancreático rodeado por células hepáticas sendo isto, indício que esta espécie tem um hepatopâncreas.

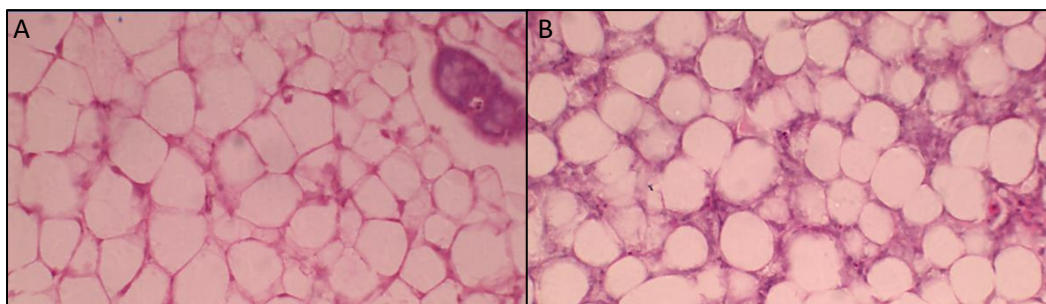


Figura 4.12 Fotografias de cortes histológicos de porções de fígado de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no final do ensaio (na décima segunda semana) com coloração de hematoxilina-eosina. A - Tratamento 45P (ingredientes de origem vegetal); B - 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal). Ampliação 400x.

Nas medições dos hepatócitos foi observado um aumento da área média para ambos os tratamentos, sendo o valor inicial de $7266 \pm 465 \mu\text{m}^2$ (Fig. 4.13). No tratamento 45P foi observado ao fim das 12 semanas um valor médio da área dos hepatócitos de $11034 \pm 513 \mu\text{m}^2$, que corresponde a um aumento de 60%. No tratamento 45PALT foi observado um ligeiro aumento de 8,4% para $7876 \pm 336 \mu\text{m}^2$. Analisando os dados foi observado uma diferença significativa entre tratamentos ($P < 0,05$).

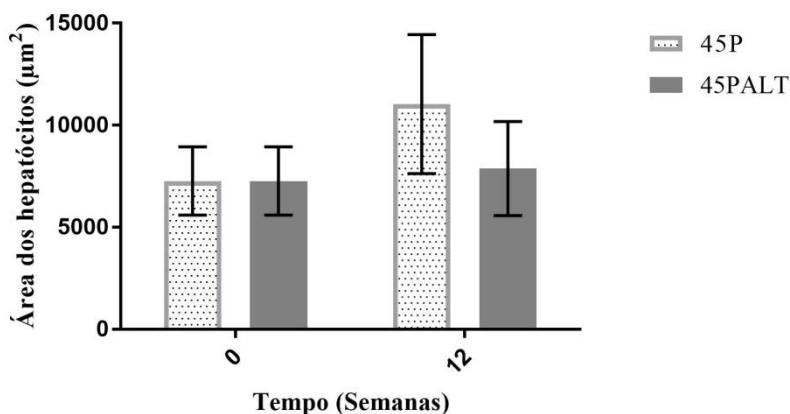


Figura 4.13 Área dos hepatócitos (μm^2) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início ($t=0$) e no final do ensaio (doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

Nos resultados histológicos obtidos na observação do intestino, verificou-se em termos morfológicos que não existiam diferenças entre tecidos dos indivíduos que foram alimentados com diferentes rações e também não foi observado diferenças na presença de mucopolissacarídeos. Um aumento ligeiro do comprimento médio total das criptas, sendo o valor médio inicial de $99,1 \pm 27,9 \mu\text{m}$ (Fig. 4.14). No tratamento 45P verificou-se um aumento resultando num comprimento médio total de $103,2 \pm 22,5 \mu\text{m}$. No tratamento 45PALT obteve-se no final do ensaio um valor médio do comprimento total de $103,7 \pm 40,1 \mu\text{m}$. Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos ($P > 0,05$).

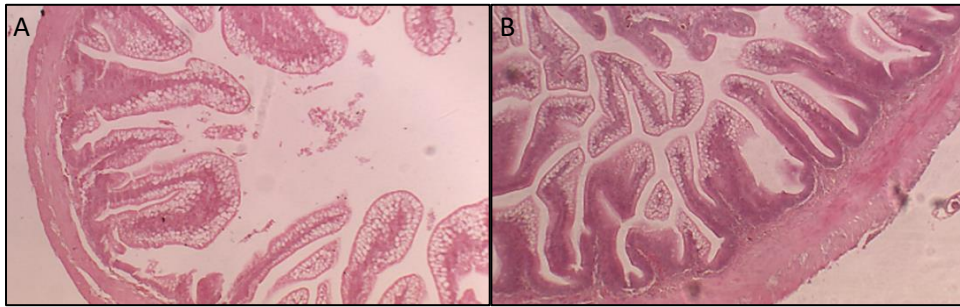


Figura 4.14 Fotografias de cortes histológicos de porções de intestino de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no final do ensaio (na décima segunda semana) com coloração de hematoxilina-eosina. A - Tratamento 45P (ingredientes de origem vegetal); B- 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal). Ampliação 400x.

No intestino anterior observou-se um aumento em ambos os tratamentos, sendo o valor inicial médio do comprimento total das criptas de $100,4 \pm 25,3 \mu\text{m}$ (Fig. 4.15). No tratamento 45P o valor médio final foi de $101,2 \pm 22,3 \mu\text{m}$ e no tratamento 45PALT foi de $114,5 \pm 54,8 \mu\text{m}$. Quanto ao intestino posterior foi também observado um aumento para o tratamento 45P e uma ligeira diminuição do valor médio do comprimento total das criptas, sendo o valor inicial de $98,3 \pm 29,5 \mu\text{m}$. Obteve-se no tratamento 45P um valor médio final de $104,6 \pm 22,6 \mu\text{m}$ e no tratamento 45PALT de $97,5 \pm 26,8 \mu\text{m}$.

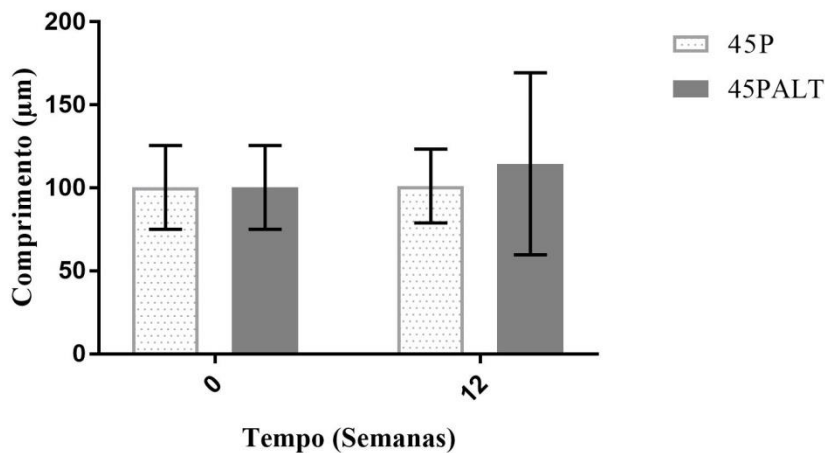


Figura 4.15 Comprimento total das criptas intestinais (μm) de juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) no início ($t=0$) e no final do ensaio (doze semanas) nos tratamentos 45P (ingredientes de origem vegetal) e 45PALT (ingredientes de origem vegetal e animal).

5. Discussão

A nutrição em aquacultura é uma das áreas mais importantes e mais estudadas, uma vez que o alimento representa os maiores custos para a produção. Tendo em conta os custos das rações em aquacultura, devido à competição pela principal fonte de proteína (farinha de peixe) por várias indústrias, desde da pecuária, avicultura e para consumo

humano, é importante investir na investigação de novos ingredientes que possam ser tão ou mais viáveis que a farinha de peixe para formular as rações para aquacultura (FAO, 2016). Ensaios anteriores com corvina (Ribeiro et al., 2015) foi observado que é possível substituir a farinha de peixe e óleo de peixe em cerca de 50% por ingredientes vegetais, não afetando a performance de crescimento significativamente e não afetando a morfologia do intestino e/ou os parâmetros hematológicos.

5.1 Crescimento e índices de condição

O peso e comprimento total dos indivíduos são parâmetros biométricos básicos, para avaliar o normal desenvolvimento dos peixes teleósteos, de acordo com os resultados obtidos não houve diferenças significativas entre tratamentos, tendo os indivíduos que consumiram a ração 45P um peso médio de 131,5 g e um comprimento total médio de 23,2 cm e os indivíduos que consumiram a ração 45PALT um peso médio de 107,1 g e um comprimento total médio de 22,2 cm. Estes valores estão de acordo com o esperado para a espécie (Ribeiro et al., 2015).

Quanto à taxa de crescimento específico, é um indicador do crescimento num determinado período. Os resultados obtidos não foram significativamente diferentes para os tratamentos, tendo sido obtido para a ração 45P valores médios de 0,89 %/dia e de 0,76 %/dia para a ração 45PALT. Os valores de taxa de crescimento para a ração 45P estão dentro do esperado, tendo em conta estudos anteriores de Chatzifotis et al (2012) e Wolley et al (2010).

Os resultados da performance de crescimento demonstraram diferenças significativas entre tratamentos, nomeadamente no índice de conversão alimentar (ICA). Este índice indica-nos o consumo de ração num determinado período por ganho de peso, logo, os peixes submetidos ao tratamento 45P que obtiveram um ICA mais baixo do que os do tratamento 45PALT, necessitaram de menos ração para crescimento. Neste estudo foram obtidos no final do ensaio valores de ICA de 1,71 e 2,35 para a ração 45P e 45PALT respetivamente. Os valores de 45P foram acima do esperado, tendo em conta os estudos realizados por Chatzifotis et al (2012), Ribeiro et al (2013) e Wolley et al (2010), que obtiveram resultados entre 1 e 1,2 para conteúdos aproximados de igual proteína vegetal. Para a ração 45PALT estão de acordo com o esperado, uma vez que a qualidade da proteína seria inferior, quando comparado com a proteína utilizada na ração 45P. Uma vez que o perfil de aminoácidos essenciais presentes na farinha de penas e farinha de

sangue de suínos é deficiente, levando a diminuição da taxa de crescimento e do ICA (Kikuchi et al., 1994).

O IC como índice que avalia o normal desenvolvimento do organismo, apresentou valores médio de 1,4 para a ração 45P e 0,97 para a ração 45PALT, não havendo diferenças significativas. Estes resultados estão de acordo com o esperado para a espécie (Ribeiro et al., 2015).

O índice hepatossomático (IHS) funciona como um indicador da condição do peixe tendo em conta a deposição de lípidos e glicogénio no fígado (Péres et al., 1999; McClland et al., 2005). De acordo com os resultados obtidos o IHS varia ao longo da amostragem, parecendo induzir que o cultivo a longo prazo seria afetado significativamente pelos tratamentos. Os valores obtidos para o tratamento 45P (2,45) estão de acordo com descrito por Wolley et al (2010), sendo que no tratamento 45PALT (2,67) os resultados obtidos foram inferiores, já esperados tendo em conta os estudos de Kikuchi et al. (1994), que demonstrou que o aumento da concentração de farinha de penas poderá provocar uma diminuição do conteúdo lipídico, logo, uma diminuição do tamanho do fígado. Estes valores associados aos valores do IC suportam a hipótese que os indivíduos alimentados pela ração 45P tiveram um aumento de peso, associado a um aumento de gordura. Isto poderá dever-se à fraca digestibilidade e ao fraco perfil de aminoácidos desta fonte proteica como descrito por Brannon et al. (1976) e Roley et al. (1977).

O índice intestinal é utilizado como indicador da capacidade de absorção, taxa de retenção e crescimento do peixe, como descrito por Buddington (1997) e Foster et al. (1993). Neste estudo não se verificou uma diferença significativa entre tratamentos (45P – 1,76 e 45PALT – 1,78), tendo-se verificado uma diferença significativa ao longo da amostragem que é representativa de um crescimento alométrico descrito em várias espécies de peixes por Karachle et al. (2010). Sendo que os valores observados neste estudo estão de acordo com os já descritos por Ribeiro et al. (2015) para esta espécie.

5.2 Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos são utilizados para verificar a condição do peixe, sendo um indicador sensível de possíveis alterações fisiológicas e de possíveis contaminações patológicas (Clauss et al. 2008; Buscaino et al. 2010; Pohlenz e Gatlin, 2014; Emre et al. 2016;). Uma alteração dos níveis de hematócrito poderá ter como causa

situações de má nutrição, anemia e deficiências de vitaminas e minerais (Sonia et al., 2007). Neste estudo a diferença de qualidade da proteína não afetou significativamente os níveis do hematócrito, sendo estes resultados idênticos aos obtidos em falso-alabote-japonês por Kikuchi et al. (1994) e corvina por Ribeiro et al. (2015). A contagem de células vermelhas e os esfregaços corroboram os resultados obtidos no hematócrito. Os níveis altos de leucócitos estão associados a possíveis infecções e/ou presença de organismos patogênicos (Sonia et al., 2007; Ribeiro et al., 2015). Uma vez que a percentagem de leucócito foi baixa, podemos concluir que os indivíduos estudados não se encontravam infetados, e como não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos podemos igualmente concluir que a capacidade imunológica dos peixes não foi afetada pelas diferentes rações. Neste estudo, os resultados obtidos para a hemoglobina não demonstraram diferenças significativas entre tratamentos, sendo os valores obtidos abaixo do esperado, tendo em conta os resultados descritos por Güroy et al. (2017). Isto poderá dever-se à grande variação dos parâmetros causada por fatores externos e internos, desde as técnicas laboratoriais e de amostragem usadas, ao sexo do indivíduo, às suas propriedades genéticas, entre outros. (Vazquez e Guerrero, 2007).

5.3 Parâmetros Histológicos

O fígado é um órgão com diversas funções preponderantes para o normal funcionamento do organismo, tais como a digestão, reprodução, o armazenamento de lípidos, hidratos de carbono, vitamina A, ferro, na defesa imunitária, na desintoxicação e no catabolismo de azoto (Munshi e Dutta, 1996). Em várias espécies produzidas em aquacultura verificaram-se alterações a nível celular no fígado, quando estas sofreram de uma nutrição deficiente ou quando foram expostas a agentes patogênicos, como biotoxinas e xenobióticos de origem humana (Munshi e Dutta, 1996; Güroy et al. 2017). Foram observadas diferenças estruturais nos hepatócitos, apresentando o tecido hepático dos indivíduos alimentados com a ração 45P uma estrutura mais compacta e hepatócitos com forma poliédrica, contrariamente aos indivíduos alimentados com a ração 45PALT que apresentam um tecido hepático menos denso e hepatócitos com forma oval. Não foram também observadas diferenças entre rações tendo em conta a composição do vacúolo dos hepatócitos, sendo constituído essencialmente por lípidos. Neste estudo foram realizadas medições da área dos hepatócitos, tendo em conta a sua suscetibilidade a alterações nutricionais, sendo que neste estudo foram detetadas diferenças significativas entre tratamentos com diferentes qualidades de proteína. Os resultados obtidos neste

estudo foram contrários aos descritos por Benedito-Palos et al. (2008), Cabellero et al. (2004) e Kowalska et al. (2010) em que proteínas com menor qualidade, como as utilizadas na ração 45PALT, poderão levar a uma maior acumulação de lípidos no fígado e consequente aumento de tamanho dos hepatócitos.

O intestino tem como principal função a decomposição dos nutrientes em moléculas simples através de enzimas hidrolíticas, de forma a serem absorvidas e utilizadas no metabolismo (Ribeiro et al., 2015). Esta absorção é diretamente influenciada pela dimensão das vilosidades, sendo que neste estudo não foram observadas diferenças significativas entre indivíduos alimentados com diferentes rações no comprimento total médio das vilosidades do intestino. Era espectável observar alterações morfológicas nas vilosidades do intestino na utilização de proteínas de menor qualidade na ração 45PALT tal como observado por Baeverfjord e Kroghdahl (1996) em salmão atlântico e por Torrecilhas et al. (2016) em robalo.

5.4 Conclusões

A corvina demonstrou uma boa adaptação à utilização de rações alternativas à farinha de peixe, como a farinha de penas e farinha de sangue de porco. Os peixes alimentados com a ração 45PALT em comparação com os peixes alimentados com a ração 45P obtiveram uma performance de crescimento similar, tendo sido a ração 45P a obter melhores resultados ao nível do índice de conversão alimentar, evidenciando a melhor qualidade de proteína presente nesta, comparando com a ração 45PALT. A substituição da proteína de melhor qualidade com as farinhas de penas e de sangue de porco foi um sucesso, uma vez que não afetou o crescimento, os parâmetros hematológicos e a morfologia do intestino. Estudos futuros, utilizando biomarcadores, poderão permitir verificar a condição ao nível celular do intestino e verificar alterações no sangue.

6. Referências Bibliográficas

- Abdel-Warith A.A, Russell P.M., Davies S.J., 2001. Inclusion of a commercial poultry by-product meal as a protein replacement of fish meal in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Research* 32 (Suppl.1), 296-305
- Baeverfjord, G., Krogdahl, A. 1996: Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases* 19, pp 375-387.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Sitjá-Bobadilla, A., Bell, J.G., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2008. High levels of vegetable oils in plan protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br. J. Nutr.* 100, pp 992–1003. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114508966071>
- Bevins, C. L., Martin-Porter, E., Ganz, T., 1999. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. *Gut*, 45, pp 911-915. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.45.6.911>
- Biagianni-Risbourg, S., 1991. Fine structure of hepatocytes in juvenile grey mullets: *Liza saliens* Risso, *L. ramada* Risso and *L. aurata* Risso (Teleostei, Mugilidae). *Journal of Fish Biology* Vol. 39 issue 5. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1991.tb04399.x>
- Bostock J., Muir J., Young J., Newton R., Paffrath S., 2008. Prospective Analysis of the Aquaculture Sector in the EU - PART 1: Synthesis report. European Commission, Joint Research Center, Institute for Prospective Technological Studies. Scientific and Technical Reports.
- Boyar, H. C., 1962. Blood cell types and differential cell counts in Atlantic herring, *Clupea harengus harengus*. *Copeia*, 2, pp 463-465
- Brannon, E.L., Roley, D.D. and Roley, SE., 1976. Alternate protein sources to supplement the University of Washington standard hatchery diet for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Annual Report of the College of Fisheries, University of Washington, Seattle, WA, pp. 64-65.
- Buddington R.K., Krogdahl A., Bakke A.M., 1997. The intestines of carnivorous fish: Structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica* 161, suppl. 638, pp 67-80.

- Buscaino G, Filiciotto F, Buffa G, Bellante A, Di Stefano V, Assenza A, Fazio F, Caola G, Mazzola S. 2010. Impact of an acoustic stimulus on the motility and blood parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Mar. Environ. Res.* 69, pp 136–142.
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, 27, pp 531–541.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Divanach, P., 2012. Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquac. Int.* 20, pp 91–98.
- Chatzifotis, S., Panagiotidou, M., Papaioannou, N., Pavlidis, M., Nengas, I., Mylonas, C.C., 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture* 307, pp 65–70.
- Clauss T, Dove A, Arnold J. 2008. Hematologic disorders of fish. *The veterinary clinics of North America. Exot Anim Pract.* 11, pp 445–462.
- Couto A., Barroso C., Guerreiro I., Pousão-Ferreira P., Matos E., Peres H., Oliva-Teles A., Enes P., 2016. Carob seed germ meal in diets for meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles: growth, digestive enzymes, intermediary metabolism, liver and gut histology. *Aquaculture* Volume 451, pp 396-404, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.007>
- Curtis, B., 1949. “The Life Story of the Fish. His Manners and Morals.” Republished 1961 by Dover, New York.
- Davis, H. S., 1953. *Culture and Disease of Game Fishes*. University of California Press, Berkeley, California.
- Ellis, A. E., 1977. The leukocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology* 11:453-491.
- Emre, Y., Kurtoglu, A., Emre, N., Guroy, B., & Guroy, D., 2016. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on growth performance, fatty acid composition and haematological parameters of juvenile meagre, *Argyrosomus regius*. *Aquaculture Research*, 47(7), pp 2256–2265.
- Espaço Aquicultura, 2016. *eaquicultura*. [ONLINE] Disponível em: <http://eaquicultura.pt/>. [Acedido a 25 novembro de 2016].

- FAO, 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyrosomus regius*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto de Stipa, P.; Angelini, M. Em: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 10 February 2005. [Acedido a 27 novembro 2016].
- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security, and nutrition for all. Rome, pp 200
- FAO/GLOBEFISH, 2016. FAO [ONLINE] Disponível em: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/346455/> [Acedido a 27 de novembro de 2016].
- Fazio F., Filiciotto F., Marafioti S., Stefano V., Assenza A., Placenti F., Buscaino G., Piccione G., e Mazzola S. Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), 2012. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 45:1, pp 63-73, DOI: 10.1080/10236244.2012.677559
- Foster, A. R., D. F. Hsulihan, e S. I. Hall. 1993. Effects of nutritional regime on correlates of growth rate in juvenile Atlantic cod (*Cadus morhua*): comparison of morphological and biochemical measurements. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, pp 502-512.
- Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, P., Gómez-Réqueni, P., Médale, F., Kaushik, S. J., Mecatti, M., Poli, B. M., 2007. Effect of high-level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillet quality traits. Aquaculture Nutrition 13, pp 361–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00485.x>
- Fänge, R., 1984. Lymphomyeloid tissues in fishes. Vidensk. Meddr. Dansk Naturh. Foren. 145, pp 143-162
- Fänge, R., 1987. Lymphomyeloid system and blood cell morphology in elasmobranchs. Archives Biology (Brussels) 98, pp 187-208.
- Fänge, R., 1992. Fish blood cells. In: Hoar, W.S., Randall, D. J., and Farrell A. P., editors. Fish Physiology. San Diego, CA: Academic Press Inc, Vol. 12V, pp. 1-54.

- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, pp 551–579.
- Giogios I., Grigorakis K., Kalogeropoulos N., 2013. Organoleptic and chemical quality of farmed meagre (*Argyrosomus regius*) as affected by size. *Food chemistry*, 141, pp 3153-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.154>.
- Glencross B., 2016. Understanding the nutritional and biological constraints of ingredients to optimize their application in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*, pp 33–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00003-8>
- Güroy D, Karadal O, Güroy B, Mantoğlu S., Çelebi K., Şimşek O., Tufan O., Münevver E., Genç A., Genç E., 2017. The effects of dietary protein levels with amino acid supplementation on the growth performance, haematological profile and histology of meagre (*Argyrosomus regius*) in two different size classes. *Aquac. Res.* 48, pp 5751–5764. <https://doi.org/10.1111/are.13398>
- Hedrerera, M.I., Galdames J.A., Jimenez-Reyes M.F., Reyes A.E., Avendaño-Herrera R., Romero J., Feijóo C.G., 2013. Soybean Meal Induces Intestinal Inflammation in Zebrafish Larvae. *PLoS ONE* 8, e69983. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069983>.
- Hines, R.S. e Spira, D.T., 1973. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. II. Leukocyte response. *Journal of Fish Biology* 5, pp 527-534.
- Jackson A., 2012. Fishmeal and Fish oil and their role in Sustainable Aquaculture. *International Aquafeed Article Vol. I* pp 391-412 and *Vol. VIII* pp. 30,31, pp 170-174.
- Jordan H.E., Speidel C.C. 1924. Studies on lymphocytes. II. The origin, function, and fate of the lymphocytes in fishes. *J. Morphol.* 38, pp 529–549
- Kagnoff, M. F., Eckman L., 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.* 100(1), pp 6-10. <https://doi.org/10.1172/JCI119522>.
- Karachle, P., & Stergiou, K. 2010. Gut length for several marine fish: Relationships with body length and trophic implications. *Marine Biodiversity Records*, 3. doi:10.1017/S1755267210000904
- Kikuchi K., Furuta T., Honda H., 1994. Utilization of feather meal as a protein source in the diet of juvenile japanese flounder. *Fisheries Science* 60 (2). pp 203-206.

- Kisch, B., 1951. Erythrocytes in fishes. *Exp. Med. Surg.* 9, pp125-137.
- Kowalska, A., Zakęs, Z., Jankowska, B., Siwicki, A., 2010. Impact of diets with vegetable oils on the growth, histological structure of internal organs, biochemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). *Aquaculture* 301, pp 69–77.
- Martoja, R., Martoja-Pierson, M., 1970. *Técnicas de Histología Animal*. Toray Masson, Barcelona, p. 350.
- Maynard, L. A. e Loosli, J. K., 1962. *Animal Nutrition*. McGraw-Hill, New York
- McClelland, G., Zwingelstein, G., Weber, J.-M., Brichon, G., 1995. Lipid composition of tissue and plasma in two Mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52, pp 161–170.
- Meyers, S. P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations and role of carotenoids. *Pure & Appl. Chem.* Vol. 66, N°5 pp 1069-1076.
- Merrifield, D., Ringø, E., 2014. *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Blackwell
- Munshi, D. e Dutta, H. M., 1996. *Fish Morphology: horizon of new research*. Science Publishers.
- Péres, H., Gonçalves, P., Oliva-Teles, A., 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, pp 415–423.
- Philips A. M. Jr., Livingston, D. L., e Poston, H. A., 1965. The effect of protein and calorie levels and sources on the growth of brown trout. *Fish. Res. Bull.* No. 29, pp 6-14. N. Y. State Cons. Dept. Albany.
- Philips A. M. Jr., Livingston, D. L., e Poston, H. A., 1966. The effect of changes in protein quality, calorie sources and calorie levels upon the growth and chemical composition of brook trout. *Fish. Res. Bull.* 29, pp 6-7. N. Y. State Conservation Department, Albany.
- Pillay, T.V.R., e Kutty, M. N., 2005. *Aquaculture Principles and Practices* Blackwell Publishing Ltd Cap. 7.
- Pohlenz, C., e Gatlin, D. M., 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431, pp 111–117.
- Vazquez, R. G, Guerrero G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus*. *J Tiss Cell.* 39, pp 151–160.

- Ribeiro L., Moura J., Santos M., Colen R., Rodrigues V., Bandarra N., Soares F., Ramalho P., Barata M., Moura P., Pousão-Ferreira P., Dias J., 2015. Effect of vegetable based diets on growth, intestinal morphology, activity of intestinal enzymes and haematological stress indicators in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 447 pp 116-128.
- Ribeiro L., Soares F., Quental-Ferreira H., Gonçalves A., Pousão-Ferreira P., 2013. Portuguese research studies: Meagre production in earthen ponds. *Global aquaculture advocate*. 16 pp 38 – 40.
- Robaina L., Moyano F.J., Izquierdo M.S., Socorro J., Vergara J.M., Montero D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus Aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, pp 347-359
- Robertson, O. H., e Wexler, B. C., 1960. Histological changes in the organs and tissues of migrating and spawning pacific salmon (genus *Oncorhynchus*). *Endocrinology*, Volume 66, Issue 2, pp 222–239, <https://doi.org/10.1210/endo-66-2-222>
- Roley, D.D., Roley, S.E., Hardy, R.W. and Brannon, E.L., 1977. Feather meal and *Candida* yeast as substitutes for fish meal in the diets of chinook salmon fry (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Annual Report of the College of Fisheries*. University of Washington, Seattle, WA, p 70.
- Ronald R.J., 2002. *Fish Nutrition*. 3 Edition. Academic Press. 8.
- Roubal, F. R., 1986. Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *Journal of Fish Biology* 28, pp 573-93
- Sonia M., Jerry H., Charlie S., John M., Beth M., Vicki B., 2007. *Fish Histology and Histopathology*. USFWS-NCTC Chapter 4.
- Ståle R., Trond S., Andries R. J., 1998. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture* Volume 162, Issues 3–4, pp 301-312
- STECF (Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries), 2014. The economic performance of the EU aquaculture sector (STECF 14-18). Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2, pp 30-33.

- Torrecillas S., Mompel D., Caballero M.J., Monteroa D., Merrifield D., Rodiles A., Robaina L., Zamorano M.J., Karalazos V., Kaushik S., Izquierdo M., 2016. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 468 pp. 386–398
- Wolley L. D., Jones C.L.W., Britz P.J., 2010. Effect of dietary protein to energy ratio on growth and nitrogenous waste production of cultured dusky kob *Argyrosomus japonicus*. *African Journal of Marine Science*, 32(3): pp 625-631.