

Efeito da suplementação dietética de triptofano no stress e comportamento de corvinas (*Argyrosomus regius*) juvenis

Ana Catarina Santos Vasconcelos

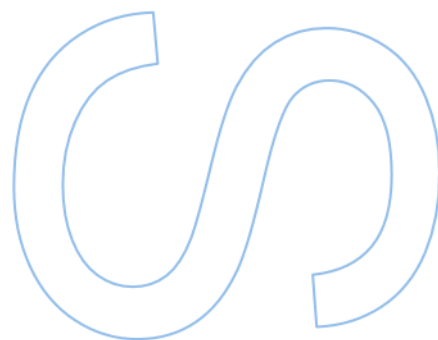
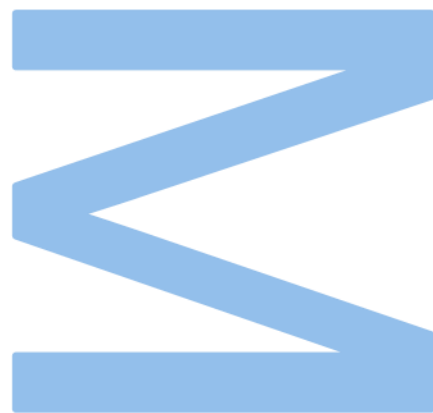
Mestrado em Ecologia e Ambiente
Faculdade de Ciências, Universidade do Porto
2021

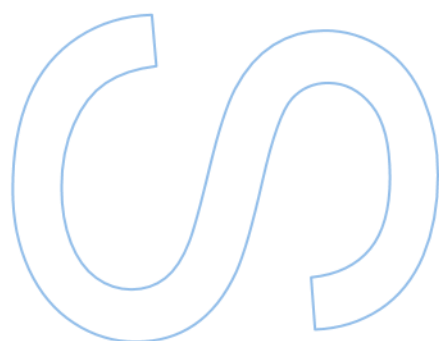
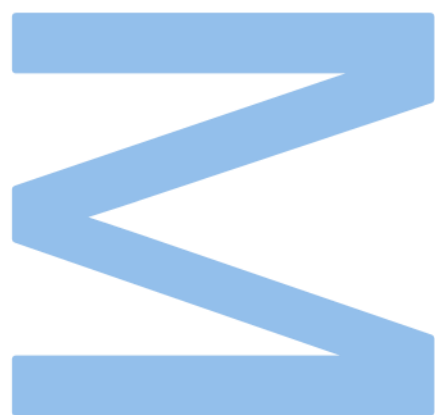
Orientador

Margarida Saavedra, Investigadora Auxiliar, Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.)

Coorientador

Marta Soares, Investigadora Auxiliar, CIBIO (BIOPOLIS),
Universidade do Porto





Declaração de Honra

Eu, Ana Catarina Santos Vasconcelos, inscrito(a) no Mestrado em Ecologia e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto declaro, nos termos do disposto na alínea a) do artigo 14.º do Código Ético de Conduta Académica da U.Porto, que o conteúdo da presente dissertação reflete as perspetivas, o trabalho de investigação e as minhas interpretações no momento da sua entrega.

Ao entregar esta dissertação, declaro, ainda, que a mesma é resultado do meu próprio trabalho de investigação e contém contributos que não foram utilizados previamente noutros trabalhos apresentados a esta ou outra instituição.

Mais declaro que todas as referências a outros autores respeitam escrupulosamente as regras da atribuição, encontrando-se devidamente citadas no corpo do texto e identificadas na secção de referências bibliográficas. Não são divulgados na presente dissertação quaisquer conteúdos cuja reprodução esteja vedada por direitos de autor.

Tenho consciência de que a prática de plágio e auto-plágio constitui um ilícito académico.

Ana Vasconcelos

Porto, 27 de setembro de 2022

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio das seguintes pessoas, a quem só tenho de agradecer:

- Às minhas orientadoras, Margarida Saavedra e Marta Soares que, além de estarem sempre prontas para ajudar, me acalmaram nos tempos de maior ansiedade;
- Ao Doutor Pedro Pousão (IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.) que fez de tudo para que tivesse tudo o que precisava durante o trabalho prático;
- À Marisa Barata que esteve sempre pronta para me ensinar, permitindo que o trabalho na Estação Piloto de Piscicultura e Olhão (EPPO) corresse sem percalços;
- Aos elementos da EPPO, em especial à Carole, ao Ivo, à Inês e à São, pois todos eles, de uma forma ou de outra, me ajudaram nos momentos de maior tensão;
- Ao André Pardal que me ajudou na fase final do ensaio;
- À Mafalda e à D. Lurdes, pois, permitiram a minha rápida adaptação ao Algarve, tornando-se família;
- Bárbara Teixeira e Rogério Mendes que fizeram a análise dos aminoácidos nas rações;
- À SPAROS, Lda. Pelo fornecimento das dietas;
- À Ana Couto e ao Fábio Rangel do CIIMAR, pela orientação quando fui fazer a análise química das rações e dos peixes;
- Aos meus pais e irmã por tudo.

Resumo

A população humana tem tido um crescimento constante desde 1950 e para suprimir as suas necessidades alimentares tem havido uma aposta cada vez maior na aquacultura. A produção de corvina (*Argyrosomus regius*) tem sofrido um grande aumento devido às suas características vantajosas como uma taxa de crescimento superior à da dourada (*Sparus aurata*) e do robalo (*Dicentrarchus labrax*) e uma qualidade elevada da sua carne. No entanto, a produção intensiva apresenta vários agentes de stress que podem afetar negativamente o bem-estar e qualidade do peixe. A corvina é uma espécie especialmente vulnerável e é crucial encontrar-se formas de mitigar o stress, como, por exemplo através da suplementação das dietas. O triptofano é o aminoácido precursor de serotonina e melatonina, envolvido na modulação do comportamento, bem-estar e redução das respostas ao stress nos peixes.

Para avaliar o efeito da suplementação dietética do triptofano na resposta ao stress e comportamento de corvinas juvenis foram preparadas três rações (Tript1, Tript2 e Tript3) com diferentes percentagens de triptofano (0,5, 0,7 e 0,8 %, respetivamente), contabilizando-se assim três tratamentos experimentais. Um total de 900 juvenis com um peso de 32,6 g foram distribuídos aleatoriamente por nove tanques e cada tratamento foi aplicado em triplicado durante 56 dias.

No final do ensaio, os critérios de crescimento foram semelhantes entre os tratamentos. O mesmo aconteceu com a composição química das carcaças, com a exceção da percentagem de matéria de seca, que foi superior no tratamento Tript2, e de proteína, que foi diferente entre os tratamentos Tript1 e Tript2, sendo inferior no último. Foi nos parâmetros sanguíneos que se verificaram mais diferenças. Apesar de não haver diferenças significativas entre tratamentos, houve diferenças, antes e depois do teste de stress, no nível de glucose no sangue, que foi superior no pós-stress para todos os tratamentos, nos valores de hemoglobina, que foi inferior no pós-stress para o tratamento Tript1, e no nível de lactato, que foi inferior no pós-stress para todos os tratamentos. Por fim, nos testes de comportamento (teste de ansiedade, social e de lateralização) não houve diferenças significativas, com exceção do número de atos de *freezing* aquando do teste de ansiedade. Neste caso, o número de atos de *freezing* foi diferente entre o tratamento Tript1 e Tript3, sendo inferior neste último.

Os resultados obtidos não apontaram para um efeito do triptofano muito pronunciado o que, pode ser explicado, pelo facto de as rações inicialmente desenhadas previrem uma ração deficitária em triptofano, o que, após a análise das mesmas, não se verificou. O que se observou foi que quando o triptofano na dieta se encontrava acima do seu requisito estimado, este não mitigava acentuadamente os efeitos do stress de corvinas juvenis desta idade.

Palavras-chave: *Argyrosomus regius*, stress, triptofano, comportamento

Abstract

The human population has been growing steadily since 1950 and to meet their food needs there has been an increasing interest on aquaculture. Due to several features, such as a higher growth rate than sea bream (*Sparus aurata*) and bass (*Dicentrarchus labrax*) and high flesh quality, the production of meagre (*Argyrosomus regius*) is increasing. However, there is a high number of stressors present in aquaculture, which can affect fish welfare and quality. Meagre is an especially vulnerable species and it is crucial to find measures to mitigate the stress in this species. One way is the addition of tryptophan to the diets. Tryptophan is the amino acid precursor of serotonin and melatonin, involved in the modulation of behavior, well-being and reduction of stress responses in fish.

To evaluate the effects of tryptophan on stress response and behavior of juvenile meagre, three diets (Tript1, Tript2 and Tript3) were prepared with different tryptophan contents (0,5, 0,7 and 0,8 %, respectively), accounting for three experimental treatments. A total of 900 juveniles with 32,6 g were randomly distributed into nine tanks, each treatment was tested in triplicates and the experimental trial lasted 56 days.

At the end of the trial, survival and growth were similar between treatments. The same was observed for fish proximal composition, except for the percentage of dry matter, which was higher in the Tript2 treatment, and protein, which was different between the Tript1 and Tript2 treatments, being lower in the latter. It was in the blood parameters that most differences were found. Although there were no significant differences between treatments, there were differences before and after the stress test in the blood glucose level, which was higher in the post-stress for all treatments, in hemoglobin values, which was lower in the post-stress for the Tript1 treatment, and in lactate level, which was lower in the post-stress for all treatments. Finally, in the behavioral tests (anxiety test, social test, and lateralization test) there were no significant differences, except for the number of freezing at the time of the anxiety test. In this case, the number of freezing was different between the Tript1 and Tript3 treatment, being lower in the latter.

The results obtained did not show a very pronounced effect of tryptophan, which could be explained by the fact that the initially designed feeds foresaw a tryptophan-deficient diet, which, after analysis, did not happen. What was observed was that when dietary

tryptophan was above its estimated requirement, it did not markedly mitigate the effects of stress in juvenile meagre of this age.

Keywords: *Argyrosomus regius*, stress, tryptophan, behavior

Índice

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Panorama da aquacultura.....	1
1.2. Stress em aquacultura.....	3
1.2.1. Conceito de stress e seus efeitos	3
1.2.2. Stress nos peixes	5
1.2.3. Stress em aquacultura	6
1.2.4. Mitigar o stress: uso de compostos como o triptofano na dieta de peixes	6
1.3. Testes para avaliar o stress.....	7
1.4. A Corvina.....	9
1.4.1. Biologia	9
1.4.2. Produção desta espécie em aquacultura	10
1.5. Objetivos	11
2. Material e métodos	13
2.1. Ensaio e instalação experimental	13
2.2. Amostragem e análises bioquímicas.....	14
2.3. Análise química dos peixes e rações	15
2.3.1. Matéria seca	15
2.3.2. Matéria inorgânica (cinzas)	16
2.3.3. Proteína	16
2.3.4. Lípidos	17
2.3.5. Energia	18
2.4. Análises ao sangue	18
2.4.1. Análise aos níveis de glucose	18

2.4.2.	Análise aos níveis de lactato	19
2.4.3.	Análise aos níveis de hemoglobina.....	19
2.4.4.	Hematócrito.....	19
2.5.	Testes de stress e comportamento	20
2.5.1.	Teste Novel tank diving e teste do cardume.....	20
2.5.2.	Teste da lateralização.....	21
2.6.	Análise estatística.....	22
3.	Resultados.....	23
3.1.	Perfil de aminoácidos das rações	23
3.2.	Crescimento e eficiência de utilização das dietas	23
3.3.	Composição proximal dos peixes	24
3.4.	Análises ao sangue	25
3.4.1.	Níveis de glucose	25
3.4.2.	Níveis de lactato	26
3.4.3.	Níveis hemoglobina.....	26
3.5.	Teste Novel tank diving, teste do cardume e teste de lateralização	27
3.5.1.	Teste novel tank diving	27
3.5.2.	Teste do cardume.....	27
3.5.3.	Teste de lateralização.....	28
4.	Discussão	29
4.1.	Perfil de aminoácidos da ração.....	29
4.2.	Análise química dos peixes	30
4.3.	Análises ao sangue	30
4.4.	Resposta comportamental: Teste Novel tank diving, teste do cardume e teste de lateralização	33
4.4.1.	Teste novel tank diving	33
4.4.2.	Teste do cardume.....	34
4.4.3.	Teste de lateralização.....	34
5.	Conclusão.....	36

6. Referências Bibliográficas	37
7. Anexos	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano	14
Tabela 2 – Perfil de aminoácidos das rações Trip1 - com 0,5 % de triptofano, Trip2 - com 0,7 % de triptofano e Trip3 - com 0,8 % de triptofano, fornecidas a juvenis de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>) Os valores são médias $\pm$ erro padrão. ASP - aspartato; GLU - glutamato; SER - serina; HIS - histidina; GLY - glicina; THR - treonina; ARG - arginina; ALA - alanina; TAU - taurina; TYR - tirosina; VAL - valina; MET – metionina; TRP – triptofano; PHE - fenilalanina; ILE - isoleucina; LEU - leucina; LYS - lisina; HYP - hidroxiprolina; PRO - prolina	23
Tabela 3 – Crescimento e eficiência de utilização do alimento de <i>Argyrosomus regius</i> alimentada com as dietas durante os 56 dias e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano; SGR - taxa de crescimento específico; FCR - taxa de conversão alimentar; PER - rácio de eficiência proteica.....	24
Tabela 4 – Composição das carcaças de <i>Argyrosomus regius</i> e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano;	25
Tabela 5 – Valores das análises ao sangue de <i>Argyrosomus regius</i> e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano; HTC - hematócrito; Glu - glucose; Hgb – hemoglobina; letras diferentes indicam diferenças significativas.....	25
Tabela 6 – Resultados obtidos no teste de ansiedade de <i>Argyrosomus regius</i> e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano	27
Tabela 7 – Resultados teste social realizado a <i>Argyrosomus regius</i> e erro padrão; Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano	28

Tabela 8 – Resultados do teste de lateralização realizado a *Argyrosomus regius* e erro padrão; Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano 28

Lista de Figuras

Figura 1 – Fornecimento mundial de peixe (FAO, 2022).....	1
Figura 2 – Esquema da ação do triptofano (Carvalho et al., 2017).....	7
Figura 3 – Esquema da corvina (<i>Argyrosomus regius</i>) (Alteração de Monfort (2010)) ..	9
Figura 4 – Fotografia de corvina (<i>Argyrosomus regius</i>) adulto	9
Figura 5 – Principais produtores de <i>Argyrosomus regius</i> em 2006 (Monfort, 2010)	10
Figura 6 – Esquema tanque 1 visto de cima; linhas a laranja – divisão das três zonas do teste da socialização; linhas a azul – divisão dos quatro quadrantes do teste da ansiedade; círculo preto representa o indivíduo teste e círculos azuis representam os indivíduos do cardume	20
Figura 7 – Esquema do tanque para o teste da lateralização (vista superior)	21
Figura 8 – Quantidade de glucose presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	26
Figura 9 – Quantidade de lactato presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	26
Figura 10 – Quantidade de hemoglobina presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).....	26
Figura 11 – Número de atos de <i>freezing</i> das corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Cada letra diferente representa diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos	27
Figura complementar 12 – Quantidade de aspartato presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45
Figura complementar 13 – Quantidade de glutamato presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45

Figura complementar 14 – Quantidade de serina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45
Figura complementar 15 – Quantidade de histidina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45
Figura complementar 16 – Quantidade de glicina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45
Figura complementar 17 – Quantidade de treonina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	45
Figura complementar 18 – Quantidade de arginina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 19 – Quantidade de alanina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 20 – Quantidade de taurina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 21 – Quantidade de tirosina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 22 – Quantidade de valina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 23 – Quantidade de metionina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	46
Figura complementar 24 – Quantidade de triptofano presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47
Figura complementar 25 – Quantidade de fenilalanina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47

Figura complementar 26 – Quantidade de isoleucina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47
Figura complementar 27 – Quantidade de leucina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47
Figura complementar 28 – Quantidade de lisina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47
Figura complementar 29 – Quantidade de hidroxiprolina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	47
Figura complementar 30 – Quantidade de prolina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 31 – Peso final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 32 – Comprimento final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 33 – Biomassa final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 34 – Taxa de crescimento das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 35 – Taxa de conversão alimentar das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 36 – Rácio de eficiência proteica das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48
Figura complementar 37 – Percentagem de lípidos das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	48

Figura complementar 38 – Percentagem de energia das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão.....	49
Figura complementar 39 – Percentagem de cinzas das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 40 – Hematócrito das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 41 – Transições totais das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 42 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano passaram na metade inferior. Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 43 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram em <i>freezing</i> . Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 44 – Número de impulsos das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	49
Figura complementar 45 – Percentagem de tempo antes das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano se aproximarem pela primeira vez do cardume. Os resultados são média e erro padrão.....	49
Figura complementar 46 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram perto do cardume. Os resultados são média e erro padrão	50
Figura complementar 47 – Média de transições totais das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão.....	50

Figura complementar 48 – Média de toques no acrílico das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	50
Figura complementar 49 – Média de atos de <i>freezings</i> das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão	50
Figura complementar 50 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram em <i>freezing</i> . Os resultados são média e erro padrão	50

Lista de Abreviaturas

IPMA	INSTITUTO PORTUGUÊS DO MAR E DA ATMOSFERA
LR	ÍNDICE RELATIVO
MF	MATÉRIA FRESCA
MS	MATERIA SECA
TRIPT1	TRATAMENTO COM 0,5 % DE TRIPTOFANO
TRIPT2	TRATAMENTO COM 0,7 % DE TRIPTOFANO
TRIPT3	TRATAMENTO COM 0,8 % DE TRIPTOFANO
TRP	TRIPTOFANO

1. Introdução

1.1. Panorama da aquacultura

A população mundial tem tido um crescimento constante desde 1950, sendo que, até 2050, se prevê que a população mundial atinja um valor de 9,7 mil milhões (United Nations, 2022). Juntamente com esta tendência, o consumo de peixe *per capita* também tem aumentado, passando de 9 kg em 1961 para 20 kg em 2018, sendo responsável pelo fornecimento de 20 % da proteína animal ingerida a mais de três mil milhões de pessoas (FAO, 2020a). Tendo isto em conta, a pesca não é suficiente para satisfazer estas necessidades e o papel da aquacultura torna-se fundamental para que o pescado possa continuar a fazer parte da dieta da população mundial (figura 1). A aquacultura tem sido o setor de produção alimentar com maior crescimento desde 1970, devido ao aumento do consumo de peixe e à estagnação da pesca (Ciji & Akhtar, 2021).

Entre a década de 1950 e 1990, a aquacultura era insignificante no fornecimento de pescado, no entanto, a partir da década de 90, a tendência começou a mudar (figura 1). Em 2020, a aquacultura forneceu mais de 87 milhões de toneladas de pescado, o que corresponde a cerca de 49 % (FAO, 2022). Nesse ano, 89 % do peixe produzido mundialmente foi utilizado para consumo direto, sendo a Ásia quem mais contribuiu para o volume mundial de pescado, produzindo, nas últimas duas décadas, 89% do volume mundial e, em 2017, 91 %, baixando para 70 % em 2020 (Tacon, 2020; FAO, 2022). De um modo geral, tem havido um aumento do fornecimento de peixe a nível mundial, com

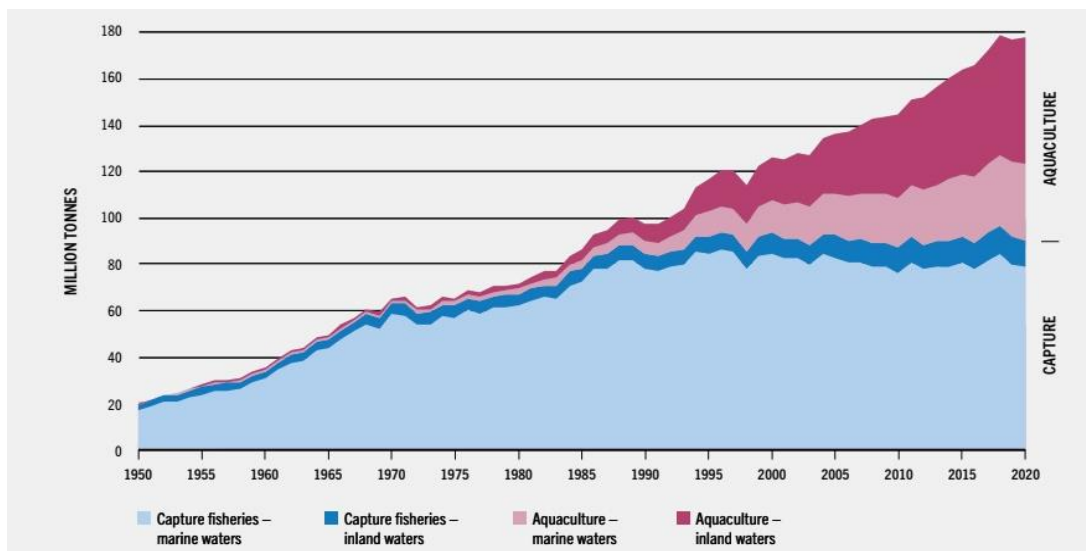


Figura 1 – Fornecimento mundial de peixe (FAO, 2022)

exceção da Europa e da América (FAO, 2020a; FAO, 2022). A nível de países, em 2018, a China contribuiu com cerca de 35% do pescado mundial, tendo havido uma diminuição desde 2017, estagnando em 2020 (FAO, 2020a; Tacon, 2020; FAO, 2022).

Os produtos da pesca são dos produtos alimentares mais comercializados no mundo, representando, com exceção dos produtos florestais, 11% do valor das exportações agrícolas (FAO, 2020a). A China é o país com maior produção e, também, o maior exportador, seguido da Noruega e do Vietnã (FAO, 2020a). Em termos de importação, a União Europeia retém a maior fatia, com 34% a 37% da importação em termos de valor (FAO, 2020a; FAO, 2020b).

O salmão atlântico (*Salmo salar*) e a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) são as espécies mais importantes comercialmente e, em 2018, representaram cerca de 18% do valor total dos produtos de pesca comercializados mundialmente (FAO, 2020b). Após estas espécies, o camarão (*Penaeus vannamei*) representou cerca de 16%, o peixe moído, como a pescada (*Merluccius merluccius*) e o bacalhau (*Gadus morhua*), e o atum (*Katsuwonus pelamis*) representaram 9% (FAO, 2020b).

O aumento da produção de peixe em aquacultura está a possibilitar uma diminuição na pressão média da pesca, favorecendo a recuperação dos *stocks* naturais, e um aumento na biomassa média populacional, permitindo atingir ou manter níveis biologicamente sustentáveis das populações (Natale et al., 2013; FAO, 2020a). Isto é demonstrado nos níveis de unidades populacionais pescadas de forma maximamente sustentável, que diminuíram entre 1974 e 1989, mas aumentaram em 2017 (FAO, 2020a). Além disso, a aquacultura oferece benefícios aos consumidores, como maior oferta e preços mais baixos (Natale et al., 2013).

Apesar dos benefícios da aquacultura, esta também apresenta aspetos negativos. O cultivo intensivo dos animais aquáticos conduz a problemas de bem-estar animal que, muitas vezes, se refletem numa maior incidência de doenças e, até, numa diminuição da qualidade do pescado (FAO, 2020a). Este é o maior entrave ao desenvolvimento sustentável da aquacultura, pois a tendência é a descoberta de novos agentes patogénicos, que, causando doenças facilmente propagáveis, podem conduzir a elevadas perdas na produção (FAO, 2020a). Como consequência, poderão surgir custos resultantes da perda de produção, encerramento, temporário ou permanente, das instalações e, eventualmente, transmissão do patógeno às populações selvagens (FAO, 2020a). Além das doenças, alguns resíduos produzidos na aquacultura também são um grande problema da produção aquícola atual. Estes resíduos afetam a qualidade

do pescado, pois vários produtos usados na aquacultura contêm contaminantes tóxicos que podem ser ingeridos pelos peixes e ficar armazenados na gordura. Para além disso afetam o ambiente, pois os químicos usados na aquacultura são, muitas vezes, descarregados para o ambiente, contaminando os ambientes aquáticos naturais (Ahmad et al., 2021). Para que a aquacultura se torne numa indústria mais sustentável é fundamental que se criem medidas para melhorar o bem-estar animal, de forma que se aumente a resiliência ao stress e a suscetibilidade a doenças tendo em vista a produção de um pescado de melhor qualidade.

1.2. Stress em aquacultura

1.2.1. Conceito de stress e seus efeitos

O stress faz parte da vida (Moberg & Mench, 2000) e pode ser definido como uma alteração da homeostasia (estabilização de uma variável corporal através de regulação fisiológica e comportamental (Broom & Johnson, 2019)) provocada por fatores endógenos ou exógenos (Kumar et al., 2012; Liu et al., 2017). Este conceito vai além da dor, podendo incluir estados psicológicos como medo ou ansiedade (tendência para evitar supostas situações perigosas, permitindo antecipar uma possível ameaça (Kumar et al., 2012; Heeren, 2020)). Ou seja, indivíduos que se encontrem em situações de ansiedade ou medo, têm uma resposta agravada ao stress (Renna et al., 2018). Apesar do stress ter vários efeitos negativos (aos quais me refiro mais à frente), nas populações selvagens o stress é fundamental para a sobrevivência do animal (Liu et al., 2017). Isso acontece porque os mecanismos de resposta ao stress atuam sobre o sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal fazendo com que estes libertem hormonas responsáveis pela reação “lutar ou fugir” (Liu et al., 2017).

A resposta ao stress começa com a perceção, pelo sistema nervoso central, de uma ameaça, que mesmo que pequena, destabiliza a homeostasia (Moberg & Mench, 2000; Broom & Johnson, 2019). De seguida, é desenvolvida uma resposta biológica que consiste em diferentes combinações das quatro repostas de defesa biológica: resposta comportamental, resposta do sistema nervoso autónomo, resposta neuroendócrina e resposta imunitária (Moberg & Mench, 2000). Quando possível, a resposta comportamental é a primeira a ser monitorizada, isto porque é a mais económica, visto que o indivíduo só precisa de alterar a sua posição ou o padrão de locomoção (Moberg & Mench, 2000; Broom & Johnson, 2019). Quando um animal vê uma presa/predador ou sente dor, é este tipo de resposta que normalmente ocorre (Broom & Johnson, 2019). A segunda defesa é a resposta do sistema nervoso autónomo, que, juntamente com a resposta neuroendócrina, é responsável pela reação “lutar ou fugir” (Moberg & Mench,

2000; Liu et al., 2017). Durante o tempo de stress, esta resposta afeta vários sistemas biológicos, como o sistema cardiovascular, o sistema gastrointestinal, as glândulas exócrinas e a medula adrenal. Isso vai levar à alteração do ritmo cardíaco, da pressão sanguínea e da atividade gastrointestinal (Moberg & Mench, 2000). Apesar destas alterações, a resposta do sistema nervoso autónomo não tem um impacto significativo no bem-estar se esta for de curta duração. Mas, quando se trata de stress de longa duração ou crónico, o animal pode passar à terceira fase em que a resposta neuroendócrina já tem um efeito mais amplo e duradouro sobre o indivíduo (Moberg & Mench, 2000). Neste caso, a secreção das hormonas pituitárias é alterada pelo stress, logo, todas as funções biológicas que são reguladas por elas (sistema imunitário, reprodução e metabolismo) são afetadas (Moberg & Mench, 2000). Isto porque, sob condições de stress, ocorre aumento de cortisol e corticosterona no sangue, e diminuição da secreção de prolactina, somatotropina, da hormona estimulante da tiroide e das gonadotropinas (Moberg & Mench, 2000). Por fim, a resposta imunitária é a última defesa (Moberg & Mench, 2000). O sistema imunitário é afetado direta e indiretamente pelo stress, pois o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso central alteram o sistema imunitário, como forma de resposta ao stress (Moberg & Mench, 2000).

Todas estas defesas alteram a função biológica, sendo estas que vão afetar o bem-estar animal, pois ocorre deslocação dos recursos biológicos para longe das atividades habituais do organismo, alterando o seu desenvolvimento normal (Moberg & Mench, 2000). Quando os fatores de stress são de curta duração, não há dano permanente no bem-estar, no entanto, quando o stress é prolongado, o animal pode sofrer impactos negativos a longo prazo, como lesões, saúde precária e diminutas hipóteses de sobrevivência (Moberg & Mench, 2000; Broom & Johnson, 2019).

Na produção animal, o stress crónico afeta o crescimento e a suscetibilidade às doenças, tendo, consequentemente, um impacto negativo na sustentabilidade económica e ambiental (Kumar et al., 2012; Kasper et al., 2020). No primeiro caso, como já foi mencionado, quando os animais estão sujeitos a fatores de stress, ocorre aumento dos níveis de glicocorticoides que afetam o metabolismo energético e proteico, as reações imunológicas estimulam a secreção de somatostatina, ocorrendo inibição da hormona de crescimento (Kumar et al., 2012; Broom & Johnson, 2019). Por último, o stress ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal através da libertação da hormona corticotropina ou ACTH, levando à produção de esteroides como o cortisol (Liu et al., 2017). Quando em excesso, estes esteroides podem suprimir as respostas imunitárias através da segregação de glicocorticoides, que são hormonas com propriedades

imunossupressoras e anti-inflamatórias, pois inibem a proliferação dos linfócitos e reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, enquanto aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias, respetivamente (Liu et al., 2017). Assim, com o sistema imunitário comprometido, os indivíduos têm uma suscetibilidade maior às doenças.

1.2.2. Stress nos peixes

Os peixes são animais poiquilotérmicos e, por isso, são potencialmente mais vulneráveis às alterações do meio do que os animais homeotérmicos (Moberg & Mench, 2000). Quando sujeitos a situações de stress, os peixes, assim como todos os vertebrados, respondem através de uma cascata neuroendócrina (Moberg & Mench, 2000). Na resposta ao stress de longa duração há uma perda na homeostasia do peixe, a qual permite a sobrevivência dos peixes em relação ao agente de stress (Ciji & Akhtar, 2021). Para isso, os indivíduos passam por uma fase de resistência fisiológica que pode levar à alostase (capacidade do corpo alcançar o equilíbrio por caminhos alternativos) (Moberg & Mench, 2000). Assim, para conseguir recuperar a homeostasia, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (Hanke et al., 2020), que provoca uma cascata de alterações metabólicas e endócrinas de três fases:

- A primeira fase engloba as respostas primárias (Cabanillas-Gámez et al., 2020). É ativada a produção da hormona libertadora de corticotrofina. Esta hormona vai permitir a libertação da hormona adrenocorticotrófica que é transportada no sangue até ao córtex adrenal, onde ocorre a produção de cortisol (Broom & Johnson, 2019). De seguida, o cortisol é libertado no sangue, o que vai despoletar a segunda fase (Costas et al., 2011; Cabanillas-Gámez et al., 2020);
- A segunda fase inclui várias mudanças metabólicas e fisiológicas, como o aumento dos níveis de glucose e lactato no sangue, alterações metabólicas hepáticas, maior necessidade de aminoácidos (devido a maiores necessidades energéticas ou para a síntese de compostos relacionados com o stress) e supressão da função imunológica (devido à supressão da atividade e proliferação fagocitária), diminuindo a resistência imunitária e aumentando a suscetibilidade a doenças (Costas et al., 2011; Hoseini et al., 2019; Cabanillas-Gámez et al., 2020);
- Na terceira fase todas estas mudanças são visíveis a nível do organismo completo (Costas et al., 2011; Hoseini et al., 2019; Cabanillas-Gámez et al., 2020).

Apesar destas alterações permitirem que os peixes se adaptem às novas condições, se a carga alostática for muito elevada os peixes acabam por ser negativamente afetados porque esta compensação terá um custo energético elevado que pode afetar o crescimento, desenvolvimento e reprodução (Moberg & Mench, 2000).

1.2.3. Stress em aquacultura

A aquacultura intensiva tem ganho uma importância cada vez maior pois é necessário satisfazer a grande procura mundial de peixe. No entanto, devido à utilização de antibióticos, às elevadas densidades, entre outros, para maximizar a produção, o cultivo intensivo tem implicações grandes no bem-estar do peixe e na sua suscetibilidade a doenças (Ciji & Akhtar, 2021). Tudo isto conduz a que os peixes em regime de cultivo intensivo estejam expostos a diferentes fatores de stress, como a manipulação e o transporte, as variações de temperatura, a densidade, a qualidade da água, a exposição ao ar entre outros (Costas et al., 2011; Martins et al., 2013; Cabanillas-Gámez et al., 2020). Por exemplo, o manuseamento e o transporte são eventos bastante stressantes da aquacultura porque a exposição ao ar provoca uma resposta fisiológica máxima (Ashley, 2007). Além disso, estas duas ações podem causar abrasões e remoção de escamas assim como da mucosa protetora (Ashley, 2007). Em relação à elevada densidade, esta potencia a diminuição dos níveis de oxigénio e da qualidade da água e aumenta a probabilidade de abrasão (Ashley, 2007). De modo a minimizar o impacto destes fatores, é crucial apostar em metodologias que não só promovam o bem-estar do peixe, mas, também, aumentem a sustentabilidade da aquacultura, sendo para isso extremamente importante o aumento da resiliência ao stress (Ciji & Akhtar, 2021).

1.2.4. Mitigar o stress: uso de compostos como o triptofano na dieta de peixes

Para mitigar o stress deve-se reduzir a resposta fisiológica ao stress (Ciji & Akhtar, 2021). Uma forma de se alcançar isso é através da manipulação da dieta, suplementando-a com compostos nutricionais (Ciji & Akhtar, 2021). Um desses compostos pode ser o triptofano (TRP), pois é um aminoácido que inibe a produção de superóxido, elimina radicais livres e atenua a produção de citocinas pró-inflamatórias (Martins et al., 2013; Hoseini et al., 2019). O TRP é um aminoácido essencial para os animais, sendo necessário o seu fornecimento através da dieta (Hoseini et al., 2019). Este aminoácido é usado na síntese proteica das monoaminas serotonina e melatonina. Como precursor destas duas neuro-hormonas, o TRP está envolvido na modulação do comportamento, bem-estar e na redução das respostas ao stress nos peixes (Martins et al., 2013; Hoseini et al., 2019). Além disso, os seus metabolitos têm diversos papéis

fisiológicos, como a modulação da resposta ao stress, sistema antioxidante, resposta imunitária e resposta comportamental (Hoseini et al., 2019).

A captação de TRP pelo cérebro é feita por transporte ativo, partilhando uma proteína transportadora com outros aminoácidos neutros (Martins et al., 2013). Assim, pode-se aumentar os níveis de TRP no cérebro com um aumento da razão TRP:aminoácidos neutros no plasma (Martins et al., 2013).

O aumento da absorção de TRP pelo cérebro, conduz a uma maior síntese cerebral de serotonina (Hoseini et al., 2019) (figura 2). Esta é uma monoamina neurotransmissora do sistema nervoso central que se encontra ligada às respostas ao stress, à regulação das respostas imunitárias, alimentação, domínio social e comportamento sexual (Hoseini et al., 2019; Cabanillas-Gámez et al., 2020). Além disso, esta tem a capacidade de estimular ou inibir inflamações, funcionando como imunomodulador; e é essencial para o bom funcionamento de vários órgãos e para a síntese de melatonina (Hoseini et al., 2019).

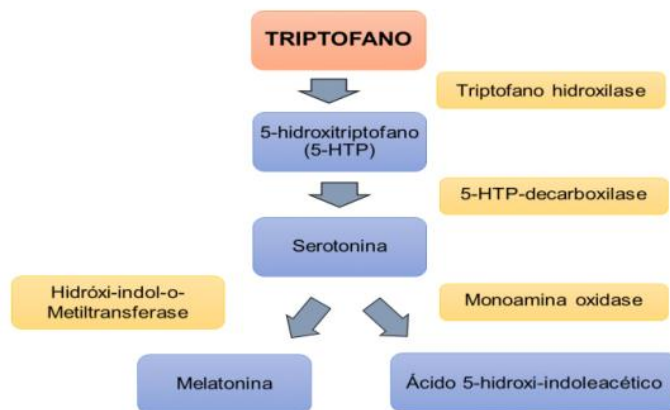


Figura 2 – Esquema da ação do triptofano (Carvalho et al., 2017)

Nos órgãos-alvo, 3 % do TRP consumido é convertido em serotonina que é convertida em melatonina, por isso, o TRP é um precursor indireto da melatonina. (Richard et al., 2009; Hoseini et al., 2019) (figura 2). Os níveis de melatonina variam conforme o ciclo circadiano, sendo que aumentam à noite, e diminuem com a luz (Hoseini et al., 2019). Nos teleósteos, a melatonina encontra-se envolvida em diversos processos fisiológicos, como na motilidade intestinal, osmorregulação, imunidade (como no desenvolvimento do timo e do baço e na modulação de respostas imunitárias inatas e adaptativas), resposta ao stress, capacidade antioxidante, ingestão de alimentos e na atividade voluntária (Hoseini et al., 2019).

1.3. Testes para avaliar o stress

Durante as últimas décadas foram desenvolvidos vários testes para a avaliação de comportamento em peixes relacionados com os níveis de ansiedade (teste *novel tank diving*, descrito por Egan et al. (2009)) e, de uma forma mais positiva, com as suas interações sociais (teste do cardume, descrito por Moretz et al. (2007)). Além desses

dois, tem-se estudado a lateralização dos peixes, através do teste de lateralização (descrito por Bisazza et al. (1998)).

Quando em ambientes novos, a resposta de algumas espécies, como zebrafish (*Danio rerio*) (Egan et al., 2009) e truta-comum (*Salmo trutta f. fario*) (Ziegler et al., 2020), é manterem-se abrigadas no fundo até se sentirem seguras (Egan et al. 2009). Com o teste *novel tank diving*, é possível obter e comparar diferentes parâmetros comportamentais, como transições para a metade superior do tanque, movimentos erráticos e crises de *freezing*, de forma a avaliar a ansiedade (Egan et al., 2009). Indivíduos com menor tempo na parte superior, maior número de movimentos erráticos e tempo de congelamento estão mais ansiosos (Egan et al., 2009). Já o teste do cardume permite perceber o comportamento dos indivíduos, de espécies sociais, quando se encontram próximos do cardume, possibilitando avaliar o stress (Moretz et al., 2007). A formação de cardume permite poupar energia durante a natação, facilita a procura de alimentos e o acasalamento e é uma estratégia anti-predatória importante, pois aumenta as hipóteses de sobrevivência face ao perigo (Maulvault et al., 2018). Por essas razões, quando stressados, os indivíduos destas espécies, como os zebrafish (*D. rerio*), dependendo se são mais ou menos ousados, têm a tendência a ficar junto de conspecíficos assegurando a sua defesa e mitigando o aumento dos níveis de stress (Moretz et al., 2007). Por último, recentemente, o teste de lateralização tem sido muito utilizado em estudos comportamentais de peixes porque está intrinsecamente envolvido na exploração do habitat, na procura de alimento e na fuga de predadores; a lateralização cerebral é a expressão assimétrica das funções cognitivas, estando relacionadas com as aptidões dos indivíduos, as quais são necessárias para satisfazer as exigências ecológicas e sociais envolvidas na seleção natural (Maulvault et al., 2018; Miletto Petrazzini et al., 2020; Roche et al., 2020). A generalidade das espécies de vertebrados tem o lado direito especializado no controlo do comportamento social, nas respostas a estímulos novos e inesperados e no processamento de informações; o lado esquerdo é especializado na categorização dos estímulos, na regulação do comportamento rotineiro e familiar e no foco dos alvos (Miletto Petrazzini et al., 2020).

Nos peixes, devido à lateralização dos seus olhos, é possível observar o seu comportamento, permitindo avaliar o grau e a direção da lateralização cerebral (Miletto Petrazzini et al., 2020). Por exemplo, quando sujeitos a estímulos ameaçadores, os peixes apresentam uma fuga rápida (reposta C-start) (Miletto Petrazzini et al., 2020). Nesta resposta, o corpo flete em forma de C para um determinado lado, sendo seguida pela viragem da cauda, permitindo que o peixe fuja (Miletto Petrazzini et al., 2020). No

caso do peixe dourado (*Carassius auratus*), indivíduos com neurónios Mauthner maiores giram para o lado esquerdo e vice-versa, daí concluir-se que a assimetria dos neurónios regula a resposta C-start (Miletto Petrazzini et al., 2020). Vários peixes teleósteos, como zebrafish (*D. rerio*) e peixes dourados (*Carassius auratus*) têm, geralmente, uma resposta C-start para o lado direito (Miletto Petrazzini et al., 2020).

A lateralização do cérebro também pode ser observada na ausência de estímulos visuais. Quando colocadas numa pista em forma de T, quatro das cinco espécies de vairões (Osteichthyes: Cyprinidae) têm preferência para viragem à direita; em tanques circulares, os indivíduos também têm tendência a nadar para o mesmo lado (Miletto Petrazzini et al., 2020). Com o teste de lateralização é possível entender quais os processos de decisão dos peixes quando se encontram sob stress.

1.4. A Corvina

1.4.1. Biologia

A corvina, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801), é uma espécie costeira (<80 m de profundidade) que se encontra distribuída em águas subtropicais desde a Noruega ao Congo, passando pelo Mar Mediterrâneo e o Mar Negro (Prista et al., 2009; González-Quirós Rafael et al., 2011). Esta tem uma grande cabeça com corpo alongado e com

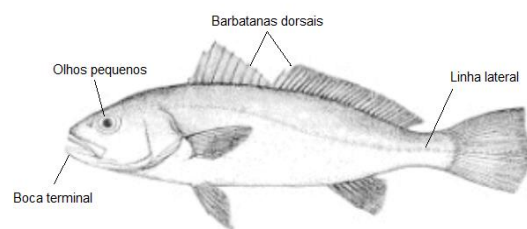


Figura 3 – Esquema da corvina (*Argyrosomus regius*) (Alteração de Monfort (2010))



Figura 4 – Fotografia de corvina (*Argyrosomus regius*) adulto

uma linha lateral evidente que se estende sobre a barbatana caudal (Monfort, 2010) (figuras 3 e 4). A sua boca encontra-se em posição terminal, tendo olhos pequenos (Monfort, 2010). Contem duas barbatanas dorsais, sendo que

a segunda é muito mais comprida que a primeira (figura 3) (Monfort, 2010). O seu corpo é cinzento-prateado, a base da barbatana é castanha avermelhada e a cavidade bucal é amarelo-dourada (figura 4) (Monfort, 2010).

Sendo uma das maiores espécies da família Sciaenidae, a corvina pode ultrapassar os 180 cm de comprimento e os 50 kg de peso (Prista et al., 2009; Monfort, 2010). O seu

crescimento é mais acelerado durante o verão, pois a melhor temperatura de crescimento situa-se acima dos 18° C (Monfort, 2010; Martínez-Llorens & Espert, 2011).

É uma espécie migratória, movendo-se conforme as mudanças da temperatura (Pollard & Bizsel, 2020). Durante a reprodução, na primavera e verão, os adultos, em cardume, entram nos estuários e pântanos salgados para desovar (Monfort, 2010; González-Quirós Rafael et al., 2011; Morales-Nin et al., 2012). Durante a época de desova, uma fêmea de 1,2 m produz cerca de 800 000 ovos (Monfort, 2010). Até ao inverno, os adultos mantêm-se junto à costa e só nessa altura regressam às águas mais profundas (Monfort, 2010).

Os juvenis mantêm-se em águas salobras durante as fases iniciais do ciclo de vida, migrando para as águas costeiras onde passam o inverno (Monfort, 2010; Ruiz-Jarabo et al., 2019). Na primavera regressam aos estuários para se alimentarem (Monfort, 2010). Os juvenis alimentam-se de pequenos peixes e crustáceos demersais, mas quando atingem os 30-40 cm, passam a alimentar-se de peixes pelágios e cefalópodes (Monfort, 2010).

Devido à elevada taxa de crescimento, à capacidade de cultivo e à qualidade do filete, a corvina é considerada uma espécie com grande interesse para a aquacultura no Mediterrâneo (Kružić et al., 2016; Mansour et al., 2017).

1.4.2. Produção desta espécie em aquacultura

Como foi dito anteriormente, a corvina tem um conjunto de características que a tornam uma boa espécie para aquacultura, principalmente por ter uma taxa de crescimento superior à da dourada (*Sparus aurata*) e do robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Kružić et al., 2016). A corvina pode atingir 0,8 kg em doze meses se as condições de cultivo forem as ideais e consegue chegar ao peso comercial em dois anos. Por outro lado, a sua carne tem um baixo teor de gordura, sendo considerada uma espécie de elevado valor nutritivo e dietético (Kružić et al., 2016; Saavedra et al., 2017). Entre 2007 e 2017, a produção aquícola desta espécie aumentou 40 vezes (Mansour et al., 2017).

A aquacultura de corvina começou nos anos 90, quando se realizaram as primeiras experiências com reprodutores selvagens da família Sciaenidae no sul de França (Monfort, 2010). A primeira produção comercial ocorreu em França no ano de 1997 (Monfort, 2010).



Figura 5 – Principais produtores de *Argyrosomus regius* em 2006 (Monfort, 2010)

Na figura 5 encontram-se marcados os maiores produtores de corvina na Europa em 2006.

A corvina de aquacultura é produzida semi-intensivamente ou intensivamente em tanques de terra ou em jaulas (Monfort, 2010).

Os alevins são colocados em tanques com cerca de 80-100 m³ com uma densidade que varia entre os 300 e os 350 peixes/m³. Estes ficam nesses tanques até atingirem 100 g, tendo uma taxa de sobrevivência de 80% (Monfort, 2010). As técnicas de engorda das corvinas são semelhantes às do robalo e da dourada (Monfort, 2010). As corvinas são colocadas em tanques com uma densidade de 50/m³, sendo alimentadas até atingirem o peso comercial de 2 a 3 kg (Monfort, 2010). Para a sua alimentação, é utilizada uma ração com 45-48 % de proteína e 20-24 % de lípidos (Monfort, 2010).

No final, e após atingirem o tamanho desejável, os indivíduos são capturados e colocados rapidamente em gelo (Monfort, 2010).

Apesar de já ser uma espécie criada em aquacultura, os protocolos de cultivo da corvina (*A. regius*) ainda não estão totalmente definidos (Monteiro et al., 2021).

1.5. Objetivos

A corvina (*A. regius*) é uma espécie com boas características para aquacultura. No entanto, esta espécie é muito sensível aos diferentes agentes de stress inerentes ao cultivo, o que pode influenciar a qualidade da sua carne e a sua sobrevivência. Tendo isso em consideração, este trabalho teve como objetivo determinar o efeito da suplementação dietética de triptofano no comportamento e fisiologia dos juvenis de corvina de aquacultura. Através de trabalhos anteriores com corvina, considera-se que a percentagem ótima de triptofano na ração de corvina deve rondar os 0,5 %. Assim, pretendeu-se comparar o efeito de dietas com diferentes teores de triptofano no comportamento e resposta ao stress.

Assim como aconteceu com Höglund et al. (2017) e Cabanillas-Gámez et al. (2020), assume-se que os peixes que consumirem ração com níveis mais elevados de triptofano terão mais resiliência ao stress (Martins et al., 2013 e Hoseini et al., 2019). Tendo isto em consideração, assume-se que no teste social, tal como disseram Moretz et al. (2007), os indivíduos que se alimentarem da ração com menor percentagem de triptofano vão ter menos resiliência ao stress e, por isso, vão ficar mais tempo junto dos conspecíficos do que os indivíduos que consumirem a ração com maior percentagem de triptofano. No teste de ansiedade, tal como ocorreu com Egan et al. (2009), os

mesmos indivíduos poderão ter um maior período de latência, passando menos tempo na metade superior e tendo movimentos mais erráticos, com aumento do comportamento de *freezing*, comparando com os indivíduos alimentados com ração com maior percentagem de triptofano.

2. Material e métodos

2.1. Ensaio e instalação experimental

Este estudo foi realizado em 2021 na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão do Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA, I.P.).

No ensaio experimental foram utilizados juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) com 112 dias e peso e comprimento iniciais de $32,6 \pm 3,4$ g e $14,4 \pm 0,5$ cm, respetivamente. Foram distribuídos equitativamente 900 peixes por nove tanques redondos de fibra de vidro com 1500 l de capacidade. O sistema dos tanques funcionava em circulação aberta de água, sem recirculação, passando a água por um filtro de papel antes de entrar nos tanques. O fluxo médio de água foi de aproximadamente 15,9 l/min, que era verificado três vezes por semana. A média dos valores de oxigénio e temperatura foi de $5,6 \pm 0,2$ mg/l e $21,4 \pm 0,2$ °C, respetivamente, e a salinidade foi de 38 ± 1 ppt. O fotoperíodo foi de 14 horas de luz e 10 horas de escuridão. De forma a assegurar que a quantidade de oxigénio não era inferior a 4 mg/l, os tanques estavam individualmente equipados com sondas de oxigénio que ativam a injeção de oxigénio para a água quando o valor mínimo acima referido é atingido. No entanto, no decorrer deste ensaio não foi necessária a injeção de oxigénio pois a densidade de peixes não era elevada e a saturação de oxigénio esteve sempre em níveis satisfatórios. Neste ensaio experimental, foram testadas, em triplicado, três dietas com diferentes níveis de suplementação de triptofano. A primeira dieta continha 0,5% de triptofano (Tript1), a segunda 0,7% (Tript2) e a terceira 0,8% (Tript3). Em relação às necessidades de triptofano estimadas para as corvinas nesta faixa etária, a primeira dieta foi formulada para estar próxima dos requisitos em triptofano para corvinas com esta idade e funcionou como controlo. As outras duas rações foram formuladas para terem níveis superiores aos requisitos da espécie. Durante o ensaio, os peixes foram alimentados manualmente, até à saciação, às 9:00, 11:30, 14:00 e 16:30. A quantidade de ração fornecida era pesada diariamente. O ensaio teve a duração de sete semanas.

As dietas foram formuladas e produzidas pela Sparos Lda. (Olhão, Portugal). Os ingredientes em pó foram misturados numa misturadora de dupla hélice e moídos duas vezes num moinho de martelos micropulverizador (SH1, Hosokawa-Alpine, Alemanha). Mais tarde, foi adicionada à mistura a fração de óleo, as dietas foram humidificadas, aglomeradas através de extrusão de baixo ritmo (Grupo Dominioni, Itália) e depois secas em forno de convecção (OP 750-UF, LTE Scientifics, Reino Unido) durante 4 h a 60°C.

As dietas foram mais tarde trituradas e peneiradas a 3 e 4 mm. A fórmula das três dietas está representada na tabela 1.

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano

Ingredientes (%)	Tript1	Tript2	Tript3
Caseína	5,0	5,0	5,0
Gelatina suína	6,0	6,0	6,0
Concentrado de proteína de soja	30,0	30,0	30,0
Concentrado de proteína de ervilha	15,0	15,0	15,0
Glúten de trigo	15,0	15,0	15,0
Amido de batata	7,0	6,6	5,6
Óleo de peixe	7,0	7,0	7,0
Óleo de colza	7,0	7,0	7,0
Lecitina de colza	2,0	2,0	2,0
Vitaminas e minerais	1,0	1,0	1,0
Vitamina C	0,1	0,1	0,1
Vitamina E	0,1	0,1	0,1
Betaína HCl	1,0	1,0	1,0
Antioxidantes	0,3	0,3	0,3
Fosfato monoamónico	2,0	2,0	2,0
L-Lisina	0,1	0,1	0,1
L-Triptofano	0,2	0,4	0,8
Composição (% DW)			
Proteínas	51,98	52,29	52,16
Lípidos	16,02	17,52	16,00
Cinzas	7,58	7,44	7,81
Energia (KJ)	23,89	24,13	24,13

2.2. Amostragem e análises bioquímicas

Na amostragem inicial, 60 peixes foram pesados e medidos individualmente, 10 peixes foram recolhidos para análise da composição proximal e a biomassa de cada tanque foi determinada pesando-se todos os peixes em conjuntos de 10. Na amostragem intermédia, realizada um mês após o início do ensaio, avaliou-se o peso e o

comprimento de 20 peixes por tanque (60 peixes por tratamento). Esta amostragem foi realizada para se avaliar o crescimento dos peixes. No final do ensaio, todos os peixes foram pesados, os 61 primeiros foram pesados individualmente e medidos enquanto os que sobraram foram pesados em conjunto. Para determinação da composição proximal dos peixes, foram recolhidos cinco peixes por tanque (15 por tratamento). Além disso, foi retirado sangue de oito peixes (24 por tratamento), metade antes e metade após a exposição a um teste de stress (30 segundos de exposição ao ar). As amostras para análise da composição proximal e do sangue foram congeladas a -20 °C.

Os peixes pesados e medidos foram sedados com 100 ppm de 2-fenoxietanol (Barata et al., 2016), enquanto os peixes usados para composição proximal e análise ao sangue foram eutanasiados com uma concentração superior de fenoxietanol. Todas as manipulações de peixes foram realizadas por cientistas formados (seguindo as recomendações da categoria B da FELASA) e conduzidas de acordo com as diretrizes europeias sobre a proteção dos animais utilizados para fins científicos (Diretiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia).

2.3. Análise química dos peixes e rações

A análise química das dietas e das carcaças foi realizada de acordo com os métodos da Associação Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 2000).

2.3.1. Matéria seca

Para determinar a matéria seca das carcaças foi necessário determinar a humidade. Para isso, as carcaças foram pesadas e colocadas a secar numa estufa a 70 °C até peso constante (cerca de 20 dias). Depois de pesadas, as carcaças foram trituradas numa picadora até se obter um produto homogéneo onde se determinou a humidade residual, matéria inorgânica, proteína, lípidos e energia.

Para determinação da humidade residual das carcaças e da humidade das dietas, pesou-se cerca de 0,5 g de amostra, em duplicado, em cadinhos de porcelana previamente limpos e secos. Os cadinhos com a amostra foram colocados na estufa a 105 °C durante 24h. Após este período, pesou-se novamente os cadinhos com as amostras e calculou-se a matéria seca através das seguintes fórmulas:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\text{peso carcaça inicial} - \text{peso carcaça final}}{\text{peso carcaça inicial}} \times 100$$

$$\text{Matéria seca (\%)} = 100 - \text{humidade (\%)}$$

2.3.2. Matéria inorgânica (cinzas)

A matéria inorgânica foi determinada através da incineração das amostras anteriores, numa mufla a 450 °C durante 16 horas. No final os cadinhos voltaram a ser pesados e a diferença entre o peso antes e depois da incineração indica a percentagem de cinzas.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso carcaça inicial} - \text{peso carcaça final}}{\text{peso carcaça inicial}} \times 100$$

2.3.3. Proteína

Para determinar a proteína utilizou-se o método de Kjeldahl (1883) modificado. Foram pesados entre 0,3 e 0,5 g de amostra para cada tubo de micro proteína aos quais se adicionou uma pastilha de Kjeldahl e 5 ml de H₂SO₄ (ácido sulfúrico). De seguida, colocaram-se os tubos no equipamento de digestão, pré-aquecido a cerca de 450 °C, durante uma hora. No final do tempo as amostras ficaram a arrefecer mais uma hora.

Após o arrefecimento, adicionaram-se 10 gotas de indicador de pH e 25 ml de ácido bórico saturado num matraz. De seguida colocaram-se os matrizes e os tubos de micro proteína no destilador que foi ligado durante três minutos e 36 segundos. Após este tempo, colocaram-se os matrizes no titulador com HCl a 0,1 N e apontou-se o volume de HCl que foi usado e realizaram-se os seguintes cálculos:

$$\text{Proteína (\%MF)} = \frac{14,007 * (\text{Volume HCl}) * 0,1}{\text{Peso amostra} * 10} * 6,25$$

$$\text{Proteína (\%MS)} = \frac{\text{Proteína (\%MF)} * 100}{\text{MS (\%)}}$$

2.3.3.1. Determinação do perfil de aminoácidos das rações

O perfil de aminoácidos das rações foi determinado de acordo com os métodos descritos em AOAC (1998a, b). Na hidrólise ácida, pesou-se cerca de 20 mg de ração em tubos de 10 ml juntamente com 3 ml de HCl 6 N com 0,1% de fenol. A hidrólise decorreu sob condições inertes durante 24 h a uma temperatura de 110–115 °C. Após este período, as amostras foram neutralizadas com 2,5 ml de NaOH 6 M, filtradas e armazenadas a -80 °C. Para quantificação da metionina e do triptofano foi realizada uma hidrólise alcalina. Utilizou-se 80 mg de ração (devido à baixa quantidade de triptofano na ração), 3 ml de NaOH 4,2 N e uma gota de 1-octanol. As amostras foram hidrolisadas sob condições inertes numa estufa a 110–115 °C durante 20 h. Após a hidrólise, as amostras foram neutralizadas com 3,5 ml de HCl 4,2 N, filtradas e armazenadas a -80 °C. A separação dos aminoácidos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent 1100 HPLC, Agilent, Palo Alto, CA), usando uma derivatização pré-coluna com o-

ftalaldeído (OPA) e 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC), uma guarda Phenomenex Gemini ODS C18 (4 mm × 3 mm) e uma coluna Phenomenex Gemini ODS C18 110Å (4,6 mm × 150 mm, 5 µm). Os eluentes e restantes condições cromatográficas estão descritas em Henderson et al. (2000). Os comprimentos de onda de deteção de UV foram definidos (338 nm e 262 nm) assim como os da fluorescência (340/450 nm e 266/305 nm). A identificação e quantificação dos aminoácidos foi avaliada por comparação com os tempos de retenção e áreas dos picos dos aminoácidos de referência (Sigma) com o software Agilent ChemStation para cromatografia líquida (Agilent, USA). A norvalina e a sarcosina foram adicionadas às amostras antes da hidrólise e usados como padrão interno (concentração final antes da injeção: 500 pmol/µL). Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

2.3.4. Lípidos

Os lípidos foram determinados utilizando-se o método de Soxhlet (1879) modificado. Sem tocar com as mãos em todo o material, colocou-se algodão no fundo dos cartuxos de celulose e colocou-se 0,8 a 1,0 g de amostra dentro do cartuxo, que depois foi tapada com mais um pouco de algodão. Os cartuxos foram encaixados no extrator de Soxhlet. Entretanto, pesaram-se os copos de recolha de lípidos nos quais se adicionaram 40 a 50 ml de éter de petróleo. De seguida os copos foram também encaixados no extrator.

Após todo o material estar no devido lugar, a máquina foi ligada, começando assim o processo de extração dos lípidos, o qual se divide em quatro fases. Na primeira fase, o cartuxo encontra-se mergulhado no éter de petróleo durante uma hora; na segunda fase, o cartuxo é retirado do éter, ficando assim durante duas horas; na terceira fase, com uma duração de 15 minutos, fecha-se a torneira de forma que o éter de petróleo não passe pelo cartuxo; por fim, na quarta fase, liga-se a ventoinha durante 10 minutos.

Após este processo, os copos são colocados 30 minutos na estufa, de seguida, 15 minutos a secar no exsiccador e no fim pesados.

Para determinação lipídica foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Lípidos (\%MF)} = \frac{\text{Peso lípidos final}}{\text{Peso amostra}} * 100$$

$$\text{Lípidos (\%MS)} = \frac{\text{Lípidos (\%MF)} * 100}{\text{MS\%}}$$

2.3.5. Energia

A energia bruta foi determinada por combustão direta em um calorímetro de bomba adiabática (PARR Instruments, Moline, IL, USA; PARR model 1261).

Começou-se por ligar o calorímetro. Entretanto a pastilha da amostra foi preparada na prensa e, depois pesada e colocada no cadinho metálico. A seguir, cortou-se 10 cm de fusível, o qual foi preso aos elétrodos da bomba e colocado em contacto com a pastilha (sempre com cuidado para que este não saísse da posição). Após posicionamento do fusível, fechou-se a bomba e adaptou-se o nível de oxigénio. Após a bomba estar preparada, encheu-se o balde com 2 l de água desionizada, inserindo-o dentro do calorímetro e, por fim, colocou-se a bomba dentro do balde. Depois de se fechar o calorímetro, começou-se o procedimento. Quando este chegou ao fim obteve-se o valor de energia bruta em Kcal/g. Para obtenção da energia bruta em KJ/g utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Energia (KJ/g MF)} = \text{Energia (Kcal/g)} * 4,184 * 0,001$$

2.4. Análises ao sangue

2.4.1. Análise aos níveis de glucose

Para fazer a análise da glucose foi usado o kit de análises clínicas para determinação de glucose (ref.998660 QCA). Inicialmente preparou-se a reta de calibração. Para isso foram preparados e identificados cinco tubos eppendorfs de acordo com os seguintes valores:

Eppendorf	0	1	2	3	4
Concentração glucose (mg/dl)	0	25	50	75	100
Solução padrão de glucose 10mg/dl (µl)	0	12,5	25	37,5	50
H ₂ O (µl)	50	37,5	25	12,5	0

Enquanto isso, as amostras de plasma descongelaram em gelo, onde foram mantidas durante todo o procedimento. Após descongelarem, as amostras foram agitadas no vortex, pipetando-se, em duplicado, 10 µl de cada padrão e das amostras para a microplaca. No final pipetou-se 200 µl do reagente para cada poço e deixou-se a incubar durante 5 minutos a 37 °C.

Após a incubação leu-se a absorvância da microplaca a 340 nm no leitor de microplacas.

2.4.2. Análise aos níveis de lactato

Para a análise do lactato usou-se o kit de análises clínicas para determinação de lactato (ref.1001330 SPINREACT). Inicialmente preparou-se o reagente do kit, adicionando-se 10 ml da solução R1 ao frasco da enzima R2. O passo seguinte foi a preparação da reta de calibração. Assim como na análise da glucose, também foram preparados e identificados 5 tubos eppendorf, mas neste caso seguiu-se a seguinte tabela:

EPPENDORF	0	1	2	3	4
Concentração lactato (mg/dl)	0	2,5	5	7,5	10
Solução padrão de lactato 10mg/dl (µl)	0	12,5	25	37,5	50
H2O (µl)	50	37,5	25	12,5	0

Ao contrário da análise à glucose, foi necessário fazer diluição das amostras, utilizando-se uma solução de NaCl a 0,9 %. O fator de diluição da maioria das amostras foi de 1:4, mas também houve de 1:2, 1:5 e 1:6. Após a diluição, as amostras foram agitadas no vortex e pipetou-se, em duplicado, 10 µl de cada padrão e das amostras para a microplaca, adicionando-se 200 µl de reagente em cada poço. Após a adição do reagente, a microplaca ficou a incubar durante 5 minutos a 37 °C.

No final leu-se a absorvância da microplaca a 505 nm no leitor de microplacas.

2.4.3. Análise aos níveis de hemoglobina

Para a análise da hemoglobina utilizou-se o kit de análises clínicas para determinação de hemoglobina (ref.1001239 SPINREACT). Assim como na análise anterior, começou por se preparar o reagente do kit. Para obter 250 ml misturou-se muito bem um frasco de reagente com 245 ml de água destilada. Após a obtenção do reagente começou-se a preparação das amostras. Para isso colocou-se 2,5 ml de reagente em tubos de 5 ml e juntou-se 10 µl de cada amostra aos tubos, homogeneizando-se no vortex. Após ficar 3 minutos a incubar, foram pipetados, em duplicado, para a placa 300 µl da solução e 300 µl do reagente (branco).

No final a absorvância foi lida a 540 nm no leitor de microplacas.

2.4.4. Hematócrito

Para a realização do hematócrito começou por se encher 3/4 do capilar com sangue, tapando-o com plasticina. De seguida, colocou-se os capilares com sangue no rotor de hematócrito da centrífugadora, durante 5 minutos a 10000 rpm.

Após a centrifugação, mediu-se com uma régua o comprimento total do hematócrito, o comprimento da zona das células vermelhas, e o comprimento da *buffy coat* que corresponde às células do sistema imunitário.

2.5. Testes de stress e comportamento

Para avaliar os diferentes níveis de stress dos peixes foram realizados três testes: o teste *novel tank diving* (ou teste de ansiedade), o teste do cardume (ou teste de socialização) e o teste da lateralização, tendo por base os trabalhos realizados por Egan et al. (2009), Moretz et al. (2007) e Bisazza et al. (1998), sendo que os dois primeiros sofreram algumas alterações. Esta foi das primeiras vezes que estes testes foram aplicados a peixes de cultivo num ensaio de nutrição.

Em cada um dos testes, foram utilizados peixes em jejum há 12 horas. A água utilizada nos tanques onde os testes decorreram estava à mesma temperatura que a água do ensaio para facilitar a aclimação. Foram avaliados quatro peixes por tanque (12 por tratamento), intercalando-se os tratamentos para minimizar a variabilidade metabólica que ocorre ao longo do dia. Cada peixe teve cinco minutos de adaptação após ser colocado no novo tanque.

O teste da ansiedade e o da socialização foram realizados no mesmo tanque (tanque retangular de fibra de vidro, com 120 x 36 x 72 cm) (figura 6) e foram gravados para posterior avaliação (foram colocadas duas câmaras, uma dentro do tanque e outra por cima, para possibilitar a observação mais completa possível do tanque); o teste da lateralização foi realizado noutro tanque (também de fibra de vidro, mas com 240 x 36 x 72 cm) e foi avaliado diretamente (figura 7).

2.5.1. Teste Novel tank diving e teste do cardume

No primeiro tanque, de 240 l de capacidade, isolou-se a extremidade direita (45 x 36 x 72 cm) com uma placa de acrílico transparente para colocar um cardume de seis peixes (da mesma espécie e de tamanho semelhante ao peixe testado). O peixe testado foi colocado na zona restante. Para evitar um contacto visual prévio entre o peixe teste e o cardume tapou-se o acrílico com uma placa opaca. Para o teste da ansiedade, o tanque foi dividido em quatro quadrantes (dois superior e inferior e dois esquerda e

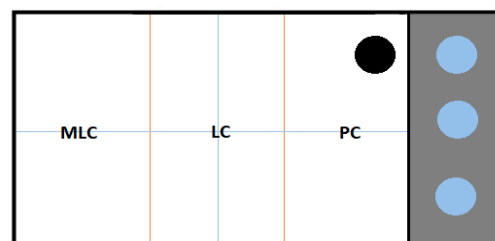


Figura 6 – Esquema tanque 1 visto de cima; linhas a laranja – divisão das três zonas do teste da socialização; linhas a azul – divisão dos quatro quadrantes do teste da ansiedade; círculo preto representa o indivíduo teste e círculos azuis representam os indivíduos do cardume

direita), utilizando-se dois fios (figura 6). Para o teste da socialização desenhou-se no fundo do tanque, com um marcador, duas linhas para o dividir em três zonas (perto do cardume (PC), longe do cardume (LC) e muito longe do cardume (MLC)) (figura 6).

No teste de ansiedade, os peixes foram transportados com uma rede, entre o balde de transição e o tanque de teste, iniciando a contagem do tempo de adaptação logo de seguida. Após os 5 minutos de adaptação, o teste inicia-se com uma duração de 5 minutos. Aí foi avaliado o número de transições verticais e horizontais, o tempo passado nos quadrantes superiores e inferiores, o número e tempo de *freezing* (tempo em que o peixe não se mexeu) e o número de impulsos (movimentos erráticos pontuais).

Uma vez terminado o teste de ansiedade, prosseguiu-se de imediato para o teste de socialização (figura 6), tendo sido retirada a placa acrílica opaca, permitindo que o peixe tivesse total visualização do cardume. Neste teste, foi avaliado o tempo antes da primeira aproximação ao cardume, o tempo total perto e longe do cardume, o número de transições entre divisões em direção, ou para longe, do cardume, o número de toques no acrílico e o número e tempo de *freezing*. O teste foi concluído após 5 minutos.

2.5.2. Teste da lateralização

O teste de lateralização foi realizado num tanque de 480 l de capacidade com um corredor com cerca de 20 cm de largura, e duas barreiras, uma em cada extremidade (figura 7). Os peixes foram transferidos à mão para dentro do tanque, utilizando um pano sobre os olhos (máximo de 5 segundos fora de água). Cada peixe foi colocado no centro do corredor, que estava

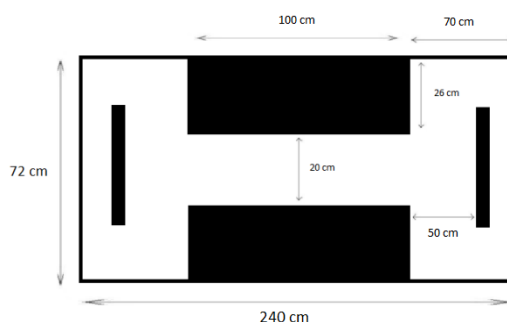


Figura 7 – Esquema do tanque para o teste da lateralização (vista superior)

fechado com duas grelhas, durante 5 minutos (tempo de aclimação). De seguida, com as grelhas retiradas, o animal é obrigado a nadar em frente até atingir o obstáculo, tendo que escolher virar à esquerda ou à direita. Após a primeira escolha, cada animal foi obrigado a voltar para o corredor e ir até à outra extremidade, onde voltou a escolher. Foram realizadas dez corridas por peixe e o lado escolhido foi apontado num quadro. No final do teste, foi calculado o índice relativo (LR) para cada peixe de acordo com Bisazza et al. (1998):

$$L_R = \frac{n^{\circ} \text{ viradas à direita} - n^{\circ} \text{ viradas à esquerda}}{n^{\circ} \text{ viradas à direita} + n^{\circ} \text{ viradas à esquerda}} \times 100$$

em que valores próximos de 100 representam peixes que viraram à direita na maioria das 10 corridas, valores próximos de -100 representam peixes que viraram mais vezes à esquerda e valores próximos de zero representam peixes que tiveram uma preferência semelhante entre esquerda e direita.

2.6. Análise estatística

Utilizou-se o teste de Levene para se verificar a homogeneidade dos dados. Para se testar as diferenças nos parâmetros do plasma, antes e depois da realização do teste de stress, utilizou-se uma ANOVA dupla, em que a dieta e o pré e pós-teste de stress foram consideradas as variáveis independentes. Para a análise dos resultados entre pré e pós-stress dos três tratamentos do lactato, uma vez que não cumpriam os pressupostos da ANOVA paramétrica, realizou-se o teste Kruskal-Wallis. Para os outros parâmetros analisados, como os testes social e de ansiedade, foi realizada uma ANOVA simples, sendo a dieta a variável independente. Quando os valores eram significativos ($p < 0,05$), procedeu-se à comparação de médias utilizando o teste de Tukey e, no caso dos parâmetros do plasma, o teste Newman-Keuls. Os dados que não cumpriam os requisitos de normalidade, como a composição proximal, foram submetidos a testes não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando as diferenças eram significativas ($p < 0,05$), realizava-se comparações por método *pairwise* (Mann-Whitney). Para os resultados do teste de lateralização foi usado o teste chi quadrado para amostras independentes.

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SPSS (IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp).

3. Resultados

3.1. Perfil de aminoácidos das rações

Como se pode observar na tabela 2, a suplementação de triptofano foi eficiente. Esta suplementação afetou as percentagens de outros aminoácidos como é o caso do aspartato, serina, treonina, taurina, valina, fenilalanina, isoleucina, hidroxiprolina e prolina. Verificou-se também que Tript2 tem maior percentagem de aspartato, serina, treonina, valina, fenilalanina, isoleucina, hidroxiprolina e prolina, enquanto que Tript1 tem maior percentagem de taurina.

Tabela 2 – Perfil de aminoácidos das rações Trip1 - com 0,5 % de triptofano, Trip2 - com 0,7 % de triptofano e Trip3 - com 0,8 % de triptofano, fornecidas a juvenis de corvina (*Argyrosomus regius*) Os valores são médias $\pm$ erro padrão. ASP - aspartato; GLU - glutamato; SER - serina; HIS - histidina; GLY - glicina; THR - treonina; ARG - arginina; ALA - alanina; TAU - taurina; TYR - tirosina; VAL - valina; MET – metionina; TRP – triptofano; PHE - fenilalanina; ILE - isoleucina; LEU - leucina; LYS - lisina; HYP - hidroxiprolina; PRO - prolina

Aminoácidos (g/100 g)	Tript1	Tript2	Tript3
ASP	2,71 $\pm$ 0,01	2,94 $\pm$ 0,01	2,86 $\pm$ 0,02
GLU	8,12 $\pm$ 0,02	8,74 $\pm$ 0,01	8,56 $\pm$ 0,08
SER	2,00 $\pm$ 0,01	2,14 $\pm$ 0,01	2,10 $\pm$ 0,02
HIS	0,65 $\pm$ 0,004	0,74 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,02
GLY	3,35 $\pm$ 0,02	3,40 $\pm$ 0,04	3,14 $\pm$ 0,04
THR	2,13 $\pm$ 0,01	2,30 $\pm$ 0,004	2,22 $\pm$ 0,02
ARG	2,11 $\pm$ 0,01	2,27 $\pm$ 0,01	2,16 $\pm$ 0,02
ALA	3,21 $\pm$ 0,003	3,36 $\pm$ 0,01	3,19 $\pm$ 0,03
TAU	2,50 $\pm$ 0,01	2,33 $\pm$ 0,01	2,23 $\pm$ 0,01
TYR	1,45 $\pm$ 0,01	1,55 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,02
VAL	1,58 $\pm$ 0,002	1,67 $\pm$ 0,004	1,57 $\pm$ 0,01
MET	0,70 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,003
TRP	0,51 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,002	0,84 $\pm$ 0,01
PHE	1,88 $\pm$ 0,002	2,03 $\pm$ 0,004	1,98 $\pm$ 0,02
ILE	1,26 $\pm$ 0,001	1,36 $\pm$ 0,002	1,32 $\pm$ 0,01
LEU	3,95 $\pm$ 0,004	4,32 $\pm$ 0,02	4,16 $\pm$ 0,04
LYS	0,45 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01
HYP	0,88 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01
PRO	3,97 $\pm$ 0,02	4,35 $\pm$ 0,02	4,11 $\pm$ 0,04

3.2. Crescimento e eficiência de utilização das dietas

Na tabela 3 estão representados os parâmetros de crescimento e utilização das dietas. No início do ensaio, os peixes tinham todos tamanhos semelhantes de forma a garantir

a homogeneidade dos juvenis utilizados. Em todos os tratamentos os indivíduos tiveram um aumento de peso semelhante, pelo que não ocorreu diferenças significativas entre eles. Os outros parâmetros de crescimento mantiveram a tendência, ou seja, o crescimento e o aumento da biomassa foi semelhante entre tratamentos, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Nos três parâmetros de utilização da ração (SGR, FCR e PER), os indivíduos dos diferentes tratamentos tiveram valores semelhantes, pelo que não houve diferenças significativas entre eles.

Tabela 3 – Crescimento e eficiência de utilização do alimento de *Argyrosomus regius* alimentada com as dietas durante os 56 dias e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano; SGR - taxa de crescimento específico; FCR - taxa de conversão alimentar; PER - rácio de eficiência proteica

Tratamento	Tript1	Tript2	Tript3
Peso inicial médio (g)	32,59 ± 0,06	32,59 ± 0,06	32,59 ± 0,06
Peso final (g)	61,6 ± 1,06	63,5 ± 0,28	64,3 ± 0,60
Comprimento inicial médio (cm)	14,40 ± 0,01	14,40 ± 0,01	14,40 ± 0,01
Comprimento final (cm)	18,5 ± 0,10	18,6 ± 0,02	18,5 ± 0,04
Biomassa inicial	3325,4 ± 0,84	3320,2 ± 0,59	3314,7 ± 2,90
Biomassa final	5878,6 ± 128,70	6077,9 ± 32,56	6071,2 ± 126,63
Ração Consumida (g)	3032,9 ± 93,81	3070,8 ± 37,17	3013,6 ± 60,37
SGR	1,1 ± 0,03	1,2 ± 0,01	1,2 ± 0,02
FCR	1,2 ± 0,03	1,1 ± 0,01	1,1 ± 0,03
PER	1,6 ± 0,04	1,7 ± 0,01	1,7 ± 0,05

3.3. Composição proximal dos peixes

Após o final do ensaio realizou-se uma análise química aos peixes para obtermos a percentagem de proteína e lípidos por matéria fresca, a quantidade de energia por matéria fresca e a percentagem de matéria seca e cinzas. Na tabela 4 temos representados os valores desses parâmetros.

A análise das carcaças indicou níveis de proteína de aproximadamente 15 % (matéria fresca) enquanto que os níveis de lípidos foi cerca de 4,7 %. A percentagem de matéria seca foi à volta de 25 % e a de cinzas cerca de 15 %. A energia da carcaça foi calculada em aproximadamente 5,6 KJ/ g. Não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos para nenhum destes parâmetros.

Tabela 4 – Composição das carcaças de *Argyrosomus regius* e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano;

Tratamento	Tript1	Tript2	Tript3
Proteína (%MF)	15,70 ± 0,03	15,42 ± 0,21	15,40 ± 0,13
Lípidos (%MF)	4,85 ± 0,11	4,70 ± 0,21	4,62 ± 0,13
% Matéria seca	24,92 ± 0,06	25,05 ± 0,17	24,76 ± 0,08
% Cinzas	15,13 ± 0,15	16,14 ± 0,22	14,52 ± 0,07
Energia KJ/g (MF)	5,62 ± 0,01	5,62 ± 0,03	5,55 ± 0,03

3.4. Análises ao sangue

Para sabermos como os diferentes valores de triptofano afetaram os níveis de stress dos indivíduos foi necessário realizar análises ao sangue de forma a obtermos os valores dos níveis de glucose, lactato e de hemoglobina, assim como do hematócrito. Na tabela 5 temos representados os valores de cada um dos parâmetros referidos anteriormente, assim como as diferenças significativas entre tratamentos antes e após o teste de stress.

Tabela 5 – Valores das análises ao sangue de *Argyrosomus regius* e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano; HTC - hematócrito; Glu - glucose; Hgb – hemoglobina; letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05)

Tratamento	Tript1		Tript2		Tript3	
Stress	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
HTC (%)	20,35 ± 0,20	20,26 ± 0,14	19,82 ± 0,20	20,26 ± 0,17	20,33 ± 0,24	18,81 ± 0,11
Glu (mg/dl)	63,87 ± 0,99 _a	76,68 ± 0,74 _b	63,42 ± 0,78 _a	74,07 ± 0,98 _{ab}	63,50 ± 0,78 _{ac}	73,16 ± 0,68 _c
Lactato (mg/dl)	3,49 ± 0,10 _a	1,76 ± 0,03 _b	3,11 ± 0,08 _a	1,55 ± 0,03 _b	3,05 ± 0,10 _a	1,57 ± 0,04 _b
Hgb (g/dl)	2,86 ± 0,04 _a	1,90 ± 0,04 _b	2,73 ± 0,05 _a	2,95 ± 0,06 _a	2,89 ± 0,07 _a	2,42 ± 0,05 _{ab}

3.4.1. Níveis de glucose

Para os níveis de glucose no sangue, não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos pós e pré-stress (tabela 5 e figura 8). No entanto, quando se comparou a interação entre dietas e efeito pré e pós-stress, observou-se diferenças significativas entre o tratamento Tript1 pré-stress e o tratamento Tript3 pós-stress e entre o tratamento Tript1 pós-stress e os tratamentos Tript2 e 3 pré-stress (tabela 5 e figura 8).

Em relação ao pré e pós-stress, para o tratamento Tript1, foram observadas diferenças significativas no nível de glucose antes e depois dos peixes serem submetidos ao teste ($p<0,05$) (tabela 5 e figura 8).

3.4.2. Níveis de lactato

Para os níveis de lactato no sangue não houve diferenças entre tratamentos (tabela 5 e figura 9). No entanto, os níveis de lactato antes e depois do teste de stress foram significativamente diferentes para todos os tratamentos ($p<0,05$) (tabela 5 e figura 9).

3.4.3. Níveis hemoglobina

Não foram observadas diferenças significativas para os níveis de hemoglobina entre os três tratamentos no pré-stress (tabela 5 e figura 10). No entanto, o tratamento Tript1, registou diferenças significativas antes e depois dos indivíduos serem submetidos ao teste de stress ($p<0,05$) (tabela 5 e figura 10) e, entre o tratamento Tript1 pós-stress e o tratamento Tript2, pré e pós-stress, e o tratamento Tript3 pré-stress.

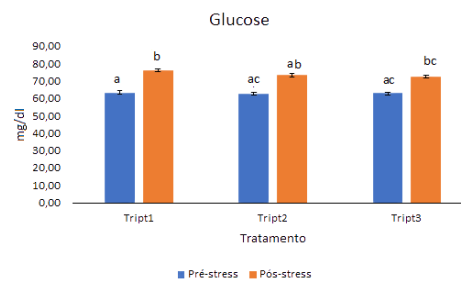


Figura 8 – Quantidade de glucose presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p<0,05$)

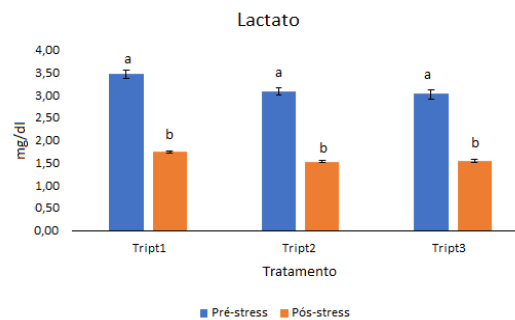


Figura 9 – Quantidade de lactato presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p<0,05$)

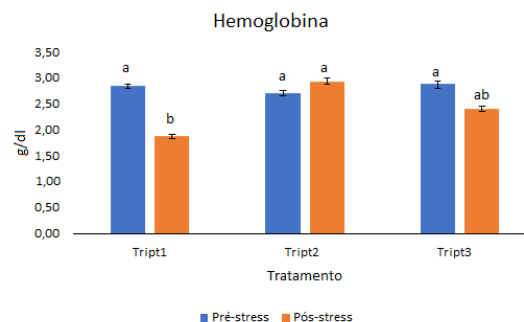


Figura 10 – Quantidade de hemoglobina presente nas corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Letras diferentes significam diferenças significativas ($p<0,05$)

3.5. Teste Novel tank diving, teste do cardume e teste de lateralização

Para avaliar os efeitos das diferentes rações sobre os níveis de stress realizaram-se três testes: o teste *novel tank diving* (ou teste de ansiedade), o teste do cardume (ou teste de socialização) e o teste de lateralização.

3.5.1. Teste *novel tank diving*

Neste teste foram avaliados o número de transições totais, o tempo na metade inferior, o número e tempo de *freezing* e o número de impulsos. Os resultados obtidos estão representados na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos no teste de ansiedade de *Argyrosomus regius* e erro padrão Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano

Tratamento	Tript1	Tript2	Tript3
Transições totais	53,90 ± 2,46	56,98 ± 2,95	72,72 ± 3,80
Tempo na metade inferior (%)	60,40 ± 2,74	68,50 ± 2,02	57,89 ± 2,84
Número de <i>freezing</i> /300 s	4,20 ± 0,33	3,47 ± 0,24	0,75 ± 0,10
Tempo de <i>freezing</i> (%)	22,30 ± 2,55	15,91 ± 1,40	0,71 ± 0,13
Número de impulsos/ 300 s	0,70 ± 0,11	0,33 ± 0,04	0,67 ± 0,12

A tabela 6 mostra que não houve diferenças significativas nos critérios testados. Apesar de não haver diferenças significativas no tratamento geral, o teste *post hoc* demonstrou diferenças significativas entre o tratamento Tript1 e Tript3 no número de *freezing* (figura 11).

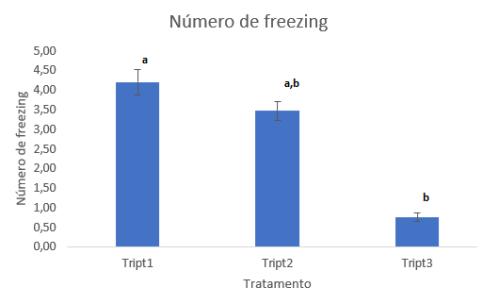


Figura 11 – Número de atos de *freezing* das corvinas juvenis do tratamento Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão. Cada letra diferente representa diferenças significativas ($p < 0,05$) entre tratamentos

3.5.2. Teste do cardume

No teste social, foi avaliado o tempo antes da primeira aproximação ao cardume, o tempo passado próximo ao cardume, o número de transições para longe e em direção ao cardume, o número de toques no acrílico e a quantidade e tempo de *freezing*. Na tabela 7 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 7 – Resultados teste social realizado a *Argyrosomus regius* e erro padrão; Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano

Tratamento	Tript1	Tript2	Tript3
Tempo antes da 1ª aproximação ao cardume/300 s	0,4 ± 0,23	0,2 ± 0,15	2,2 ± 0,83
Tempo perto do cardume (após 1ª aproximação) (%)	81,1 ± 3,46	86,5 ± 3,61	86,2 ± 2,64
Transições totais	17,0 ± 2,93	14,1 ± 3,71	15,7 ± 4,06
Toques no acrílico/ 300 s	18,6 ± 2,55	23,8 ± 3,12	24,0 ± 1,44
Número de freezing/ 300 s	5,4 ± 1,58	3,8 ± 1,06	4,1 ± 0,94
Log (tempo freezing)	1,0 ± 0,19	0,8 ± 0,23	1,0 ± 0,19

Através da análise dos resultados verificou-se que as diferenças entre tratamentos não são significativas (tabela 7).

3.5.3. Teste de lateralização

No teste de lateralização foi avaliado o lado que os peixes têm tendência a escolher quando encontram um obstáculo. Para isso utilizou-se o índice de lateralização relativo.

Tabela 8 – Resultados do teste de lateralização realizado a *Argyrosomus regius* e erro padrão; Tript1 - tratamento com 0,5 % de triptofano; Tript2 - tratamento com 0,7 % de triptofano; Tript3 - tratamento com 0,8 % de triptofano

Tratamento	Tript1	Tript2	Tript3
Índice de lateralização relativo (Lr)	18,3 ± 3,08	-11,7 ± 4,22	0 ± 3,54

Através da análise dos resultados verificou-se não haver diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 8).

4. Discussão

Em aquacultura, a manipulação, o transporte, e outras tarefas frequentes nesta indústria, são agentes de stress nos peixes (Martins et al., 2013; Cabanillas-Gámez et al., 2020). Este stress afeta negativamente o crescimento, a resistência a doenças (Kumar et al., 2012) e até a qualidade do filete. Para mitigar estes efeitos negativos, é fundamental a criação de protocolos de forma a que a resiliência ao stress e o bem-estar dos peixes seja maximizado. Existem formas de se alcançar este objetivo, sendo uma delas a suplementação de rações com substâncias que fortalecem o sistema imunitário ou a resistência ao stress (Ciji & Akhtar, 2021). Neste trabalho, as dietas fornecidas a corvinas juvenis foram suplementadas com diferentes quantidades de triptofano, de forma a avaliar se este aminoácido influenciava a resposta ao stress nestes peixes. A dieta 1 tinha um nível de triptofano aproximado do requisito para corvinas desta idade, enquanto que as outras duas dietas tinham níveis superiores ao requisito.

4.1. Perfil de aminoácidos da ração

A suplementação do triptofano nas dietas de corvinas juvenis foi eficiente, havendo uma ração, Tript1 que apresentava um nível de triptofano correspondente ao requisito estimado desta espécie para esta idade. Crescimento e eficiência de utilização das dietas

Os diferentes teores de triptofano não afetaram significativamente o crescimento, pois o peso, o comprimento e a biomassa final foram semelhantes entre os três tratamentos. O que é consistente com os resultados obtidos para o SGR, o FCR e o PER, que também não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. Os resultados obtidos neste estudo para estes parâmetros estão de acordo com os publicados para juvenis da mesma espécie (Saavedra et al., 2020; 2022; Herrera et al., 2020). Em comparação com Saavedra et al. (2020; 2022), a diferença mais acentuada foi observada no crescimento dos juvenis, que foi inferior no trabalho presente, possivelmente porque a temperatura era mais baixa e o tamanho inicial dos peixes era superior (a taxa de crescimento é superior nas fases iniciais do ciclo de vida e vai diminuindo à medida que o peixe vai crescendo). Como este trabalho foi realizado nos meses de Outono a temperatura da água não permitiu maximizar o crescimento da corvina, mesmo com o aquecimento da água. O crescimento foi muito semelhante ao apresentado por Herrera et al., 2020 que utilizou a mesma espécie na mesma fase do ciclo de vida. Em relação à suplementação de triptofano, Miao et al. (2021), utilizando

juvenis de *Channa argus*, e Sharf & Khan, (2022), utilizando juvenis de *Channa punctatus*, obtiveram diferenças significativas no crescimento, o que não se verificou no presente estudo, o que pode ter resultado de não ter havido nenhum tratamento com deficiência em triptofano. Em Miao et al. (2021) houve aumento significativo do crescimento até ao tratamento com 0,3 % de triptofano, com 0,4 % este manteve-se, no entanto, com 0,5 % houve diminuição; Sharf & Khan, (2022) obtiveram um aumento do crescimento até 4,7 g kg⁻¹ de triptofano, sendo que a partir das concentrações mais elevadas o crescimento diminuiu. Isto demonstra que os efeitos de TRP no crescimento dependem das espécies de peixe e do nível de TRP (Hoseini et al., 2019).

4.2. Análise química dos peixes

Uma vez que a composição das dietas variava apenas no conteúdo de triptofano, que já de si estava presente em percentagens abaixo de 1 %, não era expectável uma alteração significativa na composição da carcaça. Isso foi verificado para todos os parâmetros. Vários estudos demonstram os efeitos do triptofano dietético na composição da carcaça, e os resultados obtidos são variáveis. Com juvenis de truta arco-íris (*O. mykiss*), Hoseini et al. (2020) não obtiveram diferenças significativas nos diferentes parâmetros. Com *Channa punctatus*, Sharf & Khan, (2022) obtiveram um aumento do teor de lípidos e proteína e diminuição do teor de humidade em dietas com 4,7 g kg⁻¹ de triptofano, enquanto que o teor de cinzas se manteve constante. Os níveis de energia das carcaças também foram semelhantes entre os tratamentos, o que está de acordo com os níveis de lípidos. De todas as formas, os resultados obtidos na composição proximal são semelhantes aos reportados por outros estudos para juvenis de corvina (Saavedra et al., 2020; 2022).

4.3. Análises ao sangue

Em relação aos parâmetros sanguíneos, as diferentes percentagens de triptofano na dieta não provocaram diferenças significativas entre tratamentos. No entanto, quando os peixes foram submetidos a um teste de stress, que consistia na exposição ao ar durante 30 segundos, verificou-se, para os níveis de glucose e de hemoglobina, que estes aumentaram e diminuíram, respetivamente, no tratamento Tript1; no entanto, o nível de lactato diminuiu em todos os tratamentos. Além disso, para a glucose, houve diferenças significativas entre o tratamento Tript1 pré e pós-stress e os tratamentos Tript3 pós-stress e Tript2 e 3 pré-stress, respetivamente. No caso da hemoglobina, houve diferenças significativas entre o tratamento Tript1 pós-stress e os tratamentos Tript2 pré e pós-stress e Tript3 pré-stress.

Em relação ao hematócrito e nível de glucose e lactato, Saavedra et al, (2020) também não obteve diferenças significativas entre tratamentos. No entanto, os níveis de glucose e lactato após o teste de stress em Saavedra et al, (2020) foram muito superiores aos obtidos neste trabalho. Em relação aos níveis de hemoglobina, Kpundeh et al. (2013), utilizando juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) também obteve uma diminuição nos seus valores. Kpundeh et al. (2013) verificou que à medida que aumentava a densidade de povoamento (maior nível de stress), o valor de hemoglobina diminuía. No caso deste trabalho, o valor de hemoglobina diminuiu apenas no tratamento Tript1 e foi semelhante nos outros tratamentos, o que sugere que a suplementação de triptofano pode ter tido um efeito positivo neste parâmetro e que o triptofano pode afetar a resposta endocrina ao stress (Cabanillas-Gámez et al., 2020).

Os parâmetros hematológicos, como a hemoglobina e o hematócrito, aumentam em condições de stress, principalmente oxidativo, devido ao aumento da exigência de oxigénio (Hoseini et al., 2020). Tal como aconteceu neste trabalho, também Hoseini et al. (2020), utilizando juvenis de truta arco-íris (*O. mykiss*), obteve resultados semelhantes na situação de stress, não tendo sido afetado pelo teor de triptofano. No entanto, na situação de menor stress, os peixes alimentados com ração com teor intermédio de triptofano tiveram um hematócrito superior aos outros dois tratamentos. Neste estudo, a percentagem de triptofano das rações situava-se entre os tratamentos intermédio e superior de Hoseini et al. (2020), o que poderia justificar a ausência de diferenças significativas na situação de pré-stress, uma vez que não houve nenhum tratamento com deficiência em triptofano. No entanto, a ausência de diferenças significativas entre as situações de pré e pós-stress pode significar que os diferentes teores de triptofano usados afetaram a resposta endocrina ao stress. Por outro lado, em Hoseini et al. (2020) o nível de hemoglobina foi semelhante para a interação de todos os tratamentos com as diferentes situações de stress. No entanto, quando analisados individualmente, o tratamento com teor intermédio de triptofano levou ao aumento do nível de hemoglobina. Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, uma vez que, na situação pré-stress, não houve diferenças entre tratamentos. Porém, o tratamento Tript1 levou à redução do nível de hemoglobina no pós-stress. Esta diferença pode estar relacionada com o tipo de stress a que os peixes estiveram sujeitos. Em Hoseini et al. (2020), os indivíduos estiveram em situação de stress prolongado, enquanto que neste trabalho o tempo de stress foi curto (Herrera et al., 2020). Na resposta primária ao stress, ocorre produção de cortisol que induz a resposta secundária ao stress. Aí, vai ocorrer o aumento do nível de glucose e a sua mobilização

para os tecidos onde ocorrem processos de restauração que exijam energia (Abdel-Tawwab, 2012; Cabanillas-Gámez et al., 2020; Monteiro et al., 2021). Isto é consistente com os resultados obtidos neste estudo e coincidentes com aqueles reportados por Saavedra et al. (2020), Abdel-Tawwab (2012) [Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* (L.)) e Hoseini et al. (2016) (Esturção (*Acipenser persicus*))]. Assim como aconteceu com Herrera et al. (2020), também se esperava que um maior teor de triptofano nas rações pudesse diminuir os níveis de glucose no sangue ou, como aconteceu com Hoseini et al. (2020), que permitisse que os níveis de glucose fossem semelhantes entre as situações de pré e pós-stress, o que aconteceu para os tratamentos Tript2 e 3.

Em relação ao lactato, sabe-se que este é um produto do catabolismo anaeróbio da glucose (Hoseini et al., 2020). Quando em stress, ocorre uma maior atividade respiratória no músculo sob condições anaeróbias, o que promove o aumento dos níveis de lactato no sangue (Monteiro et al., 2021). Quando o peixe está exposto ao ar, a respiração anaeróbia aumenta, logo é esperado um aumento dos níveis de lactato. Neste estudo, ocorreu o oposto e os resultados diferem dos reportados por Saavedra et al. (2020), onde se obteve um aumento do lactato após corvinas juvenis terem sido sujeitas a um teste de stress semelhante. Por outro lado, Herrera et al. (2020) tiveram resultados semelhantes aos deste trabalho. Na situação de stress reduzido, os níveis de lactato no sangue foram semelhantes entre o controlo e o tratamento. Na situação de maior stress, com o tratamento, ocorreu diminuição do nível de lactato no sangue. Neste trabalho não houve diferenças significativas entre tratamentos na situação de pré-stress, no entanto, contrariamente com o que aconteceu com Herrera et al. (2020), também não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos no pós-stress. Além disso, em relação ao controlo, Herrera et al. (2020) não obteve diferenças significativas entre as duas situações de stress, no entanto, com o tratamento de triptofano, ocorreu a diminuição dos níveis de lactato no sangue na situação de maior stress. No caso deste trabalho, houve diferenças no pós e pré-stress para todos os tratamentos. Isso demonstra que um aumento da percentagem de triptofano pode ter tido impacto na redução dos níveis de lactato no sangue. No entanto, segundo Monteiro et al. (2021) isso também pode estar relacionado com o equilíbrio nutricional das rações. Animais alimentados com rações com deficiências nutricionais têm níveis de lactato mais elevados quando sob stress, enquanto que, com rações nutricionalmente equilibradas, os níveis de lactato não aumentam tanto. Segundo Hoseini et al. (2020), a existência de resultados contraditórios (aumento dos níveis de glucose e diminuição dos níveis de

lactato pós-stress) pode estar relacionada com a espécie e com as condições experimentais.

4.4. Resposta comportamental: Teste Novel tank diving, teste do cardume e teste de lateralização

Para além da resposta fisiológica ao stress, é importante analisar o comportamento do peixe. Para isso, foram realizados vários testes tendo em vista a análise da resposta comportamental das corvinas alimentadas com diferentes teores de triptofano. Ao que tudo indica, esta foi a primeira vez que estes testes foram aplicados à corvina num ensaio nutricional.

4.4.1. Teste novel tank diving

No teste de ansiedade não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos à exceção do número de atos de *freezing* (ver definição na secção 2.5.1.). Segundo Maulvault et al. (2018) e Egan et al. (2009), o aumento deste comportamento está relacionado com o aumento dos níveis das hormonas relacionadas com o stress e do nível de ansiedade. Neste trabalho verificou-se que houve uma diminuição no número de atos de *freezing* no tratamento com maior teor de triptofano, em comparação com os indivíduos suplementados com menores quantidades de TRP. Isto sugere que o aumento de triptofano na dieta fez com que as corvinas juvenis se tornassem mais resilientes às situações de stress. No entanto, não foram encontradas diferenças para a duração do *freezing*, o que pode ter sido influenciado pela elevada variabilidade da resposta individual que se obteve para os vários peixes estudados ou pelo baixo número de amostras. Os resultados obtidos no número de atos de *freezing* estão de acordo com os obtidos por Maulvault et al. (2018), que utilizaram a mesma espécie no mesmo estágio do ciclo de vida, mas com um tratamento com venlafaxina (antidepressivo). Quando colocados num novo ambiente, os peixes como zebrafish (*D. rerio*) mantêm-se no fundo de forma a procurar abrigo e proteção (Egan et al., 2009). Quando, no teste da ansiedade, foi analisada a deslocação dos indivíduos entre os vários quadrantes (parte superior/inferior, esquerda/direita) e o tempo passado na metade inferior, verificou-se que não existiram diferenças significativas entre o comportamento dos peixes alimentados com diferentes níveis de triptofano. Giacomini et al. (2020), utilizando zebrafish (*D. rerio*) adultos e um tratamento com triptofano administrado através da água, também não observou diferenças significativas na distância total percorrida, nem no tempo passado na metade superior. Os resultados nos dois trabalhos demonstram que o triptofano não afeta a necessidade dos peixes se manterem no fundo do tanque

quando são colocados num novo ambiente. Além disso, Egan et al. (2009) registou uma diminuição significativa dos movimentos erráticos (impulsos) nos indivíduos com o tratamento com fluoxetina. Esses resultados são diferentes dos obtidos neste trabalho, provavelmente porque o efeito da fluoxetina é superior ao efeito do triptofano.

4.4.2. Teste do cardume

No teste social, que consistia na observação da reação das corvinas juvenis ao verem os seus pares, não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos. Uma vez que a corvina é uma espécie de cardume, era esperada uma aproximação rápida ao separador que dividia o peixe em estudo e os seus semelhantes. O tempo de espera até à aproximação ao cardume teve uma duração semelhante nos diferentes tratamentos, embora tenha sido registado uma elevada variabilidade nos peixes do Tript3, o que pode ter condicionado os resultados. Maulvault et al. (2018), obteve diferenças significativas no tempo gasto antes da primeira aproximação ao cardume, pois os indivíduos expostos a venlafaxina através da ração foram os que demoraram menos tempo a aproximarem-se. Além do tempo antes da primeira aproximação ao cardume, Maulvault et al. (2018) também obteve diferenças significativas no tempo passado perto do cardume. Neste trabalho também não foram encontradas diferenças aqui. Por outro lado, Maulvault et al. (2018) também não observou diferenças significativas no número de transições. A ausência de diferenças nestes parâmetros sugere que os indivíduos dos diferentes tratamentos queriam juntar-se rapidamente ao cardume o que, na natureza, não é algo negativo, pois aumenta a probabilidade de sobrevivência (Maulvault et al., 2018). O tempo passado junto do cardume e o número de toques no acrílico também não foram afetados pelo tratamento. Essa falta de diferenças significativas pode estar relacionada com a elevada variabilidade das respostas individuais de cada peixe em todos os tratamentos. Quanto ao número e tempo de *freezing* não foram observadas diferenças entre tratamentos. Provavelmente devido à remoção do acrílico opaco, o que poderia assustar os indivíduos e provocar ainda mais ansiedade.

4.4.3. Teste de lateralização

A lateralização cerebral ocorre devido à assimetria cerebral. Esta encontra-se envolvida nas ações habituais dos seres vivos, como a procura de alimento ou fuga dos predadores, podendo constituir uma vantagem seletiva (Maulvault et al., 2018). No teste de lateralização não foram observadas diferenças significativas entre os três tratamentos. O mesmo aconteceu com Maulvault et al. (2018) que não obteve diferenças significativas entre o controlo e o tratamento com venlafaxina na água. Assim como

aconteceu com Roche et al. (2020), o LR dos indivíduos deste trabalho também foi altamente variável, o que poderia justificar a falta de variabilidade entre tratamentos.

Este estudo demonstra que os níveis de triptofano na dieta podem afetar a resposta fisiológica e comportamental de corvinas juvenis a fatores de stress. Embora não tenham sido obtidas diferenças muito acentuadas, possivelmente porque a resposta individual dos peixes foi muito variável, é importante não desprezar a presença deste aminoácido na dieta das corvinas juvenis e o seu potencial como mitigador de stress em aquacultura. Além disso, devido a fatores externos, não foi possível testar os testes com muita antecedência, o que poderá ter aumentado o erro humano.

5. Conclusão

Através dos resultados deste trabalho sabe-se que estas quantidades de triptofano nas rações não tiveram um efeito significativo geral no crescimento, na composição química da carcaça, nos parâmetros de stress nem no comportamento de juvenis de corvinas (*Argyrosomus regius*). No entanto, em certos critérios, os diferentes tratamentos tiveram efeitos significativamente distintos entre si. Por exemplo, em relação aos parâmetros de stress, o tratamento com menor percentagem de triptofano foi o mais afetado. Apesar de todos os tratamentos terem diminuído a quantidade de lactato no sangue após o teste de stress, apenas no tratamento Tript1 foi observada uma diminuição do nível de hemoglobina. Quanto ao teste de ansiedade, o tratamento Tript3 foi o único com efeito sobre um dos critérios, ou seja, os peixes sujeitos ao tratamento Trip3 tiveram um número de *freezing* muito inferior ao tratamento Tript1. Os resultados obtidos podem ter sido afetados pela ausência de um tratamento com deficiência em triptofano, que foi planeado, mas que não se traduziu na realidade após a análise das rações.

De futuro, seria interessante fazer-se um estudo semelhante, mas com um teor de triptofano abaixo do requisito para a espécie, de forma a se avaliar o verdadeiro impacto deste aminoácido na resposta ao stress. Para além disso, nos testes ao sangue assim como nos comportamentais, seria importante a avaliação de um maior número de indivíduos e a utilização de um menor número de indivíduos por tanque, de forma a diminuir a variabilidade individual. Poderiam igualmente ser realizados outros testes para avaliação da lateralização, como o teste do espelho.

6. Referências Bibliográficas

- Abdel-Tawwab, M. (2012). Effects of dietary protein levels and rearing density on growth performance and stress response of Nile tilapia, *oreochromis niloticus* (L.). *International Aquatic Research*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2008-6970-4-3>
- Ahmad, A., Sheikh Abdullah, S. R., Hasan, H. A., Othman, A. R., & Ismail, N. 'Izzati. (2021). Aquaculture industry: Supply and demand, best practices, effluent and its current issues and treatment technology. *Journal of Environmental Management*, 287(February), 112271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112271>
- AOAC. 1998a. Amino acids in feeds - AOAC Official Method 994.12. Official methods of analysis. 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemistry; [Chapter 4.1.11].
- AOAC. 1998b. Tryptophan in foods and food and feed ingredients - AOAC Official Method 988.15, Official methods of analysis, 16th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemistry; 1998 [Chapter 45.4.04].
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), 199–235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Bisazza, A., J. Rogers, L., & Vallortigara, G. (1998). The origins of cerebral asymmetry: A review of evidence of behavioural and brain lateralization in fishes, reptiles and amphibians. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22(3), 411–426. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00050-X)
- Broom, D. M., & Johnson, K. G. (2019). *Stress and Animal Welfare: Key Issues in the Biology of Humans and Other Animals* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-32153-6>
- Cabanillas-Gámez, M., Bardullas, U., Galaviz, M. A., Rodriguez, S., Rodriguez, V. M., & López, L. M. (2020). Tryptophan supplementation helps totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles to regain homeostasis in high-density culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(2), 597–611. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00734-2>

- Carvalho, M. S., Yonamine, C. M., Mas, C. D., Nunes, D. F. S., & Hayashi, M. A. F. (2017). Metabolismo Do Triptofano Em Transtornos Mentais: Um Enfoque Na Esquizofrenia. *VITTALLE - Revista de Ciências Da Saúde*, 29(2), 44–56. <https://doi.org/10.14295/vittalle.v29i2.6550>
- Ciji, A., & Akhtar, M. S. (2021). Stress management in aquaculture: a review of dietary interventions. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), 2190–2247. <https://doi.org/10.1111/raq.12565>
- Costas, B., Conceição, L. E. C., Aragão, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., & Afonso, A. (2011). Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture*, 316(1–4), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.011>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- FAO. 2020a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. 2020b. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb1213t>
- FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Giacomini, A. C. V. V., Piassetta, A. S., Genario, R., Bonan, C. D., Piato, A., Barcellos, L. J. G., & de Abreu, M. S. (2020). Tryptophan alleviates neuroendocrine and behavioral responses to stress in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 378(September 2019), 112264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112264>

- González-Quirós Rafael, R., Del Árbol, J., García-Pacheco, M. del M., Silva-García, A. J., Naranjo, J. M., & Morales-Nin, B. (2011). Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*, 109(1), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2011.01.031>
- Hanke, I., Hassenrück, C., Ampe, B., Kunzmann, A., Gärdes, A., & Aerts, J. (2020). Chronic stress under commercial aquaculture conditions: Scale cortisol to identify and quantify potential stressors in milkfish (*Chanos chanos*) mariculture. *Aquaculture*, 526(October 2019), 735352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735352>
- Heeren, A. (2020). On the distinction between fear and anxiety in a (Post)pandemic world: A commentary on Schimmenti et al. (2020). *Clinical Neuropsychiatry*, 17(3), 189–191. <https://doi.org/10.36131/cnfioritieditore20200307>
- Henderson JW, Ricker RD, Bidlingmeyer BA, Woodward C.2000. Rapid, accurate, sensitive and reproducible analysis of amino acids. Palo Alto, CA: Agilent Publication, Agilent Technologies [5980-1193EN].
- Herrera, M., Fernández-Alacid, L., Sanahuja, I., Ibarz, A., Salamanca, N., Morales, E., & Giráldez, I. (2020). Physiological and metabolic effects of a tryptophan-enriched diet to face up chronic stress in meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 522(September 2019), 735102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735102>
- Höglund, E., Overli, O., Andersson, M. A., Silva, P., Laursen, D. C., Moltesen, M. M., Kroghdahl, Å., Schjolden, J., Winberg, S., Vindas, M. A., Mayer, I., & Hillestad, M. (2017). Dietary l-tryptophan leaves a lasting impression on the brain and the stress response. *British Journal of Nutrition*, 117(10), 1351–1357. <https://doi.org/10.1017/S0007114517001428>
- Hoseini, S. M., Mirghaed, A. T., Mazandarani, M., & Zoheiri, F. (2016). Serum cortisol, glucose, thyroid hormones' and non-specific immune responses of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* to exogenous tryptophan and acute stress. *Aquaculture*, 462, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.031>
- Hoseini, S. M., Pérez-Jiménez, A., Costas, B., Azeredo, R., & Gesto, M. (2019). Physiological roles of tryptophan in teleosts: current knowledge and perspectives

- for future studies. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 3–24.
<https://doi.org/10.1111/raq.12223>
- Hoseini, S. M., Taheri Mirghaied, A., Ghelichpour, M., Pagheh, E., Iri, Y., & Kor, A. (2020). Effects of dietary tryptophan supplementation and stocking density on growth performance and stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 519(December 2019), 734908.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734908>
- Kasper, C., Ribeiro, D., de Almeida, A. M., Larzul, C., Liaubet, L., & Murani, E. (2020). Omics application in animal science—a special emphasis on stress response and damaging behaviour in pigs. *Genes*, 11(8), 1–24.
<https://doi.org/10.3390/genes11080920>
- Kpundeh, M. D., Xu, P., Yang, H., Qiang, J., & He, J. (2013). Stocking densities and chronic zero culture water exchange stress' effects on biological performances, hematological and serum biochemical indices of GIFT tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 4(5).
<https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000189>
- Kružić, N., Mustać, B., Župan, I., & Čolak, S. (2016). MEAGRE (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) AQUACULTURE IN CROATIA. *Croatian Journal of Fisheries*, 74(1), 14–19. <https://doi.org/10.1515/cjf-2016-0003>
- Kumar, B., Manuja, A., & Aich, P. (2012). Stress and its impact on farm animals. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 4 E(5), 1759–1767. <https://doi.org/10.2741/e496>
- Liu, Y. Z., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2017). Inflammation: The common pathway of stress-related diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11(June), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00316>
- Mansour, A. T. E., Goda, A. A., Omar, E. A., Khalil, H. S., & Esteban, M. Á. (2017). Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.060>
- Martínez-Llorens, S., & Espert, J. (2011). Growth and nutrient efficiency of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) fed extruded diets with different protein and lipid

- levels. ... *Journal of Fisheries* ..., 3(10), 195–203.
<http://www.academicjournals.org/journal/IJFA/article-abstract/90FEDFC40391>
- Martins, C. I. M., Silva, P. I. M., Costas, B., Larsen, B. K., Santos, G. A., Conceição, L. E. C., Dias, J., Øverli, Ø., Höglund, E., & Schrama, J. W. (2013). The effect of tryptophan supplemented diets on brain serotonergic activity and plasma cortisol under undisturbed and stressed conditions in grouped-housed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 400–401, 129–134.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.035>
- Maulvault, A. L., Santos, L. H. M. L. M., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., & Rosa, R. (2018). Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*). *Science of the Total Environment*, 634, 1136–1147.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.015>
- Miletto Petrazzini, M. E., Sovrano, V. A., Vallortigara, G., & Messina, A. (2020). Brain and Behavioral Asymmetry: A Lesson From Fish. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14(March), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00011>
- Moberg, G. P., & Mench, J. A. (2000). *The Biology Of Animal Stress: Basic Principles And Implications For Animal Welfare*. CABI.
- Monfort, M.C. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean. No. 89. Rome, FAO. 2010. 28p.
- Monteiro, M., Sousa, C., Coutinho, F., Castro, C., Fontinha, F., Guerreiro, I., Pousão, P., Matos, E., Díaz-Rosales, P., Oliva-Teles, A., Enes, P., & Couto, A. (2021). Functional feeds to tackle meagre (*Argyrosomus regius*) stress: Physiological responses under acute stressful handling conditions. *Marine Drugs*, 19(11), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/md19110598>
- Morales-Nin, B., Geffen, A. J., Pérez-Mayol, S., Palmer, M., González-Quirós, R., & Grau, A. (2012). Seasonal and ontogenic migrations of meagre (*Argyrosomus*

- regius) determined by otolith geochemical signatures. *Fisheries Research*, 127–128, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.02.012>
- Moretz, J. A., Martins, E. P., & Robison, B. D. (2007). Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behavioral Ecology*, 18(3), 556–562. <https://doi.org/10.1093/beheco/arm011>
- Natale, F., Hofherr, J., Fiore, G., & Virtanen, J. (2013). Interactions between aquaculture and fisheries. *Marine Policy*, 38, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2012.05.037>
- Prista, N., Costa, J. L., Costa, M. J., & Jones, C. M. (2009). Age determination in meagre *Argyrosomus regius*. 49, 56 pp.
- Pollard, D.A. & Bizzel, K. 2020. *Argyrosomus regius*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T198706A130099146. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T198706A130099146.en>
- Renna, M. E., O'Toole, M. S., Spaeth, P. E., Lekander, M., & Mennin, D. S. (2018). The association between anxiety, traumatic stress, and obsessive–compulsive disorders and chronic inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Depression and Anxiety*, 35(11), 1081–1094. <https://doi.org/10.1002/da.22790>
- Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., & Dougherty, D. M. (2009). L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, 2(1), 45–60. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s2129>
- Roche, D. G., Amcoff, M., Morgan, R., Sundin, J., Andreassen, A. H., Finnøen, M. H., Lawrence, M. J., Henderson, E., Norin, T., Speers-Roesch, B., Brown, C., Clark, T. D., Bshary, R., Leung, B., Jutfelt, F., & Binning, S. A. (2020). Behavioural lateralization in a detour test is not repeatable in fishes. *Animal Behaviour*, 167, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.06.025>
- Ruiz-Jarabo, I., Tinoco, A. B., Vargas-Chacoff, L., Martos-Sitcha, J. A., Rodríguez-Rúa, A., Cárdenas, S., & Mancera, J. M. (2019). Environmental salinity affects growth and metabolism in fingerling meagre (*Argyrosomus regius*). *Fishes*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/fishes4010006>

- Saavedra, M., Pereira, T. G., Candeias-Mendes, A., Carvalho, L., Pousão-Ferreira, P., & Conceição, L. E. C. (2018). Effect of increased dietary protein level in meagre (*Argyrosomus regius*) juvenile growth and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1153–1159. <https://doi.org/10.1111/anu.12654>
- Saavedra, M., Pereira, T. G., Carvalho, L. M., Pousão-Ferreira, P., Grade, A., Teixeira, B., Quental-Ferreira, H., Mendes, R., Bandarra, N., & Gonçalves, A. (2017). Wild and farmed meagre, *Argyrosomus regius*: A nutritional, sensory and histological assessment of quality differences. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63(July), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.028>
- Saavedra, M., Pereira, T. G., Ribeiro, L., Barata, M., Candeias-Mendes, A., Conceição, L. E. C., & Pousão-Ferreira, P. (2020). Evaluation of dietary histidine supplementation on meagre, *Argyrosomus regius*, juvenile growth, haematological profile, stress and muscle cellularity. *Aquaculture Nutrition*, 26(4), 1223–1230. <https://doi.org/10.1111/anu.13078>
- Saavedra, M., Pereira, T.G., Barata, M., Aragão, C., Requeijo, B., Conceição, L.E.C. and Pousão-Ferreira, P. 2022. Plant-based diets fed to juvenile meagre *Argyrosomus regius* with low methionine and taurine supplementation led to an overall reduction on fish performance and to an increase in muscle fibre recruitment. *Journal of Fish Biology*, In Press.
- Sharf, Y., & Khan, M. A. (2022). Dietary tryptophan requirement of fingerling *Channa punctatus* (Bloch) based on growth, hematological parameters, intestinal enzymes, non-specific immune response, and antioxidant capacity. *Aquaculture*, 562(August 2022), 738745. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115058>
- Tacon, A. G. J. (2020). Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1), 43–56. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1649634>
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.

Ziegler M, Knoll S, Köhler H-R, Tisler S, Huhn C, Zwiener C, Triebkorn R. 2020. Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout. PeerJ 8:e8765 <http://doi.org/10.7717/peerj.8765>

7. Anexos

Figuras complementares

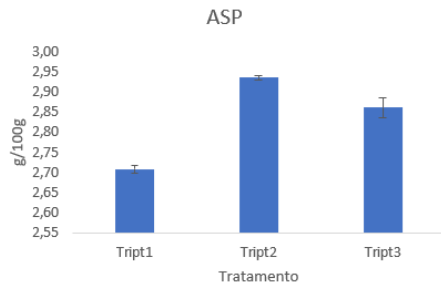


Figura complementar 12 – Quantidade de aspartato presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

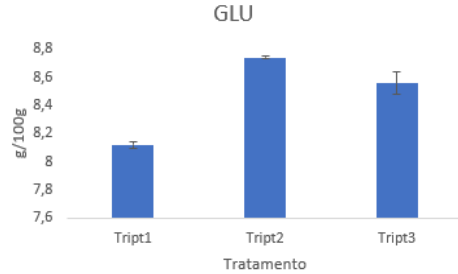


Figura complementar 13 – Quantidade de glutamato presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

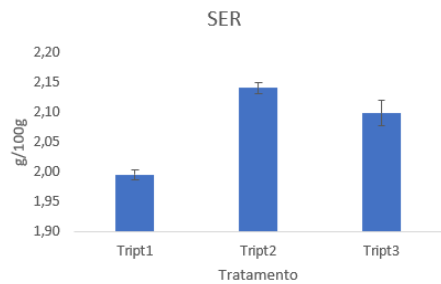


Figura complementar 14 – Quantidade de serina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

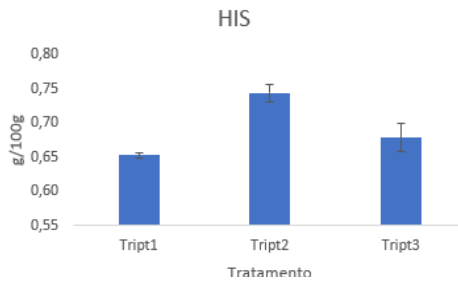


Figura complementar 15 – Quantidade de histidina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

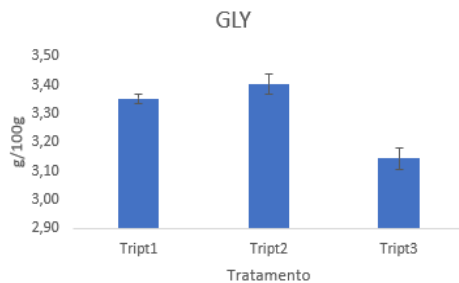


Figura complementar 16 – Quantidade de glicina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

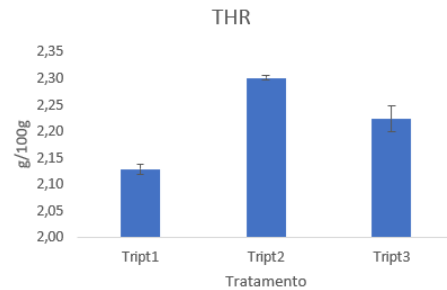


Figura complementar 17 – Quantidade de treonina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

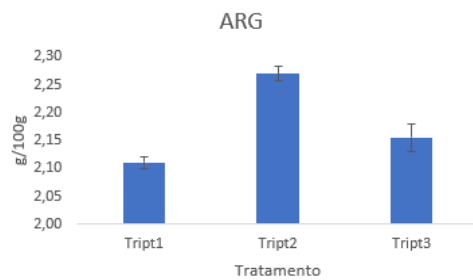


Figura complementar 18 – Quantidade de arginina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

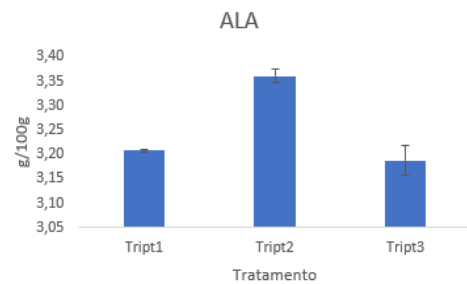


Figura complementar 19 – Quantidade de alanina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

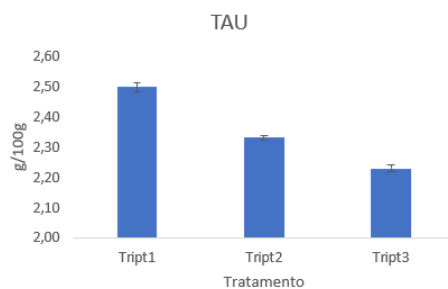


Figura complementar 20 – Quantidade de taurina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

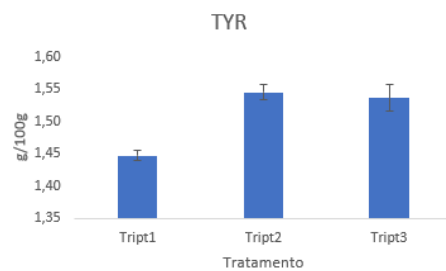


Figura complementar 21 – Quantidade de tirosina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

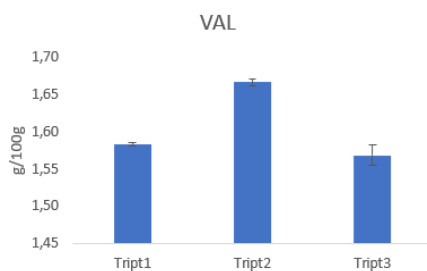


Figura complementar 22 – Quantidade de valina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

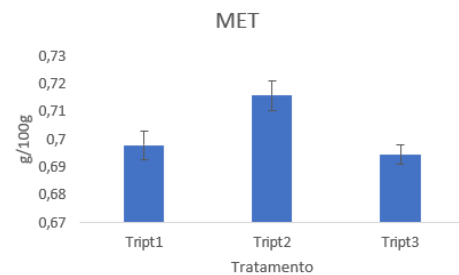


Figura complementar 23 – Quantidade de metionina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

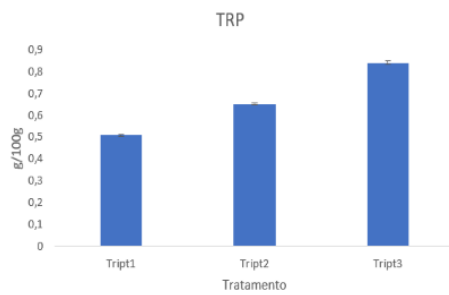


Figura complementar 24 – Quantidade de triptofano presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

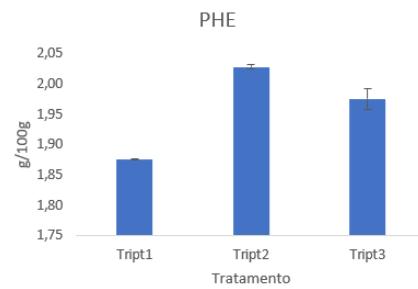


Figura complementar 25 – Quantidade de fenilalanina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

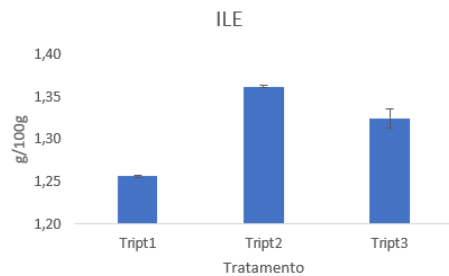


Figura complementar 26 – Quantidade de isoleucina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

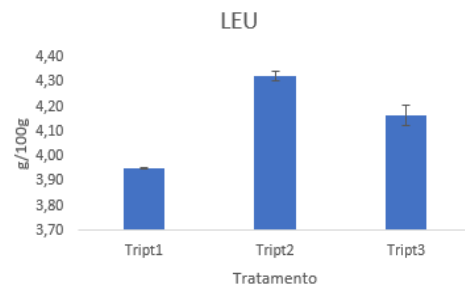


Figura complementar 27 – Quantidade de leucina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

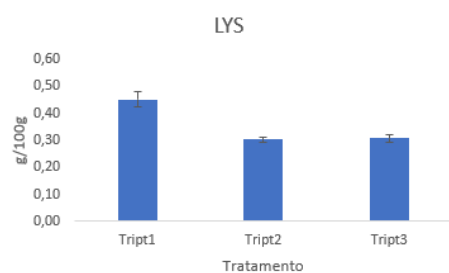


Figura complementar 28 – Quantidade de lisina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

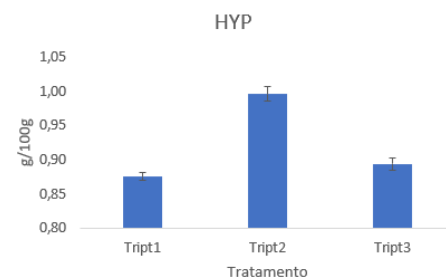


Figura complementar 29 – Quantidade de hidroxiprolina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

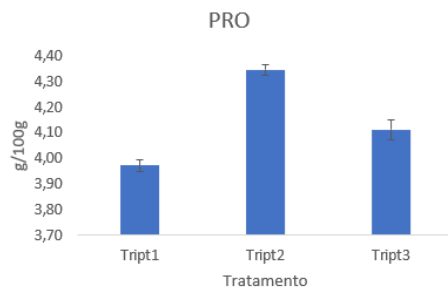


Figura complementar 30 – Quantidade de prolina presente nos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

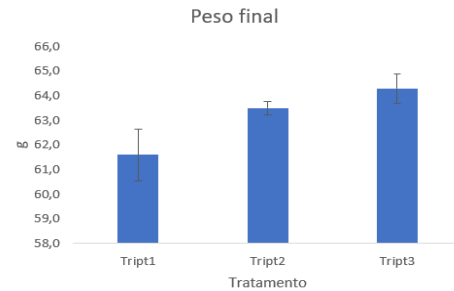


Figura complementar 31 – Peso final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

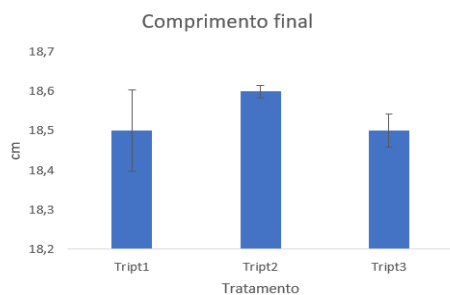


Figura complementar 32 – Comprimento final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

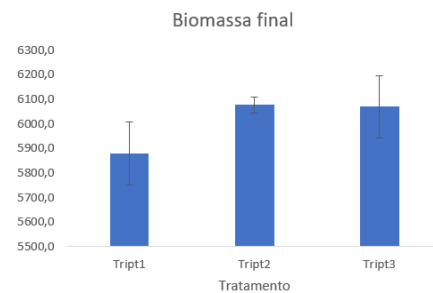


Figura complementar 33 – Biomassa final das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

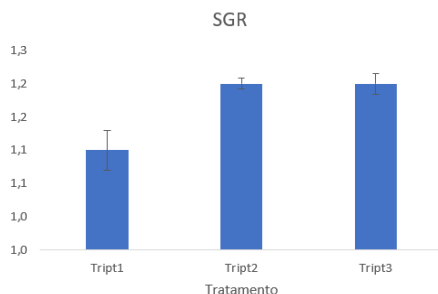


Figura complementar 34 – Taxa de crescimento das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

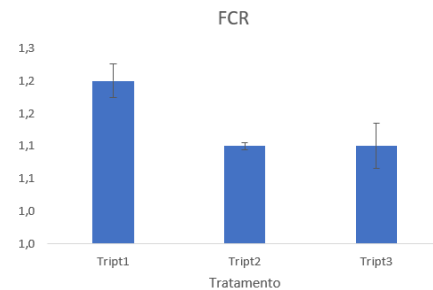


Figura complementar 35 – Taxa de conversão alimentar das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

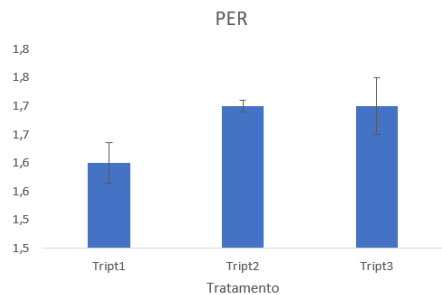


Figura complementar 36 – Rácio de eficiência proteica das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

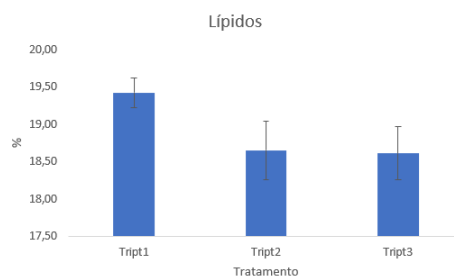


Figura complementar 37 – Percentagem de lípidos das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

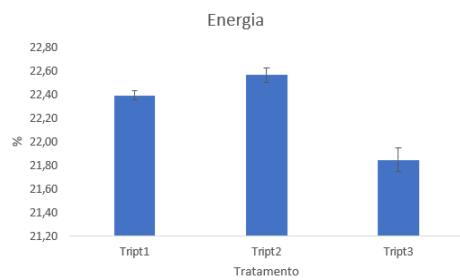


Figura complementar 38 – Percentagem de energia das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

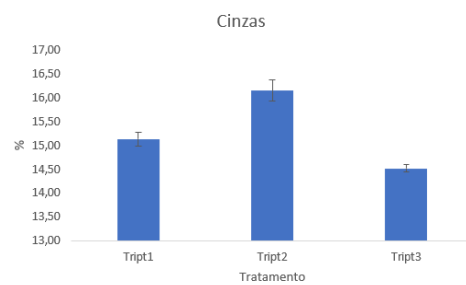


Figura complementar 39 – Percentagem de cinzas das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

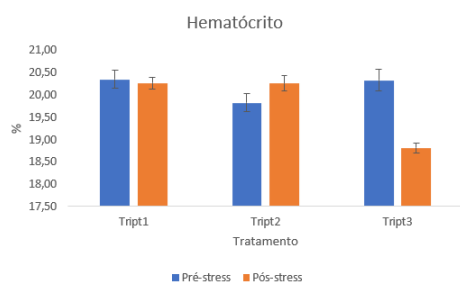


Figura complementar 40 – Hematócrito das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

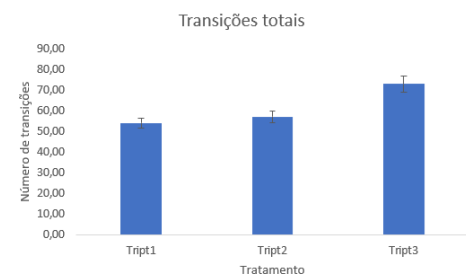


Figura complementar 41 – Transições totais das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

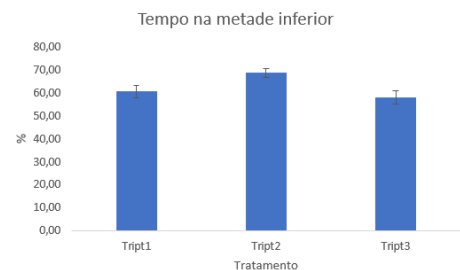


Figura complementar 42 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano passaram na metade inferior. Os resultados são média e erro padrão

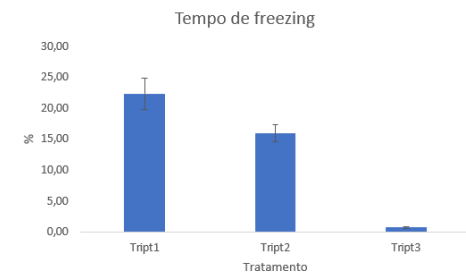


Figura complementar 43 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram em *freezing*. Os resultados são média e erro padrão

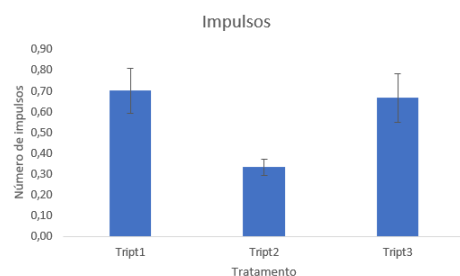


Figura complementar 44 – Número de impulsos das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

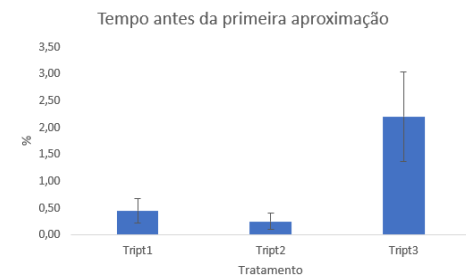


Figura complementar 45 – Percentagem de tempo antes das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano se aproximarem pela primeira vez do cardume. Os resultados são média e erro padrão

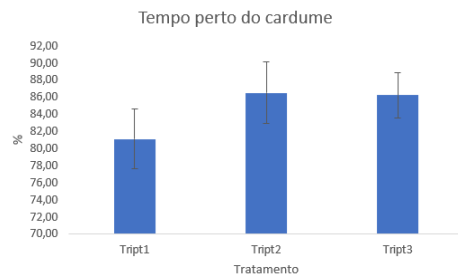


Figura complementar 46 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram perto do cardume. Os resultados são média e erro padrão

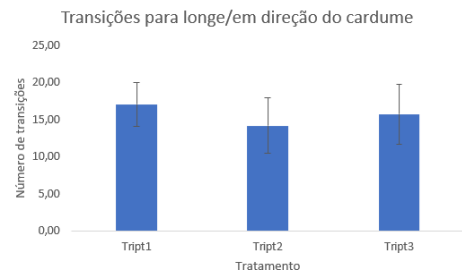


Figura complementar 47 – Média de transições totais das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

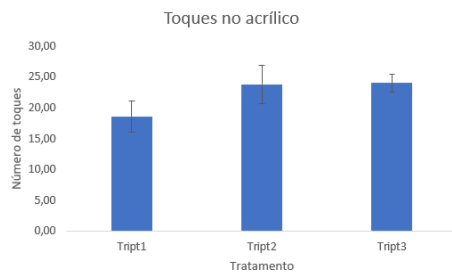


Figura complementar 48 – Média de toques no acrílico das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

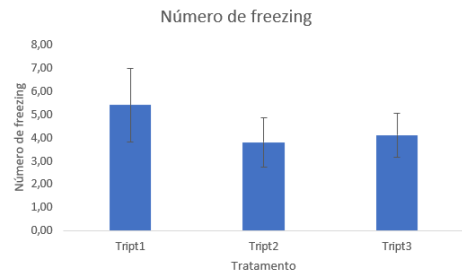


Figura complementar 49 – Média de atos de *freezings* das corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano. Os resultados são média e erro padrão

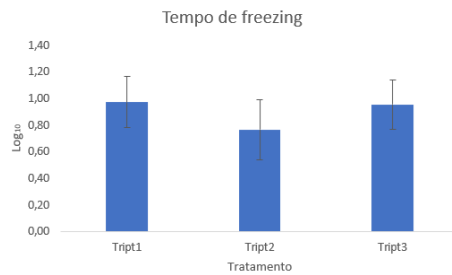


Figura complementar 50 – Percentagem de tempo que as corvinas juvenis dos tratamentos Tript1, com 0,5 % de triptofano, Tript2, com 0,7 % de triptofano e Tript3, com 0,8 % de triptofano estiveram em *freezing*. Os resultados são média e erro padrão