

MSc

2.º
CICLO

FCUP
2015



Estágio na Aquacultura Safiestela – Estudo da
alimentação e comportamento alimentar em
reprodutores de linguado (*Solea senegalensis*)

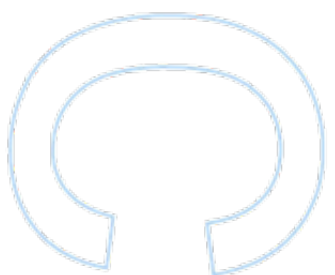
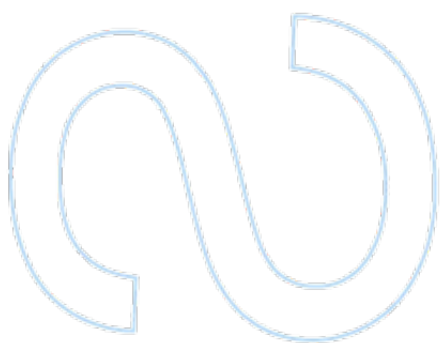
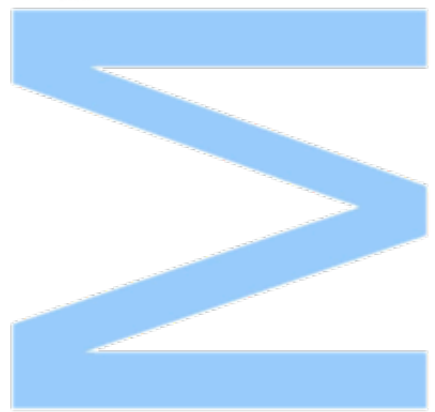
Marta Filipe dos Anjos Pinto

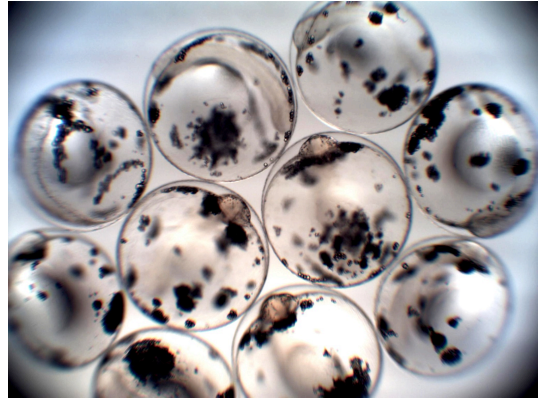


Estágio na Aquacultura Safiestela Estudo da alimentação e comportamento alimentar em reprodutores de linguado (*Solea senegalensis*)

Marta Filipe dos Anjos Pinto
Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto,
Em Recursos Biológicos Aquáticos

2015





Estágio na Aquacultura Safiestela

Estudo da alimentação e
comportamento alimentar
em reprodutores de linguado
(*Solea senegalensis*)

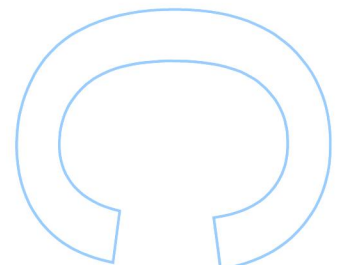
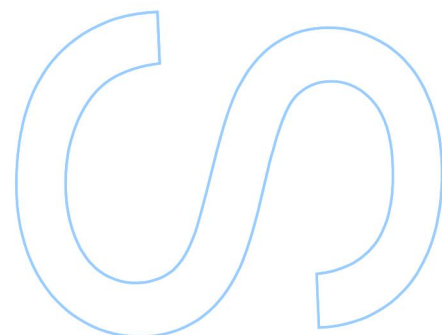
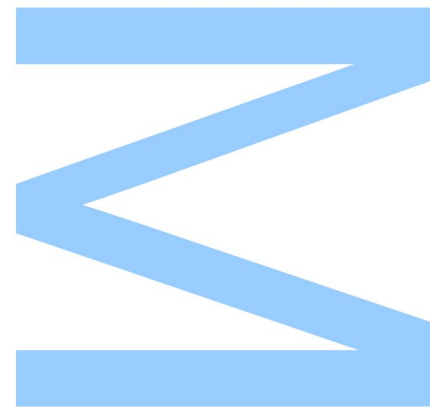
Marta Filipe dos Anjos Pinto
Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos
Departamento de Biologia
2015

Orientador

Maria Helena Peres, Investigadora, CIIMAR

Co-orientador

Renata Serradeiro, Diretora I&D, Sea8



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

3

3

3

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto VEGICOR/AMINOQUA, ref. 31-03-05-FEP-43

À Prof. Dra, Helena Peres, pela sua orientação, apoio, disponibilidade, empenho, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, pelas valiosas contribuições para o trabalho, pela amizade e confiança depositada na realização desta tese.

À Dra. Renata Serradeiro por ter permitido a realização deste estágio na empresa e, por toda a ajuda, carinho e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

A todos os meus colegas da empresa, particularmente ao Isidro, Evaristo e Luís por toda a amizade, paciência, pela alegria transmitida no trabalho e pelo enorme interesse e disposição em colaborar sempre que precisei.

À minha amiga Sara Moutinho por toda a paciência, carinho, ajuda e amizade demonstrados no decorrer desta tese.

À minha amiga e colega Joana Mendes por toda a paciência, companhia e preciosa ajuda no meu estágio na empresa. Por todas as viagens de carro, por todas as conversas, e por toda a amizade que ficará para a vida.

Ao Carlos Câmara por todo o carinho, amor e motivação durante todo meu percurso académico. Por todo o apoio nas diversas madrugadas, por toda a paciência nos momentos mais difíceis e por nunca duvidar que seria capaz.

Em especial à minha família, o meu pai, mãe e irmã. Por todo o carinho e amor demonstrado ao longo de toda a minha vida, sem eles esta tese não teria sido possível.

Índice

Índice de figuras	1
Índice de tabelas	4
Sumário.....	5
Abstract	8
I - Introdução	10
1. A aquacultura no Mundo	10
2. A aquacultura em Portugal	12
3. Biologia e produção do Linguado do Senegal (<i>Solea senegalensis</i> , kaup, 1858).....	14
II – Estágio na aquacultura Safiestela (Sustainable Aquafarming Investments Lda.)	18
1. A empresa.....	18
2. Estrutura da Safiestela	19
2.1 Sistema de Recirculação em Aquacultura (RAS)	19
2.1.1. Remoção de resíduos sólidos.....	21
2.1.2. Azoto	23
2.1.3. Oxigenação e remoção de dióxido de carbono	24
2.1.4. Desinfecção da água - ozono e luz ultravioleta	26
2.2 - Sala de reprodutores	27
2.3 – Sala de incubação.....	30
2.4 – Sala de cultivo larvar	32
2.5– Sala de produção de alimento vivo: Rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i>)	34
2.4 - Sala de cultivo do alimento vivo: Artémia (<i>Artemia salina</i>).....	36
2.6 – Sala de desmame (desmame 1 e desmame 2)	39
2.7 – Sala da pré-engorda	41

2.8 - Monitorização e controlo da qualidade da água.....	43
III – Trabalho Experimental	44
Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela.	44
Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores	44
1 - Introdução	45
2 - Material e Métodos	48
Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela	48
Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores (ensaio Repling).....	52
3 - Resultados e discussão.....	53
Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela.	53
Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores (ensaio Repling).....	67
IV - Conclusão	72
Bibliografia	74

Índice de figuras

Figura 1: Utilização de peixe (em milhões de toneladas) comparativamente à população (em biliões) e o fornecimento de peixe (Kg/capita) (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2014).

Figura 2: Produção aquícola nacional em 2012 e 2013, em quantidade e em valor (INE e DGRM, 2015).

Figura 3: Exemplar de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) (Villanueva e Alonso, 2014).

Figura 4: Tambor rotativo de filtração de rede num sistema de recirculação de água em aquacultura (RAS) (Sea8, 2015).

Figura 5: Imagem esquemática do ciclo de azoto em sistemas equipados com filtros biológicos (Crab et al., 2007).

Figura 6: Sistema de filtração biológica (biofiltros com “bio-bolas”) com injeção de ar num sistema de recirculação de água em aquacultura (RAS) (Sea8, 2015).

Figura 7: Alimento semi-húmido de reprodutores de linguado, fabricado na empresa. Quando sai da máquina (imagem à esquerda), e em pellets de 1 grama, pronto para a alimentação dos reprodutores (imagem à direita). Fotografia tirada por Marta Pinto.

Figura 8: Zona das máquinas da sala dos reprodutores. Pode-se observar os reservatórios, os filtros de areia e a desinfecção por filtros de luz UV (Sea8, 2015).

Figura 9: Ovos de linguado fecundados após recolha dos mesmos dos tanques. Vista ao microscópio com uma ampliação de 10x. Fotografia tirada por Marta Pinto.

Figura 10: Sala de incubação dos ovos com incubadoras de 200 L (Fotografia tirada por Joana Mendes).

Figura 11: Larvas de linguado com saco vitelino e pormenor da abertura da boca (Villanueva e Alonso, 2014).

Figura 12: Macho e fêmea com ovos de rotíferos, *Brachionus plicatilis* (Ferreira, 2009).

Figura 13: Exemplar de um náuplio de *Artemia salina* visto ao microscópio, com uma ampliação de 10x. Fotografia tirada por Luís Calisto.

Figura 14: Sala de desmame numa produção industrial de linguado (Sea8, 2015).

Figura 15: Zona da pré-engorda num ambiente empresarial. Pode-se observar os tanques do tipo “raceway” com uma iluminação artificial com luz azul. Fotografia tirada por Isidro Blanquet.

Figura 16: Gráficos de dispersão entre a taxa de viabilidade (%) e taxa de eclosão (%) e entre o tamanho das ovos (μm) e taxa de viabilidade (%).

Figura 17: Percentagem da taxa de viabilidade nos tanques 2, 3 e 4 da sala de Outono nos meses de amostragens (Janeiro, Fevereiro e Março).

Figura 18: Percentagem da taxa de eclosão nos tanques 2, 3 e 4, da sala de Outono, nos meses de amostragens (Janeiro, Fevereiro e Março).

Figura 19: Variação da ingestão diária com o aumento ou diminuição da temperatura. a taxa de ingestão está representada a vermelho e a temperatura a azul. Ingestão diária (% Peso Vivo por dia) peixe = $[(\text{Média de alimento ingerido/dia (g)} * 100) / \text{Biomassa total do tanque (g)}] * 100$

Figura 20: Número total de comportamentos, alimentação (Ingestão voluntária de alimento em % do peso vivo) avaliados nos reprodutores de linguados, durante os três meses de ensaio (Fevereiro, Março, Abril). Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento

Figura 21: Comparação dos dias com comportamento alimentar 1, 2 ou 3 com o comportamento natatório positivo (com natação) e negativos (sem natação). Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

Figura 22: Número total de comportamentos avaliados nos reprodutores de linguados dos grupos de controlo e teste (ARA), durante os dois meses de ensaio.

Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

Índice de tabelas

Tabela 1: Produção aquícola nacional em águas interiores e oceânicas por tipo de água, regime e espécie (INE e DGRM, 2014).

Tabela 2: Dados relativos aos parâmetros de avaliação da performance reprodutiva nas salas de Outono, Inverno e Verão dos reprodutores da empresa Safiestela durante 4 meses.

Tabela 3: Avaliação da taxa de ingestão, comportamentos positivos ou negativos na dieta controlo e na dieta teste, durante os 60 dias.

Sumário

Atualmente a aquacultura é responsável pela produção de uma importante proporção do peixe consumido mundialmente. Com o aumento do consumo de peixe *per capita* e a estabilização das pescas, acrescido do aumento do preço do peixe, a aquacultura surge como a alternativa às pescas, mais sustentável, de modo a garantir alimento de elevado valor nutricional para a população em geral, sem esgotar o ecossistema.

Portugal é um país com uma grande ligação natural e cultural ao mar. No entanto, a produção aquícola é ainda muito reduzida quando comparada aos grandes produtores mundiais. Dada as potencialidades de Portugal para a atividade aquícola, torna-se evidente que é necessário apostar no aumento da sua produção, quer pela intensificação da produção quer pela diversificação das espécies produzidas, de forma a fomentar a autossustentabilidade de Portugal, em matéria de consumo de peixe, reduzindo a grande importação de pescado de países onde os custos de produção são mais reduzidos.

A Safiestela – Sustainable Aquafarming Investments, Lda., é uma empresa portuguesa de produção industrial de linguado senegalês (*Solea senegalensis*), em regime intensivo, desde a desova até à fase de juvenil. Esta espécie é uma forte candidata ao mercado de peixe dos países mediterrânicos, apresentando um preço de venda superior a outras espécies produzidas em aquacultura, como o robalo e a dourada. Além disso, apresenta um crescimento competitivo relativamente a espécies produzidas em cativeiro e que já apresentam saturação de mercado.

No entanto, alguns aspetos da produção intensiva desta espécie ainda necessitam de ser limados. As limitações no conhecimento estendem-se a diferentes áreas, nomeadamente dificuldade de obter ovos e larvas em números viáveis (unicamente através de reprodutores selvagens) e défice de informação relativa a requisitos alimentares. O aperfeiçoamento destas permitirá às empresas de produção de linguado uma maior rentabilidade.

Inerente a este estágio está uma aquisição de novas competências em dois âmbitos distintos, embora relacionados, sendo a principal a produção de linguado do Senegal que envolveu a manutenção, manipulação e tratamento de todas as unidades integrantes de uma maternidade de linguado. Estas competências, aliadas a novos conhecimentos sobre o comportamento alimentar dos reprodutores e a sua performance reprodutiva, tentarão definir e trazer novos critérios de qualidade das desovas para a Safiestela.

No âmbito do estágio na Safiestela surgiu também a oportunidade de participar no projeto “Repling” que tinha como objetivo principal melhorar a performance reprodutiva do linguado através da otimização das posturas com o desenvolvimento de novas gamas de alimentos de alta performance para reprodutores. Neste contexto, e uma vez que a inclusão de ácido araquidónico nas dietas tem demonstrado melhorar a performance reprodutiva e a sobrevivência das larvas em algumas espécies de peixes, avaliou-se no linguado do Senegal a preferência alimentar de uma dieta controlo e uma dieta suplementada com ácido araquidónico.

Antes do início do projeto foi necessário aferir as condições atuais de reprodução e alimentação em vigor na empresa com o objetivo de constituir uma base de informação sobre estes parâmetros. Com base nesta premissa, foram estudados quatro ciclos de reprodução consecutivos e analisados alguns parâmetros que poderiam comprovar ou não uma boa performance reprodutiva. Aliada a esta análise foi estudada também a ingestão e comportamento alimentar dos reprodutores, avaliado com a seguinte métrica: 1) nenhum peixe se aproximava e ingeria o alimento; 2) um ou mais peixes aproximavam-se e ingeriam o alimento; 3) a maioria dos peixes do tanque aproxima-se e ingeria o alimento. A natação dos peixes, demonstrada por alguns autores fazer parte do comportamento de acasalamento, foi também avaliada em positivo, se existia natação, ou negativo, se a natação era inexistente.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a elaboração de um registo diário da alimentação, comportamento alimentar, e performance reprodutiva dos reprodutores poderá constituir uma valiosa ferramenta para a empresa de modo a aferir com maior exatidão a qualidade das desovas, bem como os fatores que a afetam e assim melhor os lotes e sincronização das desovas. Podemos, também, concluir, que a

suplementação da dieta dos reprodutores com ácido araquidónico não afeta a ingestão voluntária de alimento ou o comportamento alimentar. No entanto, será necessário dar continuidade a estes estudos de modo a verificar se a suplementação de ácido araquidónico pode ou não afetar a performance reprodutiva, a qualidade dos ovos e das larvas.

No cômputo geral, este estágio permitiu adquirir novas competências em ambiente real de produção, o que poderá ser uma mais-valia em termos profissionais, num futuro próximo.

Abstract

Currently, aquaculture is responsible for the production of a considerable portion of fish consumed worldwide. With the increase of per capita fish consumption and stabilizing fisheries, allied to the increase in prices, aquaculture emerges as the most sustainable alternative to ensure a production of a high nutritional value food for the general population worldwide without depleting the ecosystem.

Portugal is a country with a unique natural and cultural heritage connected to the to the sea. However, aquaculture production is still very low when compared to major world producers. Given the potential of Portugal to the aquaculture activity, it becomes evident that it is the necessary to promote and increase its production, either through the intensification of the production levels or through the diversifying the species produced. This becomes imperative in to increase the degree of self-sufficiency in fish consumption achieved by Portugal, decreasing the import levels of fish from countries where production costs are lower.

Safiestela – Sustainable Aqua Farming Investments, Lda. is a Portuguese company of intensive production of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), from the spawning until the juvenile stage. This particular species is a strong candidate for the Mediterranean fish market, with a higher sales price compared to other aquaculture species, such as European sea bass and gilthead seabream. Besides, it presents a competitive growth rate when compared the well-established aquaculture species and who already have market saturation

However, some production constrains, like the lack of sufficient quantities of viable eggs and larvae; dependency of natural bloodstock; lack of scientific information on nutritional requisites of the different life stages, need to be over come in order to increased profitability.

Inherent to this internship is the acquisition of new skills in two different areas, but related, both involving maintenance, handling and production during the reproductive, egg and larval stages of the Senegalese sole. These will also involve the acquisition of

knowledge about feeding behavior and evaluation of reproductive performance and egg and larvae quality.

During the fellowship at Safiestela, there was the opportunity to participate in the "Repling" project that aimed to improve reproductive Senegalese sole performance by optimizing the breeding through the optimization of nutrition. In this context, since the inclusion of arachidonic acid in the diet has been shown to improve the reproductive performance and survival of larvae in some species of fish, it was evaluated in the Senegal sole the feeding preference of a control diet and a diet supplemented with arachidonic acid.

Before the execution of this project, it was a necessity to assess the current conditions of reproduction and feeding behavior of broodstock at the company. Based on this premise, four consecutive reproduction cycles were studied and different parameters were analyzed to evaluate the reproduction performance. Together, it was also study the voluntary feed intake and feeding behavior of broodstock using the following metric: 1) no fish approached and ingested the diet; 2) one and more fish approached and ingested the diet; 3) most of the fish approached and ingested the diet. The fish swimming pattern demonstrated by some authors as part of the mating behaviors, was also assessed as positive (when it happened) or negative (when it was inexistent).

Based on the obtained results it can conclude that the development of a daily register of feed intake, feeding behavior and reproductive performance can be a valuable tool for the company, in order to assess more accurately the quality of the spawning and determine with are the factors may interfere with it. It can also be concluded that supplementation of reproductive diets with arachidonic acid does not affect the voluntary feed intake or feed behavior. However, it will be necessary to continue this study to assess whether the arachidonic acid supplementation may or may not affect the reproductive performance, the quality of eggs and larvae.

Overall, this internship allowed to acquire new skills in real production environment, which may be an asset professionally in the near future.

I - Introdução

O aumento da população mundial e da procura de produtos marinhos, acrescido do agravamento de situações de pesca ilegal, conduziram a um aumento do esforço de pesca praticado sobre as espécies e consequentemente à sobre-exploração destes recursos naturais (Carrasquinho, 2009; FAO, 2014). O consumo médio de peixe *per capita* aumentou de 9,9 kg, nos anos 60, para aproximadamente 19,2 kg, em 2012 (figura 1) (FAO, 2014). Assiste-se a uma escassez crescente e, nalguns casos, ao desaparecimento de algumas espécies, sendo necessário recorrer a uma metodologia que colmate a diminuição dos produtos provenientes da pesca e o aumento do preço dos mesmos, de forma a satisfazer as necessidades humanas a nível mundial. A aquacultura surge assim como uma atividade atenuante destas carências (Andrade, 2012).

A aquacultura é definida como a produção de organismos aquáticos em cativeiro, tanto em água doce, salobra ou salgada, e pode ser classificada de acordo com o local onde se estabelece: aquacultura em terra (*inshore*), aquacultura costeira (*onshore*) ou aquacultura em mar aberto (*offshore*) e pode também ser classificada de acordo com o regime do sistema como extensiva, semi-intensiva e intensiva (Carrasquinho, 2009).

1. A aquacultura no Mundo

A aquacultura mundial tem aumentado nas últimas décadas embora a uma taxa de crescimento relativamente moderada (6,2 % no período de 2000 a 2012). Em 2012, a produção mundial totalizou cerca de 90,4 milhões de toneladas, das quais 66,6 milhões de toneladas são referentes à produção de peixe e 23,8 milhões de toneladas à produção de plantas aquáticas. Esta produção representa cerca de 42,2%, de um total de 158 milhões de toneladas de peixe produzido por capturas da pesca e pela produção aquícola (FAO, 2014) e estima-se que a contribuição da aquacultura para o fornecimento de peixe para consumo humano aumente 65% até 2030 (Cabral, 2014).

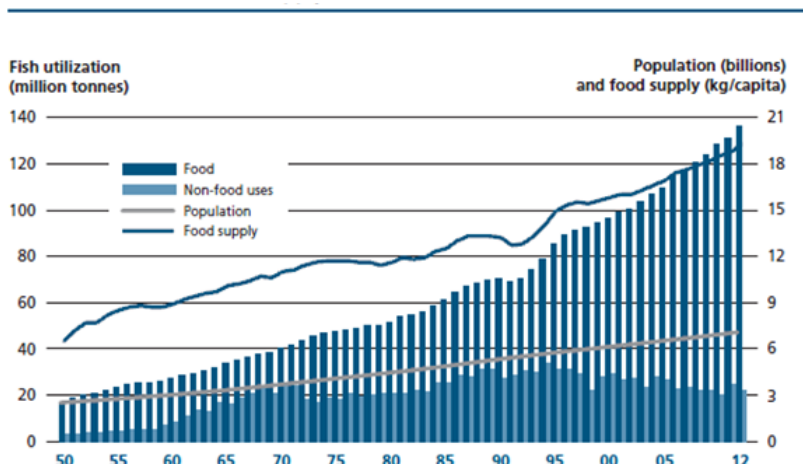


Figura 1 - Utilização de peixe (em milhões de toneladas) comparativamente à população (em bilhões) e o fornecimento de peixe (kg/capita) (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2014).

O aumento da procura de produtos marinhos deve-se principalmente a uma maior consciencialização do valor nutricional do peixe, bem como pela crescente preocupação por uma alimentação saudável e cuidada. Uma porção de 150 g de peixe pode fornecer cerca de 50-60% dos requisitos proteicos diários de um adulto. Em 2010, o pescado contabilizou 16,7 % do total de proteína animal consumida pela população mundial. A proteína de peixe representa uma componente nutricional crucial em alguns países densamente populosos onde a ingestão de proteína é baixa (FAO, 2014). Globalmente, o consumo de peixe *per capita* é de 18,9 kg por ano, na União Europeia é de 23,1 kg e em Portugal de 56,7 Kg (Fisheries – European Commission, 2014).

Atualmente, os maiores países produtores centram-se na Ásia, com 54% da produção mundial, na Europa com 18% e nos restantes continentes com menos de 15% da produção. No entanto, tem-se assistido a uma diminuição da produção de peixe em alguns países como nos Estados Unidos da América, em Espanha, na França, em Itália, no Japão e na República da Coreia, bem como à diminuição da produção de moluscos nalguns deles. O principal fator apontado para este decréscimo na produção aquícola é a grande disponibilidade de peixe importado de países onde os custos de produção são relativamente baixos, apresentando por isso preços de mercado bastante competitivos

(FAO, 2014). Torna-se assim necessário fomentar a diversificação das espécies produzidas em aquacultura (Dinis et al., 1992).

O número total de espécies produzidas, em todo o mundo, é relativamente elevado, estando mais de 567 espécies registadas, entre peixes ósseos, moluscos, crustáceos, anfíbios e répteis, invertebrados aquáticos, algas marinhas e de água doce. Em 2012, a aquacultura mundial foi dominada pela produção de peixes de água doce, com 33,7 milhões de toneladas (63% da produção mundial); moluscos, com 15,2 milhões de toneladas (22,8 %); crustáceos, com 6,4 milhões de toneladas (9,7%); e outras espécies aquáticas com 900 000 toneladas (1,3 %) (FAO, 2014).

2. A aquacultura em Portugal

Portugal é um país europeu com um vasto território marinho e com um património natural e cultural excepcional relativamente ao mar. No Plano de Estratégia Nacional para o Mar 2013-2020 estão, inclusivamente, descritos planos para o desenvolvimento de atividades de investigação e inovação relacionados com a fileira da pesca e da aquacultura (DGPM, 2013). No entanto, a contribuição da produção de peixe em território português para consumo humano é ainda muito baixo, representando apenas 3% do peixe consumido comparativamente à Europa, cujo valor ascende a 50% (Cabral, 2014).

Relativamente aos regimes de exploração, em Portugal, a aquacultura em água doce é exclusivamente intensiva. Na produção em águas marinhas e salobras, 54,7% é em regime extensivo, 34,7% em regime intensivo e 10,7% em regime semi-intensivo (INE e DGRM, 2015).

Em 2013, a produção em águas salobras e marinhas contabilizou a fatia mais importante na produção total portuguesa, representando cerca de 92% do total produzido (41,9% de peixe e 50% na produção de moluscos bivalves, com a amêijoia como a espécie mais relevante) (INE e DGRM, 2015).

As espécies mais produzidas em águas salobras ou marinhas portuguesas são o pregado (*Psetta maxima*), com uma produção total de 2 353 toneladas, seguido da dourada (*Sparus aurata*), com uma produção total de 1 201 toneladas, o robalo (*Dicentrarchus labrax*), com 455 toneladas e o linguado (*Solea spp.*) com uma produção anual de 154 toneladas. Em águas doces a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é de longe a espécie mais produzida em Portugal com cerca de 771 toneladas de produção, seguida da truta comum (*Salmo trutta*) com apenas 1 tonelada de produção. No grupo dos moluscos e crustáceos, as amêijoas (*Venerupis pullastra* e *Ruditapes decussatus*) são as mais produzidas, com 2 372 toneladas (Tabela 1) (INE e DGRM, 2015).

Tabela 1 - Produção aquícola nacional em águas interiores e oceânicas por tipo de água, regime e espécie (INE e DGRM, 2015).

Principais espécies		Águas doces, salobras e marinhas							
		Total		Extensivo		Intensivo		Semi-intensivo	
		t	1000 Euros	t	1000 Euros	t	1000 Euros	t	1000 Euros
Portugal	2012 Rv	10 939	52 181	4 472	22 057	1 540	5 924	4 927	24 199
	2013	9 955	53 796	5 018	28 746	3 954	18 804	982	6 246
Águas doces		772	1 897	0	0	772	1 897	0	0
Truta arco-íris		771	1 890	0	0	771	1 890	0	0
Truta comum		1	7	0	0	1	7	0	0
Águas salobras e marinhas		9 183	51 899	5 018	28 746	3 182	16 908	982	6 246
Peixes		4 171	23 088	31	176	3 182	16 908	958	6 004
Corvina		5	25	0	0	5	24	e	1
Dourada		1 201	6 036	25	139	632	2 630	543	3 267
Linguado		154	2 035	1	7	150	1 975	4	53
Pregado		2 353	12 078	0	0	2 353	12 078	0	0
Robalo		455	2 902	4	25	42	200	409	2 677
Outros		2	12	1	5	0	0	1	7
Moluscos e Crustáceos		5 012	28 812	4 987	28 570	0	0	25	242
Amêijoas (a)		2 372	25 283	2 351	25 049	0	0	21	234
Mexilhões nep		1 547	961	1 547	961	0	0	0	0
Ostra japonesa		837	2 173	837	2 173	0	0	e	e
Ostra portuguesa (a)		158	312	157	309	0	0	1	3
Outros		98	84	95	78	0	0	3	5

(a) Espécies de regime extensivo, produzidas em pisciculturas de tipo misto (extensivo e semi-intensivo) classificadas como semi-intensivas em função do regime de produção predominante.

No ano de 2013 verificou-se que a produção da aquacultura gerou uma receita de 54 milhões de euros, tendo sofrido um redução em quantidade, cerca de 9% relativamente a 2012, e um acréscimo em valor, cerca de 3,1% relativamente ao mesmo ano, o que é explicado pelo facto de ter existido uma menor produção de pregado mas o valor atribuído ao produto de aquicultura ter aumentado (INE e DGRM, 2015). Relativamente aos estabelecimentos licenciados em 2013, existiram menos 11 unidades comparativamente a 2012 mas, regista-se um aumento significativo na área total dos estabelecimentos o que ainda não se repercutiu na produção, pois os

estabelecimentos só começam a produzir passado um ano e meio a 2 anos. A aposta nas espécies cultivadas em solo português é de importância crucial para o desenvolvimento e inovação tecnológica do mercado nacional (INE e DGRM, 2015).

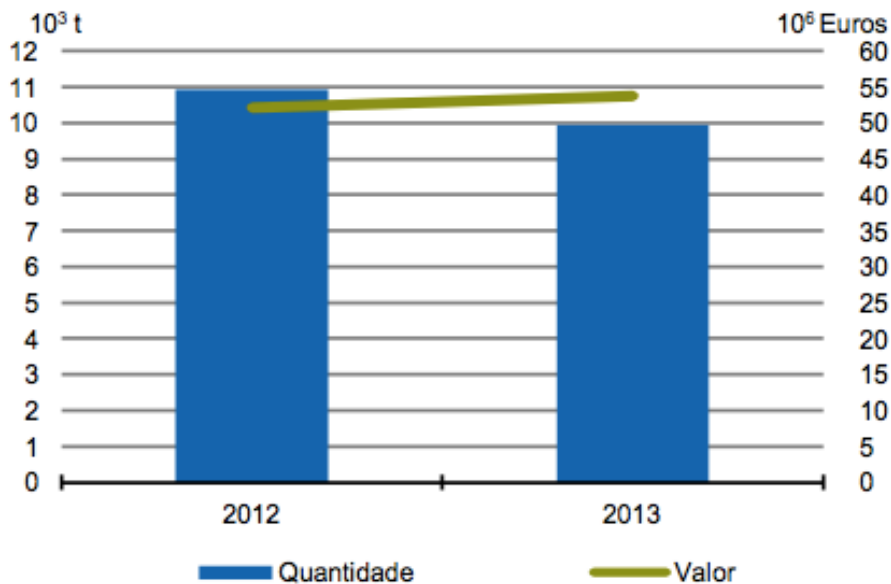


Figura 2: Produção aquícola nacional em 2012 e 2013, em quantidade em valor (INE & DGRM, 2015).

3. Biologia e produção do Linguado do Senegal (*Solea senegalensis*, kaup, 1858)

O linguado do Senegal (Figura 3), é uma espécie de peixe marinho, bentónico, comum nas águas tropicais do Sul do Senegal até águas temperadas no Golfo da Biscaia (Anguis e Cañavate, 2005), e por isso bem adaptado a climas quentes (Dinis et al., 1992). Pertence à classe Actinopterygii, Ordem Pleuronectiformes, Família Soleidae e Género Solea (Fishbase, 2014). Esta espécie, muito semelhante à solha (*Solea vulgaris*) (Dinis et al., 1999), caracteriza-se por ter um corpo oval e achatado, com ambos os olhos no lado direito e nesta face, o corpo apresenta uma cor castanha-acinzentada com manchas azuladas enquanto na outra face apresenta uma coloração

branca-amarelada (Andrade, 2012). A barbatana dorsal e anal é fundida na base da barbatana caudal e, em águas Atlânticas o comprimento máximo desta espécie é de 60 cm e no Mediterrâneo 45 cm atingindo um peso até 3 kg (Villanueva e Alonso, 2014). Na natureza alimenta-se principalmente de poliquetas (*Hediste diversicolor*), mas também pode alimentar-se de anfípodes, copépodes e isópodes (Dinis et al., 1999). É considerado um mau nadador, de atividade noturna, permanecendo enterrado durante o dia e é capturado com artes de pesca de tresmalho e arrasto de fundo (Villanueva e Alonso, 2014).



Figura 3: Exemplo de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) (Villanueva e Alonso, 2014).

É uma espécie gonocórica sem caracteres sexuais externos diferenciados, pode desovar durante todo o ano mas apresenta normalmente duas épocas de reprodução, uma primeira na Primavera, de Fevereiro a Junho e uma segunda de Setembro a Novembro. A primeira maturação das fêmeas ocorre por volta dos três anos de idade, em indivíduos com um tamanho de 25-30 cm (Ortega, 2012) e podem produzir cerca de 28 000 oócitos/kg de fêmea (Villanueva e Alonso, 2014). A temperatura desempenha uma função importante no começo e duração do período da desova com a emissão de

ovos a cessar em temperaturas inferiores a 16°C (Dinis et al., 1999). Os ovos medem entre 0,9-1mm de diâmetro e apresentam numerosos aglomerados lipídicos que formam uma espiral dentro do ovo (Villanueva e Alonso, 2014).

A temperatura e a salinidade afetam, também, a duração do período de incubação dos ovos, que no seu meio natural é geralmente de uma semana, a flutuabilidade dos ovos e das larvas. Sendo os ovos desta espécie pelágicos, têm como característica principal a flutuabilidade devido ao processo de hidratação que ocorre durante a reprodução (Matusse, 2012).

Após a eclosão dos ovos, as larvas são pelágicas e com simetria bilateral até à altura da metamorfose, entre os dias 10 e 20 após a eclosão. Nesta altura, há a migração do olho esquerdo para o lado direito e modificações ao nível do crânio e algumas conexões nervosas, tornando-se um juvenil assimétrico e bentónico (Ortega, 2012). Na natureza, os juvenis dependem largamente de áreas interditaes, estuários, e águas pouco profundas e fazem apenas migrações limitadas (Dinis et al., 1999).

Em Portugal, o linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) assume elevada importância a nível comercial. Estes peixes apresentam elevada demanda a nível comercial e por isso um alto valor no mercado (Ortega, 2012), apresentam também um crescimento competitivo relativamente ao de outras espécies produzidas em cativeiro. Por esta razão e adicionando o fato de muitas espécies hoje produzidas em aquacultura apresentarem saturação de mercado, o linguado senegalês é uma espécie com claras vantagens para uma produção industrial (Imsland et al., 2003; Villanueva e Alonso, 2014).

Esta espécie é tradicionalmente produzida em sistemas de regime extensivo, em Portugal e Espanha (Dinis et al., 1999), contudo recentemente observou-se uma intensificação do regime de sistema de cultivo devido à intensa aposta tecnológica e científica na área de produção de linguado (Villanueva e Alonso, 2014). No entanto, apesar da grande aposta na produção desta espécie ainda existem alguns problemas como, o desenvolvimento de dietas adequadas, sistemas adequados de recirculação e de cultivo, controlo das patologias e da reprodução. Todos estes fatores ainda necessitam de ser aprimorados para uma melhor rentabilidade das empresas e para uma imagem mais sustentável da aquacultura de linguado.

Em cativeiro, a desova viável é apenas conseguida a partir de reprodutores selvagens, uma vez que as posturas da geração F1 são inviáveis, ao contrário das posturas obtidas a partir de linguados selvagens, depois de devidamente aclimatados (Ortega, 2012). Assim, atualmente, a obtenção de ovos viáveis em cativeiro só pode ser alcançada com uma desova natural em tanques (Dinis et al., 1999). No entanto, em unidades piscícolas, o stock de reprodutores é normalmente constituído por indivíduos capturados com a arte de tresmalho o que pode provocar algumas lesões graves nos indivíduos, sendo necessário tratar na sua estabulação de forma a evitar mortalidades (Villanueva e Alonso, 2014). Os reprodutores são capturados do meio natural, entre Julho e Dezembro, altura entre o período de desova, uma vez que as fêmeas maduras têm uma baixa sobrevivência ou podem reabsorver as gónadas após a captura. A indução da desova é efetuada mediante a manipulação do fotoperíodo e da temperatura da água, uma vez que o recurso a tratamento hormonal parece não se aplicar de forma corrente a esta espécie.

Apesar dos grandes avanços tecnológicos realizados na área da produção de linguado, ainda não foi possível a desova do cruzamento da descendência F1 (primeira descendência resultante da desova dos reprodutores selvagens), em quantidades suficientes para obtenção de um número de ovos e larvas viáveis para uma produção sustentável, a dispersão entre os lotes da produção é muito grande, o que acresce as dificuldades no cultivo desta espécie (Villanueva e Alonso, 2014).

II – Estágio na aquacultura Safiestela (Sustainable Aquafarming Investments Lda.)

1. A empresa

A Safiestela é uma empresa de produção intensiva de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*), localizada no Lugar do Rio Alto, no concelho da Póvoa de Varzim. A Safiestela, juntamente com a Aquacria Piscícolas, S.A, localizada na Torreira, pertencem ao grupo espanhol Sea8.

Inicialmente, esta empresa possuía apenas um polo de produção, localizado na Torreira e dedicava-se à engorda de juvenis de pregado (*Psetta maxima*), adquiridos a uma maternidade em Espanha. No entanto, depois do aparecimento de uma empresa de grandes dimensões, a Acuinova, empresa do grupo Pescanova, também produtora de pregado, gerou-se uma elevada concorrência que levou a Sea8 a apostar na diversificação das espécies produzidas, passando a produzir linguado senegalês (*Solea senegalensis*). Entretanto o grupo Sea8 decidiu apostar fortemente em Portugal adquirindo a empresa localizada na Estela, a atual Safiestela, com o objetivo de fechar todo o ciclo de produção do linguado senegalês.

Atualmente, o grupo Sea8 organiza a sua produção da seguinte forma: produção em massa de juvenis realizada na Safiestela (Póvoa de Varzim), com capacidade de produção de 1 milhão de juvenis, e a engorda e comercialização na Aquacria Piscícolas (Torreira), com capacidade de produção de 400 toneladas de linguado por ano (Sea8, 2015). O ciclo de produção do linguado inicia-se no polo-Safiestela, com a reprodução de reprodutores capturados no meio natural, ao longo de todo o ano, mediante o controlo do fotoperíodo e da temperatura da água. Segue-se a produção de larvas, em regime de circuito de água aberto e a pré-engorda em *raceways* dispostos verticalmente, em circuito fechado de recirculação de água. Os sistemas de recirculação de água em aquacultura (RAS) oferecem inúmeras vantagens à empresa mas são

sistemas complexos que implicam um alto investimento e que necessitam de um controlo aprimorado em condições relacionadas com o controlo da qualidade da água. Posteriormente, para a fase de engorda, os juvenis de linguado, com cerca de 5 meses de idade, são transferidos para a Aquacria, localizada na Torreira (Sea8, 2015).

Atualmente o grupo Sea8 é o líder de produção de linguado, no mercado português e face ao forte investimento efetuado, em ambos os polos de produção, é de prever que muito em breve este grupo de produção terá um contributo muito importante para a produção aquícola na Península Ibérica. O facto de ser uma empresa totalmente autónoma na produção de linguado, uma vez que cobre todo o ciclo de produção desta espécie, constitui uma grande vantagem empresarial, não estando condicionada pela disponibilidade e preço de mercado de juvenis.

2. Estrutura da Safiestela

A empresa Safiestela está dividida em salas com diferentes fases do ciclo de produção do linguado, nomeadamente a sala de reprodutores, sala de incubação, sala de desenvolvimento larvar, sala de cultivo de rotíferos, sala de cultivo de artémia, zona de desmame (desmame 1 e desmame 2) e zona da pré-engorda e área das máquinas.

A zona da pré-engorda funciona em sistema de recirculação de água fechado ou semifechado. Os sistemas de recirculação de água em aquacultura (RAS) são sistemas em que as trocas de água com o exterior são minimizadas permitindo uma reutilização parcial, ou mesmo quase total, da água após tratamento dos efluentes. Esta característica torna-os consideravelmente vantajosos, particularmente a nível ambiental, um tema com grande destaque na indústria de produção intensiva de peixes.

2.1 Sistema de Recirculação em Aquacultura (RAS)

Nos últimos anos, com a intensificação da produção aquícola assiste-se, também, ao aumento do impacto ambiental, levantando preocupações relativamente à sustentabilidade destes sistemas de produção a nível mundial (Zhang et al., 2011). Atualmente são inúmeros os problemas de sustentabilidade da prática da aquacultura

intensiva, como o uso de farinha e óleo de peixe nas rações, a diminuição da biodiversidade de populações naturais causada pela fuga de espécies não nativas de peixes de jaulas flutuantes, a poluição de águas superficiais e subterrâneas devido à descarga de efluentes (Martins et al., 2010; Rijn, 2013) ou falta de água com qualidade para uso na produção (Badiola et al., 2012). Por forma a aumentar a sustentabilidade ambiental deste tipo de atividade e face ao aumento da competição por espaços viáveis para a implementação de empresas (Piedrahita, 2003; Badiola et al., 2012) surgiram, no final dos anos 80, os sistemas de recirculação em aquacultura (RAS) (Martins et al., 2010).

Estes sistemas consistem numa reutilização parcial da água após tratamento dos efluentes, através de processos físicos, químicos e biológicos onde a água depois de tratada é reutilizada na produção. O RAS permite uma reutilização de 90-99% da água implicando uma redução substancial no consumo de água, permite maior controlo dos parâmetros ambientais e da qualidade de água e uma melhor gestão de desperdícios (Badiola et al., 2012; Martins et al., 2010). Apesar destas características vantajosas para a produção aquícola, o RAS padece de algumas desvantagens como o alto investimento necessário (Badiola et al., 2012, Martins et al., 2010), elevados custos operacionais, pois como a água necessita de ser constantemente bombeada origina um custo de eletricidade elevado, sendo este custo maior quanto maior a percentagem de reutilização, bem como requerem uma gestão cuidada no controlo de doenças ou surtos (Badiola et al., 2012). Todos estes fatores implicam que estes sistemas não sejam aplicados ao cultivo de todas as espécies ou adequado a todos os locais (Piedrahita, 2003), mas sim em produções intensivas de espécies com alto valor comercial (Gutierrez-Wing e Malone, 2006).

Apesar do crescente interesse por este tipo de sistemas, em 1986 foram produzidas apenas 300 ton as quais aumentaram até 23 463 ton em 2003, requerem uma gestão criteriosa e em muitos casos muitos destes sistemas foram afetados pela má gestão e mau design (Badiola et al., 2012). Atualmente são produzidas mais de 10 espécies em RAS, tanto peixes de água doce como o peixe-gato africano (*Clarias gariepinus*), a enguia (*Anguilla anguilla*) e a truta (*Salmo trutta*) ou espécies de água

salgada como o rodovalho (*Scophthalmus rhombus*), o linguado (*Solea spp.*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Martins et al., 2010).

A configuração geral de um sistema RAS de recirculação em aquacultura compreende uma unidade de filtração mecânica, um filtro de tambor e um filtro biológico para a nitrificação, podendo ainda compreender uma unidade de tratamento de água pela luz ultra-violeta (Schneider et al., 2012) e ozono (Rijn, 2013).

A qualidade da água é sempre multi-fatorial em RAS, pois a nitrificação influencia o pH, o total de azoto sob a forma de amónia e as concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-). A carência química de oxigénio (COD – “chemical oxygen demand”) avalia a quantidade de matéria orgânica suscetível de ser oxidada e portanto pode ser usado como um indicador da qualidade da água. O recurso a um “skimmer” de proteína, com uma aplicação de ozono, pode diminuir a carga orgânica da água, melhorando diversos parâmetros da qualidade da água como a turbidez, o nível de oxigénio dissolvido, o total de azoto na forma dissolvida, a contagem de bactérias, entre outros (Schneider et al., 2012).

2.1.1. Remoção de resíduos sólidos

Os efluentes de uma piscicultura são constituídos por matéria orgânica dissolvida (DOM) ou particulada (POM), nutrientes como o azoto (N), a maioria libertado na forma dissolvida como amónia, e o fósforo (P), a maioria sob a forma particulada. Estes resíduos proveem maioritariamente na ração não ingerida e dos desperdícios fecais dos peixes (Piedrahita, 2003). Com o avanço tecnológico foi possível, nas últimas décadas, melhorar o índice de conversão de alimento (FCR), e portanto diminuir a carga de matéria orgânica presente no efluente (Piedrahita, 2003; Martins et al., 2010).

A matéria fecal acompanhada de ração não consumida pelos peixes são metabolizadas por bactérias presentes no sistema e que consomem oxigénio. Para minimizar este impacto, é necessário retirar estes sólidos da água o mais rapidamente possível através da limpeza diária dos tanques (Ebeling et al., 1995). Os resíduos sólidos podem ser caracterizados como, sólidos que sedimentam rapidamente (uma

hora em condições estáticas), sólidos em suspensão, sólidos flutuantes e sólidos dissolvidos. Os sólidos que sedimentam facilmente são removidos do sistema, como foi referido anteriormente, através da limpeza diária dos tanques, os sólidos em suspensão têm de passar numa filtração mecânica que pode ser de dois tipos, filtração através de uma tela, ou filtração num meio granular (areia ou tela) (Ebeling et al., 1995).

Os sólidos finos e dissolvidos não são facilmente removidos através da filtração mecânica (Ebeling et al., 1995). Usa-se um processo de fracionamento por espuma, mais conhecido como escumação ou “protein skimming” (Crab et al., 2007). Neste processo, a água entra numa coluna, onde são introduzidas bolhas de ar em baixo, criando uma espuma no interface ar/água. As partículas finas e os sólidos em suspensão agarram-se à superfície das bolhas criando a espuma no topo da coluna (Ebeling et al., 1995).

Este processo é o primeiro passo dos sistemas de recirculação em aquacultura. No caso dos filtros de areia é necessário realizar uma limpeza regular, fazendo um “backwash”, ou seja, passando a água pelos filtros de areia no sentido contrário de modo a que os resíduos retidos sejam eliminados.



Figura 4: Tambor rotativo de filtração de rede num sistema de recirculação de água em aquacultura (RAS) (Sea8, 2015).

2.1.2. Azoto

Os peixes estão enzimaticamente e metabolicamente bem preparados para usarem a proteína como fonte de energia, ao contrário dos animais terrestres que utilizam na sua maioria hidratos de carbono e lípidos. Contudo, do metabolismo proteico para fins energéticos resulta, maioritariamente amónia, sendo excretada pelas brânquias e urina (Moreira et al., 2001). O total de azoto sob a forma de amónia (“Total ammonium nitrogen” – TAN) consiste na soma da amónia ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3) estando ambos em equilíbrio na água. O TAN é excretado nas brânquias dos peixes como resultado da assimilação de alimento (subproduto do metabolismo de proteínas) e é produzido quando as bactérias decompõem sólidos orgânicos dentro do sistema (Ebeling et al., 1995). Embora as duas formas de amónia sejam tóxicas para os peixes, a forma não ionizada (NH_3) é mais nociva pois é solúvel em lípidos, atravessando as membranas mais rapidamente que a forma ionizada (Crab et al., 2007). A toxicidade depende do tipo e tamanho da espécie, não devendo exceder os 0,025 mg N/l (Crab et al., 2007). A amónia deve ser eliminada do sistema a um ritmo igual ao ritmo da sua produção para manter uma concentração segura (Ebeling et al., 1995).

As bactérias nitrificantes (nitrosomonas) são a base da filtração biológica e utilizam a amónia como fonte de energia para produzir nitrito (NO_2^-). Apesar do nitrito não ser tão tóxico para os peixes como a amónia, é prejudicial, não devendo exceder os 0,5 mg/l e necessita de ser removido do sistema. As bactérias do género *Nitrobacter* utilizam o nitrito como fonte de energia e produzem nitrato como subproduto. O nitrato não é um problema para os piscicultores uma vez que as espécies aquáticas toleram concentrações altas, cerca de 100 mg/l, concentração que normalmente não é alcançada em sistemas de recirculação (Ebeling et al., 1995). No entanto, uma acumulação de nitratos no sistema pode implicar menor crescimento, maior suscetibilidade a doenças, desenvolvimento mais lento, baixa fertilidade e menores taxas de sobrevivência (Gutierrez-Wing e Malone, 2006).

O nitrato é normalmente retirado do sistema ou pela remoção de sólidos sedimentados ou através do *backwash* dos filtros ou por desnitrificação. A desnitrificação consiste na redução dos nitratos até ao estágio de azoto molecular (N_2),

na ausência de oxigénio por bactérias do género *Pseudomonas*. Este azoto molecular é depois libertado para a atmosfera através da aerificação (Ebeling et al., 1995).

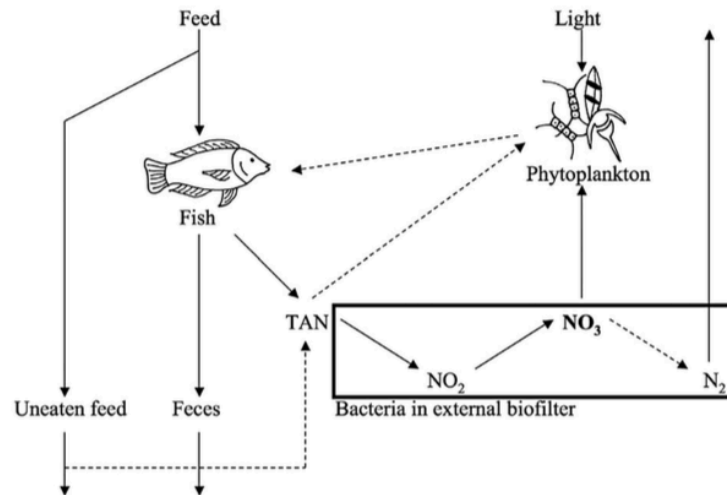


Figura 5: Imagem esquemática do ciclo de azoto em sistemas equipados com filtros biológicos (Crab et al., 2007).

2.1.3. Oxigenação e remoção de dióxido de carbono

A injeção de oxigénio puro em aquacultura tem sido usada desde os anos 70, com o objetivo de aumentar a concentração de oxigénio dissolvido e, desse modo, conseguir intensificar a produção, permitindo um aumento da competitividade no mercado. A injeção de oxigénio puro retira o oxigénio como fator limitante da produção, conseguindo-se aumentar a biomassa de peixe suportada por tanque e maiores taxas de alimentação, redução da taxa de renovação de água no sistema, diminuindo assim os custos e tamanho da canalização e tanques de cultivo, originando uma diminuição no custo total de produção (Summerfelt et al., 2000).

A configuração do sistema de recirculação determina o tipo de unidade de oxigenação a ser implementada na produção. As unidades de transferência de oxigénio podem ser de dois tipos, abertas ou fechadas. As unidades abertas operam à pressão

atmosférica e podem ser, oxigenadores de múltiplos estágios de baixa pressão, colunas de enchimento e torres de pulverização. As unidades fechadas operam a uma pressão superior à atmosférica, como os tubos em U, colunas seladas, cones de oxigénio e aspiradores de oxigénio (Summerfelt et al., 2000).

Com o recurso à injeção de oxigénio puro, a aerificação da água é reduzida e portanto é comum encontrar concentrações elevadas de dióxido de carbono na água, que seria eliminado pela aerificação da água ou pela renovação de água. Níveis seguros de dióxido de carbono dependem da espécie, da altura do ciclo de vida e outros parâmetros de qualidade da água como, alcalinidade, pH e níveis de oxigénio dissolvido. Níveis elevados deste composto podem diminuir a capacidade de transporte de oxigénio da hemoglobina no sangue (efeito de Bohr), diminuir a capacidade de ligação de oxigénio no sangue (efeito de Root) e aumentar a acidez do sangue. Por estes motivos, o dióxido de carbono necessita de ser removido da água por um sistema de “air-stripping”, adição de ar na água ou com adição de químicos (Summerfelt et al., 2000).



Figura 6: Sistema de filtração biológica (biofiltros com “bio-bolas”) com injeção de ar num sistema de recirculação de água em aquacultura (RAS) (Sea8, 2015).

2.1.4. Desinfecção da água - ozono e luz ultravioleta

O ozono e a radiação ultravioleta são métodos de desinfecção que têm sido aplicados em aquacultura no sentido de melhorar a qualidade da água em sistemas de recirculação. O ozono é adicionado aos sistemas não só com o objetivo primário de inativação dos microrganismos patogénicos de peixes, mas também como suplemento de outras unidades de tratamento pois, oxida os nitritos a nitratos, oxida moléculas orgânicas grandes e complexas criando moléculas mais pequenas e por isso mais biodegradáveis (Summerfelt, 2003), reduz a turbidez da água afetando também a sua cor, controlo de algas e melhora a micro-floculação de partículas finas (Summerfelt, 2003; Sharrer e Summerfelt, 2007).

A aplicação de ozono em aquacultura requer a geração de ozono, transferência para a solução, tempo de contacto para reação, e destruição de ozono residual de forma a assegurar que este não entra nos tanques de cultivo (Summerfelt et al., 2003).

O ozono é um método eficaz para eliminar bactérias, parasitas e alguns vírus. A eliminação destes organismos passa por uma oxidação da bi-camada lipídica da comunidade microbiana e a sua eficiência depende do produto da concentração de ozono residual pelo tempo de contacto com a água (Sharrer e Summerfelt, 2007).

O ozono reage com o brometo nos sistemas de água salgada formando compostos estáveis e tóxicos para os peixes. O ozono residual é tóxico para os peixes em concentrações baixas, 0,01 mg/l, sendo este valor variável consoante as espécies ou estádios de vida. Este pode ser eliminado aumentando o tempo de contacto com a água, por aerificação, passando numa coluna de aeração ou desgaseificação, adicionando peróxido de hidrogénio à solução, aplicando pequenas doses de tiosulfato de sódio, com carvão ativado, ou utilizando doses intensas de radiação ultravioleta com comprimentos de onda compreendidos entre 250 a 260 nm. Estas radiações catalisam a conversão de O_3 para O_2 (Summerfelt, 2003).

A radiação ultravioleta não é considerada um processo complementar a outras unidades de tratamento sendo apenas usada para a desinfecção da água (Summerfelt, 2003). A luz ultravioleta inativa os microrganismos pela destruição dos ácidos nucleicos

e é também, como já foi referido, é eficiente na destruição de ozono dissolvido (Sharrer and Summerfelt, 2007).

2.2 - Sala de reprodutores

Em produções intensivas, a obtenção de ovos e larvas em números viáveis é apenas alcançada através da captura, aclimação e indução de posturas em indivíduos capturados do meio selvagem. Indivíduos criados em cativeiro, descendentes de peixes selvagens (gerações F1) têm a sua reprodução comprometida uma vez que os ovos recolhidos não são fecundados (Norambuena et al., 2012). Na Safiestela, a obtenção de ovos e larvas para a produção é feita através a partir de indivíduos selvagens ou provenientes de outras aquaculturas nacionais em tanques de terra, com tamanho de maturação adequado.

O protocolo do manejo dos reprodutores, na fase de reprodução, da Safiestela é semelhante ao descrito na bibliografia. Assim, no período de aclimação, estes são colocados em tanques a uma densidade baixa de 1-1,5 kg/m² e a uma temperatura da água entre 13°C e 23°C (Dinis et al., 1999; Anguis e Cañavate, 2005), numa área sem ligação direta à restante produção. A salinidade varia entre 33-35‰ (Imsland et al., 2003) e esta fase pode exceder os 12 meses. Neste período, a sua alimentação é baseada em poliquetas (*Nereis diversicolor*) e mexilhão *ad libitum* e é gradualmente feita uma adaptação ao alimento semi-húmido (Cardinaletti et al., 2009; Villanueva e Alonso, 2014), sendo alimentados todos os dias. Como estes peixes são normalmente capturados noutras instalações de produção de dourada ou robalo em tanques de terra (Villanueva e Alonso, 2014), por vezes os peixes ficam com lesões graves, sendo necessário retirar os peixes mortos do tanque sempre que necessário.

Depois da respetiva estabulação dos reprodutores, todos os indivíduos são sujeitos a uma recolha de sangue, são pesados e medidos, e é-lhes injetado um chip de identificação na musculatura dorsal da pele, com um número específico para cada reprodutor. As análises de sangue servirão para rastrear possíveis doenças bacterianas ou víricas e fazer uma diferenciação sexual dos reprodutores através da presença de vitelogenina no sangue antes dos reprodutores serem distribuídos pelos tanques de

produção.

Na Safiestela, por motivos de controlo sanitário os reprodutores são mantidos em tanques quadrados com esquinas arredondadas sem substrato e estão divididos por estações do ano em 4 salas (Primavera, Verão, Outono e Inverno). Cada sala é constituída por três ou quatro tanques com cerca de 15 a 22 indivíduos por tanque e uma razão de machos e fêmeas de 1:1. Os reprodutores são alimentados à base de alimento húmido, fornecido à taxa de 5% do peso vivo por dia. Na altura da maturação sexual os reprodutores podem ser alimentados também com poliquetas (*Hediste diversicolor*) ou mexilhão (*Mytilus edulis*).

Todas as salas à exceção da sala de Verão funcionam em sistema de recirculação de água e temperatura controlada. A água sai do sistema para os reservatórios, específicos de cada sala (Primavera, Outono e Inverno), passa nos filtros de areia, filtro biológico, sofre desinfeção por luz UV e volta aos tanques. Em cada reservatório é adicionada constantemente uma pequena percentagem (1%) de água nova.

A alimentação dos reprodutores é de extrema importância uma vez que a qualidade dos ovócitos, esperma e estado sanitário dos animais depende de uma alimentação cuidada e equilibrada (Villanueva e Alonso, 2014). A preparação do alimento semi-húmido para os reprodutores é realizada na própria empresa (figura 7), diariamente, utilizando uma pré mistura de dieta apropriada a reprodutores e cuja preparação é finalizada nas instalações da Safiestela. A ração é finalizada, misturando a pré-mistura com óleo de peixe (cerca de 7g de óleo por cada 100g de pré-mistura) e água e de seguida granulada, a frio, conforme indicado na figura 7. Os peixes são alimentados manualmente uma vez por dia, normalmente ao final da manhã e a quantidade de alimento fornecido depende da temperatura da água.



Figura 7: Alimento semi-húmido de reprodutores de linguado, fabricado na empresa. Quando sai da máquina (imagem da esquerda), e em pellets de 1 grama, pronto para a alimentação dos reprodutores (imagem à direita). Fotografia tirada por Marta Pinto.

No meio natural as desovas ocorrem a temperaturas entre 15 e 22 °C. Em ambiente empresarial, a reprodução é assegurada durante todo o ano devido a um controlo rigoroso da temperatura e do fotoperíodo. O nome designado a cada sala indica a altura do ano em que as desovas são estimuladas, ou seja os reprodutores da sala de Outono desovam durante o Outono, fazendo três ou mais ciclos de reprodução por sala. Para tal, a temperatura é aumentada gradualmente, dois graus a cada 24 horas, e o fotoperíodo regulado de forma a mimetizar o fotoperíodo do meio natural. A desova ocorre, normalmente, durante a noite (Villanueva e Alonso, 2014).

Aquando da desova, o coletor de ovos, acoplado a cada tanque, recolhe os ovos por filtração da água de saída do tanque, que é encaminhada para o sistema de recirculação. Os filtros que são colocados nos coletores possuem uma malha inferior (400 μm) às dimensões dos ovos, que têm cerca de 800 μm .

As rotinas diárias na zona das salas de reprodutores envolvem, como já foi referido, a preparação do alimento e o seu fornecimento, controlo da temperatura e oxigénio dissolvido, a limpeza dos tanques, lavagem e desinfeção do chão. Realiza-se também a limpeza dos filtros de areia (figura 8) por “backwash” fazendo uma inversão do trajeto normal da água nestes filtros para eliminar resíduos acumulados, que vão

para o esgoto e para a descompactação da areia. São verificadas as bombas que transportam a água para o sistema, os filtros UV e a verificação dos permutadores de calor, de aquecimento e de arrefecimento da água.



Figura 8: Zona das máquinas da sala dos reprodutores. Pode-se observar os reservatórios, os filtros de areia e a desinfecção por filtros de luz UV (Sea8, 2015).

2.3 – Sala de incubação

Nos períodos reprodutivos, após a desova, os ovos são recolhidos de manhã com coletores e são pesados. Nesta altura é verificada a viabilidade dos ovos, dependendo da capacidade ou não de flutuarem, ou seja, os ovos não flutuantes não são viáveis. Os ovos viáveis são então colocados a incubar, a uma temperatura controlada a 19°C (Imsland et al., 2003), em tanques cilindro-cónicos (figura 10) com capacidade de 200l. Cada tanque é provido de aerificação ligeira e upwelling contínuo de 0,51 min⁻¹ (Imsland et al., 2003), possuiu também um filtro de 400 µm. Em cada incubadora é colocado, no máximo, 300 gramas de ovos. A salinidade não inibe a desova, mas a menos de 30 ‰ os ovos não flutuam.

Os ovos (figura 9) são esféricos e contém uma gota lipídica dispersa ao largo de

toda a superfície do ovo o que, por vezes, torna difícil a diferenciação de ovos fecundados dos ovos não viáveis. O período de incubação do linguado é dos mais curtos das espécies cultivadas atualmente, com uma duração de 48 horas (Villanueva e Alonso, 2014). Vinte e quatro horas após os ovos serem postos a incubar é retirado o arejamento durante 10 minutos para que os ovos não fecundados se depositem no fundo da incubadora. Nesse momento é realizada uma purga para retirar estes ovos inviáveis, prevenindo assim o aparecimento de microrganismos patogénicos que poderiam comprometer o seu desenvolvimento. Estes ovos são devidamente pesados para contabilizar a taxa de viabilidade de cada desova.

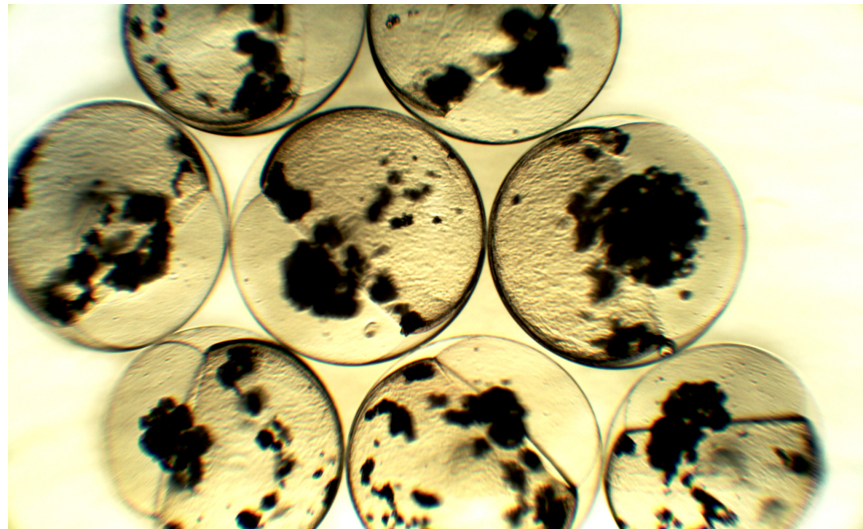


Figura 9: Ovos de linguado fecundados após recolha dos mesmos dos tanques. Vista ao microscópio com uma ampliação de 10x. Fotografia tirada por Marta Pinto.

Os ovos eclodem após 1-2 dias e as larvas são pelágicas, com simetria bilateral e tamanho médio de comprimento de 2.4 ± 1.0 mm, embora este tamanho também possa variar largamente.

Quando as larvas atingem o 2º dia após a eclosão (DAE) é feita uma estimativa do número total de larvas, através da contagem de dez amostras retiradas de cada incubadora com uma pipeta de 10 ml. Nessa fase, as larvas são transferidas para outra sala, a sala de cultivo larvar, onde são distribuídas pelos diferentes tanques. Após a

transferência das larvas, as incubadoras e toda a sala são lavadas e devidamente desinfetadas.

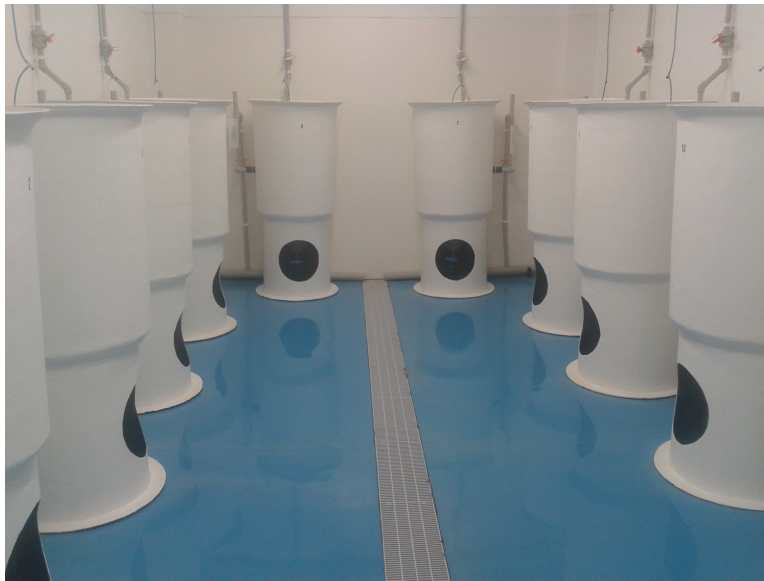


Figura 10: Sala de incubação dos ovos com incubadoras de 200 L (fotografia tirada por Joana Mendes).

2.4 – Sala de cultivo larvar

A fase de cultivo larvar inicia-se no momento após a eclosão, sendo esse considerado o dia 0, as larvas possuem um tamanho médio de $2,4 \pm 0,1$ mm e caracterizam-se por serem pouco ativas, nadando passivamente. Nesta altura ainda não houve abertura da boca (Villanueva e Alonso, 2014). As larvas são transferidas para a sala de cultivo larvar ao dia 2 onde são incubadas a uma densidade de 15 larvas/l, em tanques de fibra de vidro cilindro-cónicos de 2700l, com um filtro central de forma a não permitir a saída de larvas ou alimento. Estes são providos de aerificação e luz artificial. A salinidade é mantida a 35 ‰ (salinidade normal da água captada do mar) e a uma temperatura controlada a 19 °C.

Nos primeiros dias, antes da abertura da boca, as larvas (figura 11) possuem uma alimentação endógena alimentando-se das reservas contidas no saco vitelino

(Villanueva e Alonso, 2014). Quando as larvas atingem um tamanho de $3,34 \pm 0,08$ mm aceitam os náuplios de artémia como alimento vivo (Dinis et al., 1999). Apesar de não existirem diferenças significativas na alimentação das larvas apenas com náuplios de artémia ou a combinação de rotíferos e artémia, a prática comum é a alimentação nos primeiros 3 a 5 dias após a eclosão, com rotíferos (*Brachionus plicatilis*), seguida da combinação de rotíferos e náuplios de artémia (*Artemia salina*) (Imsland et al., 2003) até ao dia 7 ou 8. A partir deste momento são alimentadas com metanáuplios de artémia enriquecidos com misturas comerciais (Villanueva e Alonso, 2014). A alimentação diária é repartida ao longo do dia em 2 a 4 refeições.



Figura 11: Larvas de linguado com saco vitelino e pormenor da abertura da boca (Villanueva e Alonso, 2014).

Nesta fase, o crescimento é muito rápido e as larvas pelágicas ocupando toda a coluna de água. Ao 11º dia após a eclosão iniciam a metamorfose e dirigem-se para o fundo do tanque. A metamorfose é caracterizada pela migração do olho, do lado esquerdo para o lado direito, e torsão dos órgãos internos, tornando-se assimétricas. A metamorfose termina ao 19º dia e as larvas, agora bentónicas possuem um comprimento total de $7,3 \pm 0,8$ mm (Dinis et al., 1999). Após a metamorfose, as larvas são retiradas do tanque através de sifonagem e são transferidas para outra sala, a sala do desmame com tanques quadrangulares e uma altura de água de apenas 20 cm.

As atividades diárias nesta sala envolvem a colocação de pasta de alga (*Nanocloropsis sp.*) até ao dia 6º DAE nos tanques antes da ligação da luz. Neste caso a alga é usada para reduzir o choque, quando a luz da sala é aberta, contribuindo para a aclimação das larvas à intensidade da luz (uma vez que os linguados têm atividade nocturna) e também para o fornecimento de alimento para os rotíferos. Para além disso,

diariamente, monitoriza-se a temperatura da água e oxigénio dissolvido, e realização de amostragens. As amostragens começam no dia 2, após a eclosão, e servem para avaliar o crescimento e alimentação das larvas. É retirada uma amostra de água, com três larvas por tanque, e estas são medidas (comprimento total) e é verificado se existe conteúdo estomacal, indicativo da ingestão de alimento. São também efetuadas contagens de rotíferos e artémia para verificar a quantidade de alimento ingerido. Este último passo é realizado duas vezes por dia para retificar a densidade de alimento nos tanques, fornecido 2 a 4 vezes por dia. O sistema de água é mantido em circuito aberto, mas antes de ser fornecida aos tanques, passa por uma filtração mecânica, por filtros de cartucho e de areia, filtração biológica e desinfecção com ozono e luz ultravioleta.

O cultivo de alimento vivo ou presas, para o início da alimentação exógena das larvas de linguado, é realizado em grandes volumes e são utilizadas espécies que apresentam um crescimento rápido e conseguem alcançar densidades elevadas, garantido assim um fornecimento diário contante. Um problema de cálculo ou manutenção nestas salas traria repercussões enormes à empresa pois levaria a mortalidades massivas das larvas (Ferreira, 2009).

2.5– Sala de produção de alimento vivo: Rotíferos (*Brachionus plicatilis*)

As larvas de peixes marinhos exigem algum cuidado no início da alimentação exógena, uma vez que possuem características especiais e muitas exigências nutritivas relativamente ao alimento ingerido. Esta fase é considerada um período crítico em aquacultura pois a escolha do alimento tem de ser compatível com os mecanismos de captura e predação das larvas, e tem de ter dimensões adequadas à dimensão da sua boca, para permitir uma deteção e ingestão fácil. A quantidade de alimento fornecido também é um fator importante, sendo necessário a avaliação, pelo menos duas vezes ao dia, da densidade de alimento existente nos tanques, de forma a manter a quantidade de alimento vivo existente em cada tanque igual ao ótimo, por forma a facilitar a aproximação e captura das presas pelas larvas, que nesta fase apresentam pouca atividade natatória ao alimento vivo (Ferreira, 2009).

No cultivo de linguado, a prática comum é o início da alimentação exógena de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) ao 3º dia após a eclosão, durante 3 a 5 dias.

Os rotíferos, devido às suas características, são amplamente utilizados como alimento vivo há mais de 25 anos, para culturas larvares de peixes, nomeadamente de larvas de peixes marinhos que são muito pequenas, e para espécies de crustáceos. São pequenos metazoários planctónicos (120-300µm), eurialinos e com grandes tolerâncias às condições ambientais. A sua taxa de crescimento é elevada e conseguem-se cultivar a densidades altas (2000 animais/ml), têm baixa atividade natatória, o que os enaltecem como bons candidatos a alimento vivo de peixes com baixas capacidades natatórias e que esgotaram as suas reservas vitelinas, mas ainda não conseguem digerir presas de maiores dimensões como os náuplios de artémia (cerca de 450 µm). Para além disso, devido à sua característica de animais filtradores não seletivos, a inclusão de nutrientes essenciais nos tecidos é facilitada (Ferreira, 2009). Este processo, designado por bioencapsulação, permite o enriquecimento de rotíferos com produtos comerciais ou emulsões laboratoriais (por exemplo, enriquecimento com ácidos gordos polinsaturados (PUFA, omega-3), vitaminas, proteínas, entre outros) (FAO Fisheries Technical Paper No. 361).

O *Brachionus plicatilis* (figura 12) é uma espécie de rotífero que é usualmente usada em aquacultura. Os *stocks* podem ser obtidos da natureza, de estabelecimentos de investigação ou de produções industriais. Podem ser suplementados com microalgas ou dietas formuladas que, como outros cultivos estão sujeitos a contaminações por agentes patogénicos, erro humano ou outros filtradores competitivos (FAO Fisheries Technical Paper No. 361).

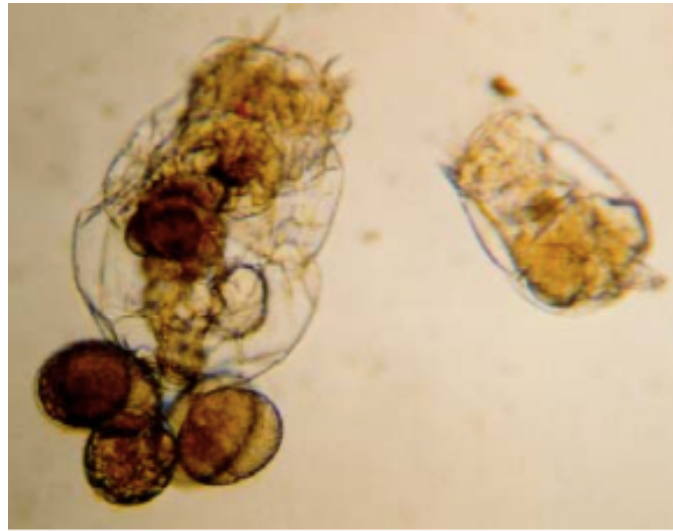


Figura 12: Macho e fêmea com ovos de rotíferos, *Brachionus plicatilis* (Ferreira, 2009).

Na empresa, os rotíferos são produzidos em tanques cilíndricos, numa produção em contínuo, a uma temperatura de 28 °C, salinidade de 24 ‰ com saturação de oxigénio de 80 %. Os rotíferos apresentam um ciclo de vida relativamente pequeno, entre 3,3 e 4,4 dias a 25 °C, são recolhidos por filtração aos 3 dias de idade e depois inicia-se um novo ciclo de produção. São alimentados de forma doseada, várias vezes ao dia (3 a 5), com um preparado de algas e leveduras, a fim de permitir uma boa manutenção da qualidade da água. A qualidade de alimento fornecido irá depender da concentração e da temperatura nos silos (Ferreira, 2009). As tarefas diárias nesta sala prendem-se com o controlo de oxigénio, realizado de quatro em quatro horas, contagens diárias para verificar a concentração e a existência de fêmeas com ovos, pois é através destes que é possível determinar a taxa de crescimento, prever oscilações e declínio da população (Ferreira, 2009). Procede-se também à lavagem dos tanques, do chão e dos pedilúvios.

2.4 - Sala de cultivo do alimento vivo: Artémia (*Artemia salina*)

Os náuplios de artémia (*Artemia sp.*) (figura 13) são o alimento vivo mais usado em culturas larvares. As suas capacidades únicas de formarem embriões dormentes,

designados cistos, conferem-lhes uma vantagem sobre outros alimentos. Os cistos, com cerca de 200-300 μm de diâmetro são ovos em fase de dormência, como resposta a condições adversas no meio ambiente. Estes são recolhidos em lagos hipersalinos ou lagoas e são vendidos secos em recipientes onde apenas é necessário a incubação dos mesmos em água salgada (reidratação dos ovos) e após 24h os cistos eclodem e formam-se os náuplios de artémia (Ferreira, 2009).

Estes animais também podem ser enriquecidos nutricionalmente através da bioencapsulação de produtos particulados ou emulsificados ricos em ácidos gordos insaturados, ou enriquecidos com vitaminas, vacinas ou produtos terapêuticos (FAO Fisheries Technical Paper No. 361).

No mercado existem várias estirpes (organismos da mesma espécie semelhantes mas sem valor taxonómico) de *Artemia sp.* com especificações diferentes no que diz respeito ao tamanho dos ovos e náuplios, perfil bioquímico, taxas de eclosão e de crescimento, entre outras. As estirpes têm várias designações comerciais como artémia AF, com um custo e um valor nutritivo mais elevado, ou a artémia EG (Ferreira, 2009).



Figura 13: Exemplar de um náuplio de *Artemia salina* visto ao microscópio, com uma ampliação de 10x. Fotografia tirada por Luís Calisto.

Os cistos são pesados de acordo com as necessidades empresariais e são descapsulados em tanques cilindro-cónicos com água salgada, a uma temperatura de 29-30 °C, com luz intensa e providos de arejamento forte e contínuo, de forma a evitar a deposição dos cistos, e uma saturação de oxigénio dissolvido a 80 %. Os valores de pH da água são muito importantes no cultivo da artémia, uma vez que a dissolução da membrana embrionária por uma enzima da eclosão tem níveis ótimos de atividade a pH entre 8 e 9 e os metabolitos da eclosão podem fazer baixar o pH (Ferreira, 2009). Um valor ótimo de pH é alcançado adicionando hidróxido de sódio (NaOH), uma base forte.

Ao fim de 12 a 29 horas de hidratação, dependendo da estirpe utilizada e da temperatura de incubação, dá-se a rotura da membrana embrionária. O embrião, designando-se por náuplio, emerge, torna-se visível pois é alaranjado e tem cerca de 450-475 µm de comprimento e é rico em reservas lipídicas, nadando através do batimento das antenas. A artémia passa por duas mudas, a 1ª muda com 600-650 µm e a 2ª muda, em que passa a designar-se por metanáuplio com cerca de 700-800 µm. O teor lipídico vai diminuindo à medida que a artémia passa pelas mudas (Ferreira, 2009).

A artémia AF utilizada para estádios larvares mais pequenos e não necessita de ser enriquecida devido ao seu alto valor nutricional.

A artémia EG é colocada a incubar 48h antes de ser fornecida às larvas a 29-30 °C, provida de aerificação e oxigénio para não haver a sedimentação dos cistos. Após 24 horas, o tanque é filtrado, passa no separte, mecanismo composto por anéis magnéticos e que separa os cistos (cápsulas) dos náuplios de artémia, sendo de seguida colocados noutra tanque para serem enriquecidos com fórmulas comerciais. A temperatura de enriquecimento é mais baixa (26 °C) e nesta fase é necessário fornecer mais oxigénio do que aerificação. Após as 48 horas de cultivo, os tanques são novamente filtrados e é realizada uma contagem para saber a quantidade/volume total de artémia a ser fornecido às larvas. A artémia é guardada num recipiente, dentro de um termoacumulador, a uma temperatura baixa de forma a abrandar o metabolismo e retardar o crescimento.

As rotinas diárias são semelhantes às aplicadas na sala de cultivo de rotíferos e passam por um controlo da temperatura e pH de quatro em quatro horas, normalizando

os níveis de pH com soda cáustica se necessário, contagens para verificar a densidade nos tanques, limpeza e desinfecção dos tanques, chão e pedilúvios.

2.6 – Sala de desmame (desmame 1 e desmame 2)

As larvas são transferidas para a sala de desmame após a metamorfose e respetiva deposição no fundo dos tanques da sala de cultivo larvar. Esta sala, como o próprio nome indica, é onde ocorre a fase de desmame, em que os peixes fazem a transição de alimento vivo para o consumo de um alimento inerte.

A sala de desmame (figura 14) está dividida em duas partes, desmame 1 e desmame 2. No desmame 1 a água circula em circuito aberto e os peixes ainda são alimentados com artémia enriquecida, de forma doseada várias vezes ao dia, fornecida manualmente. Quando passam para a fase de desmame 2, as larvas ou pré-juvenis passam a designar-se juvenis, acompanhando a mudança no tipo de alimentação de alimento vivo para alimento inerte. Em ambas as fases, o fotoperíodo ótimo de crescimento é alcançado com luz artificial, sendo os animais cultivados em ambiente de obscuridade.

Na zona do desmame 2 os animais são alimentados com ração inerte também de forma doseada e várias vezes ao dia mas recorrendo a alimentadores automáticos. A ração, no decurso desta fase, vai sendo modificada (quantidade e tamanho do grânulo ou *pellet*), consoante a variação da densidade, ganho de peso e peso médio do tanque.

Na Safiestela, a fase de desmame 2 é mantida em sistema de circulação de água salgada semifechado, com uma taxa de renovação de água de cerca de 5% ao dia. A água é captada diretamente do mar e é tratada antes da entrada e após a saída dos tanques. Este sistema é similar ao indicado anteriormente para o sistema RAS e é composto por colunas radiais de fluxo que permitem a remoção das partículas mais pesadas; filtros de rede (tambores rotativos) que permitem que as partículas, por ação da corrente de água, se acumulem numa rede e os sólidos caiam num recipiente adequado; filtros biológicos para remoção da amónia (NH₃) e de nitritos presente na água; filtros de areia para remoção de material orgânico em suspensão (fezes e restos de alimento não ingerido); reator de ozono que promove uma desinfecção da água por

nitrificação e um sistema de adição de oxigénio. A temperatura da água é ainda regulada a $19 \pm 1^\circ\text{C}$, a salinidade é mantida entre 30 a 35 ‰ e a taxa de saturação de oxigénio deve ser mantida a 150 %, à entrada da água.

Um aspeto importante na produção de linguado é a existência de uma grande dispersão de tamanhos dos diferentes lotes. Por esta razão, na produção, são realizadas várias triagens periódicas para homogeneizar os lotes e eliminar as caudas da produção (indivíduos que têm um crescimento mais lento que os restantes) (Villanueva e Alonso, 2014). Estas triagens são realizadas manualmente e permitem a separação dos indivíduos com deformações esqueléticas ou com sinais de patologias, o que leva a uma diminuição da competição pelo alimento. Para a triagem são utilizadas cestas com malhas de tamanho adequado ao peixe que se quer triar em que, o peixe maior fica retido na cesta e é transportado para outro tanque designado, e o peixe mais pequeno passa pela malha e fica no tanque onde se está a realizar a triagem. Estes peixes, ou são recolocados noutra tanque, ou eliminados da produção.

Nesta sala, a qualidade da água é de extrema importância existindo por isso um controlo regular de vários parâmetros de avaliação da qualidade da água como, a medição de oxigénio dissolvido a cada 4 horas, valor de potencial redox, medição da temperatura, salinidade, amónia e nitritos, parâmetros muito importantes, nesta fase, por ser um sistema semifechado de recirculação de água. É também feita uma limpeza diária de todos os tanques, incluindo os tubos de entrada e saída da água, lavagem e desinfecção do chão e pedilúvios e manutenção das tinas de desinfecção de todo o material específico desta sala. Na zona das máquinas da instalação é realizado um “backwash” dos filtros de areia (igual ao efetuado nos filtros da desinfecção dos reprodutores) e a verificação dos silos do alimentador, verificação a nível do skimmer, dos pré-filtros das bombas e dos filtros de ultravioleta, verificação dos filtros de cartucho, dos biofiltros e dos permutadores de calor e verificação do nível de depósito de oxigénio.



Figura 14: Sala de desmame numa produção industrial de linguado (Sea8, 2015).

O linguado senegalês é das espécies marinhas com um cultivo larvar mais longo, quando os alevins alcançam um peso médio de 1.5 gramas (Villanueva e Alonso). Quando os animais atingem 1 grama são triados e transportados para outra sala da produção, a zona da pré-engorda.

2.7 – Sala da pré-engorda

Quando os animais atingem 1 grama são triados e transportados para outra sala da produção, a zona da pré-engorda, onde permanecem até atingir 40 gramas. Quando alcançam este peso, os peixes são transportados para a outra instalação pertencente à Sea8, a Aquacria, localizada em Aveiro onde se processa a fase de engorda.

A sala da pré-engorda é constituída por tanques com grandes comprimentos (12 m) e pequena profundidade denominados de “raceways” (figura 15). Este tipo de tanques permitem uma rentabilização do espaço, uma vez que os linguados não precisam de uma coluna de água grande. A alimentação é calculada e fornecida de forma a semelhante à efetuada no desmame. O cálculo entra em conta com o peso médio dos peixes, o ganho de peso, bem como a densidade de juvenis em cada tanque de forma a existir o menor desperdício possível de ração. Para além do ajuste da

quantidade de alimento a fornecer, o tamanho do grânulo da ração é, também, ajustado ao tamanho do peixe, de forma a otimizar a eficiência de utilização do alimento e o máximo crescimento do peixe.

Nesta sala também é extremamente importante que se realizem triagens regulares uma vez que os linguados apresentam uma grande dispersão de tamanhos. Para isso, são efetuadas pelo menos duas triagens por lote, com recurso a máquina para este fim, desenhada especificamente para a Safiestela, que divide o peixe, dependendo das análises de dispersão calculadas para cada tanque. O fato deste procedimento ser automatizado traz inúmeras vantagens, necessitando de menos mão-de-obra, sendo mais rápido e eficaz.



Figura 15: Zona da pré-engorda. Pode-se observar os tanques tipo "raceway" com uma iluminação artificial com luz azul. Fotografia tirada por Isidro Blanquet.

As rotinas diárias nesta unidade prendem-se com a limpeza dos tanques, o controlo da temperatura e oxigénio dissolvido ao longo do dia, controlo da salinidade que nesta sala deverá estar entre os 30 e 35 ‰, e a água é analisada para quantificar os níveis de amónia, nitritos, potencial redox, pH, lavagem e desinfeção do chão e dos pedilúvios, manutenção das tinas de desinfeção do material. Todo o equipamento e fases inerentes ao sistema de recirculação são também verificados diariamente. Esta sala é mantida com baixa luminosidade, com uma luz de cor azul, de forma a gerar menos *stress* nos peixes, uma vez que esta cor é a que melhor mimetiza a luminosidade de animais que vivem no fundo.

2.8 - Monitorização e controlo da qualidade da água

A gestão da qualidade da água desempenha um papel importante em sistemas de recirculação em aquacultura pois se esta diminui por uma remoção inapropriada de substâncias particuladas, aumento de amónia e nitrato através de uma nitrificação insuficiente ou incompleta, ou aumento das concentrações de dióxido de carbono e diminuição dos níveis de oxigénio então, o bem-estar do peixe e a sua performance são potencialmente debilitadas (Schneider et al., 2012). Por estas razões na Safiestela todos os dias são realizadas análises a amónia, nitratos, bromo, transmitância a 400 μm e a 500 μm e são verificados os valores de redox e ozono.

As medições de amónia e nitritos são feitas através de protocolos específicos, por métodos colorimétricos por espectrofotometria. Na amónia é utilizado o “Método Salicilato” que utiliza um comprimento de onda (λ) de 655 nm, utilizando os reagentes salicilato de amónia e cianurato de amónia; nos nitritos o método é o “Método Diazótico” com um comprimento de onda de 507 nm, usando o reagente Nitriver 3.

O valor do potencial redox (potencial de oxidação-redução), a concentração de oxigénio dissolvido e valores de pH são controlados através de sondas.

Na empresa também são seguidos rigorosos protocolos de biossegurança, como a utilização de materiais específicos para cada zona e sala de trabalho e manutenção diária das tinas de desinfecção, desinfecção de pés através da utilização de pedilúvios à entrada ou saída de cada departamento, utilização de farda e calçado de proteção individual e protocolos para a limpeza e desinfecção de mãos, material dos sistemas e das sondas de medição dos vários parâmetros da qualidade da água.

III – Trabalho Experimental

Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela.

Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores

1 - Introdução

O linguado do Senegal é considerado uma espécie com elevado interesse para a diversificação da aquacultura no Sul da Europa e a sua produção tem vindo a aumentar nos últimos anos (Morais et al., 2014). Conforme descrito na primeira parte deste relatório, a produção intensiva do linguado está dependente da captura, aclimação e indução de posturas de reprodutores selvagens (Carazo et al., 2011). A desova a partir de reprodutores produzidos em cativeiro (geração G1), mantidos nas mesmas condições que os reprodutores capturados do meio natural, não tem sido bem sucedida resultando em posturas de ovos com baixa qualidade e esperma em quantidades reduzidas (Carazo et al., 2011).

Paralelamente e, apesar do aumento do conhecimento e da investigação sobre a fisiologia reprodutiva do linguado do Senegal, a variabilidade nas taxas de fertilização da produção em massa de juvenis é elevada, sendo considerada como um dos grandes constrangimentos ao desenvolvimento desta indústria (Izquierdo et al., 2001, Beirão et al., 2015). Alguns autores referem que a baixa qualidade da desova (baixa taxa de fertilização), pode surgir tanto a nível de posturas naturais como artificiais, pela produção reduzida de esperma, de qualidade reduzida e variável, e com aspeto viscoso, causados por diversos fatores, como a modificação da estação de ano, aumento da temperatura, idade do reprodutor ou fatores abióticos (Matusse, 2012).

No caso do linguado, em condições naturais, a produção de esperma pelos machos ocorre durante todo o ano, isto é, sem estimulação hormonal ou alteração de fatores abióticos, o que poderia indicar uma baixa contribuição das fêmeas para a espermiacção. No entanto, verifica-se que existe maior produção de esperma nos períodos de maturação das fêmeas (Cabrita et al., 2011; Beirão et al., 2015) e a maturação das fêmeas é também iniciada pela presença de machos (Matusse, 2012). Estudos recentes reportaram, também, a existência de um comportamento semelhante a uma corte em posturas de indivíduos selvagens adaptados ao cativeiro mas não em peixes G1 (indivíduos da geração 1). Este comportamento reprodutivo mimetiza o que acontece em muitas espécies de peixes na altura das posturas (Carazo et al., 2011). Os ovos do linguado são caracterizados por possuírem numerosos aglomerados lipídicos

que sendo pelágicos, ajudam no ajuste da densidade face às correntes de água. Esta característica é importante pois permite que os ovos evitem, em meio natural, as camadas profundas com baixos níveis de oxigénio (Matusse, 2012).

Como já foi dito anteriormente, a qualidade das posturas é um fator que restringe a expansão deste tipo de cultivo. A qualidade dos ovos é definida como a capacidade de um ovo produzir um embrião e descendentes viáveis, e é determinada pelas propriedades intrínsecas do desenvolvimento do ovócito em si e do ambiente no qual o ovo está a ser incubado (Matusse, 2012).

Devido às dificuldades na homogeneidade dos lotes que advém da indução de posturas por animais selvagens, a nível empresarial, começa-se a tentar obter protocolos viáveis para a desova de indivíduos da geração 1 (F1). Uma das maiores dificuldades deste tipo de fertilização advém do facto de estes reprodutores não desovarem naturalmente nos tanques sendo por isso necessário a recolha de gâmetas e a fertilização artificial, procedimento que está a ser desenvolvido e adaptado às pisciculturas. No entanto, um dos principais problemas é o reduzido volume e concentração de esperma obtido nesta espécie, um problema também encontrado em machos selvagens, mas mais acentuado na geração F1 (Matusse, 2012; Norambuena et al., 2013b).

A nutrição dos reprodutores é uma área pouco compreendida e pesquisada na nutrição de peixes pois são estudos morosos e que acarretam custos elevados. No entanto, é do conhecimento geral que esta é uma área de extrema importância no cultivo de peixes, uma vez que a composição das dietas afeta diretamente a qualidade e sobrevivência da descendência (Izquierdo et al., 2001). A nutrição é considerada o fator chave que controla o desenvolvimento das gónadas e da fecundidade. Mas a nutrição dos reprodutores afeta também a primeira etapa de desenvolvimento embrionário, já que após a postura dos ovos e até ao início da alimentação exógena das larvas, a única fonte de nutrientes para o desenvolvimento embrionário provém do saco vitelino (Matusse, 2012). As necessidades nutricionais dos reprodutores são diferentes das dos juvenis ou de adultos que não estão em fase reprodutiva (Matusse, 2012). Os reprodutores requerem uma dieta equilibrada e ajustada à fase de reprodução. No entanto, de entre os diferentes nutrientes, aqueles que desempenham

um papel preponderante na reprodução, na qualidade dos gâmetas e das larvas, são os lípidos, e a composição em ácidos gordos. A composição da membrana em fosfolípidios e colesterol determina a fluidez da membrana dos espermatozóides, o colesterol regula a ordem da cadeia lipídica e a organização molecular das membranas (Beirão et al., 2015). Para além disso, comparativamente com outras células, a concentração em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) no esperma é mais elevada do que nas restantes células.

Os PUFAs, incluindo o ácido araquidónico (ARA) e seus derivados regulam diversos aspetos da função endócrina. O ácido araquidónico é metabolizado para formar prostaglandinas (PGs) e os seus metabolitos regulam a transferência de colesterol de fora para dentro da membrana mitocondrial onde a enzima P450 inicia a síntese de hormonas esteróides usando o colesterol como seu precursor (Norambuena et al., 2013a). Assim, os ácidos gordos, o colesterol e os fosfolípidos podem modificar a composição do esperma afetando a performance reprodutiva dos machos (Beirão et al., 2015). Em reprodutores de outras espécies de peixe, foi verificado que uma suplementação a nível nutricional de ácido araquidónico tem demonstrado melhorar a performance reprodutiva e a sobrevivência das larvas em algumas espécies de peixes (Bell e Sargent, 2003).

O estágio na Safiestela incorporou também a participação direta no projeto “Repling”, que estava a decorrer na empresa. Este projeto tem como objetivo geral melhorar a performance reprodutiva do linguado, com vista à otimização da desova e da sobrevivência, qualidade e performance das larvas e juvenis de linguado. No âmbito do estágio, o objetivo concreto, da parte do projeto “Repling” desenvolvida, foi avaliar o efeito da suplementação das dietas dos reprodutores com ácido araquidónico no comportamento alimentar (Ensaio 2).

Antes do início do projeto, propriamente dito, foi necessário aferir as condições atuais de reprodução e de alimentação em vigor na empresa Safiestela. Estes dados servirão como ponto de partida para o projeto, constituindo uma valiosa base de informação sobre a alimentação e comportamento alimentar dos reprodutores e caracterização da desova (Ensaio 1).

2 - Material e Métodos

Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela

Avaliação da performance reprodutiva

A análise descritiva da performance reprodutiva decorreu na zona dos reprodutores da empresa Safiestela (pormenores descritos na seção 2.2, deste relatório). Foram avaliados quatro ciclos de reprodução, durante 4 meses, com início no mês de Janeiro e final no mês de Abril.

Na empresa, os reprodutores estão dispostos em vários tanques com uma densidade de 15 a 22 indivíduos por tanque e uma proporção de machos e fêmeas de 1:1, conforme descrito anteriormente na primeira parte deste relatório.

As desovas na empresa Safiestela são conseguidas mediante um controlo rigoroso da temperatura e do fotoperíodo. Para tal, a temperatura foi aumentada gradualmente no mês anterior à indução da postura, até aos 16 °C. Nos dias imediatamente antes da indução esta foi aumentada 1 a 2 graus por dia. As posturas realizaram-se à noite e os ovos foram recolhidos e colocados a incubar na manhã seguinte. Os ovos foram colocados em incubadoras cilindro-cónicas de 200 litros, a uma densidade máxima de 300 gramas de ovos por incubadora e a uma temperatura de 19 °C. Em todas as desovas foi retirada uma amostra de 10 ovos para a medição dos mesmos usando um micrómetro.

Vinte e quatro horas após os ovos estarem a incubar, foi retirado o arejamento das incubadoras durante 10 minutos. Deste modo, os ovos não flutuantes, e por isso não fecundados, depositaram-se no fundo, sendo retirados mediante purga do fundo do tanque. Ao dia 1, após a eclosão, foi retirada uma amostra de 10 larvas recém-eclodidas, para avaliação do seu comprimento, com o auxílio de um micrómetro, e foi realizada uma estimativa da densidade larvar de cada incubadora. Para isto, foram

retiradas 10 amostras, com uma pipeta de 10 ml, de zonas diferentes da incubadora e contado o número de larvas. Daí extrapolou-se o número de larvas para os 200 litros de cada incubadora.

No último ciclo de reprodução foram retiradas três amostras de 0,5 gramas de ovos, em dias diferentes, para se quantificar o número de ovos correspondente ao peso de meia grama.

Avaliação do comportamento alimentar e quantificação da ingestão

A avaliação do comportamento alimentar e quantificação da ingestão foi realizada nos reprodutores durante 4 meses, com início no mês de Janeiro e final no mês de Abril. Durante este período, os reprodutores foram alimentados diariamente, de manhã, à mão, até a saciedade aparente. A quantidade de alimento fornecida a cada tanque e o comportamento aquando da alimentação foi registado individualmente para cada tanque de todas as salas de reprodutores da empresa, de acordo com a seguinte métrica:

Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento;

Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento;

Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

O comportamento natatório também foi avaliado, de acordo com a seguinte escala:

Natação positiva: se existia natação dos peixes quando o alimento é fornecido;

Natação negativa: se não existia natação quando o alimento é fornecido.

Duas horas após a alimentação, a quantidade de alimento não ingerido, em cada tanque, foi determinada, pela contagem de *pellets* restantes nos tanques, e foi contabilizada a ingestão diária de cada tanque. A quantidade de alimento fornecida

variou de acordo com o tanque e sala. A quantidade de alimento a fornecer no dia seguinte foi diariamente ajustada, de acordo com o nível de alimentação registado no dia anterior. Se a quantidade de alimento não ingerido fosse menor do que 5 *pellets*, o equivalente a 5 gramas de alimento, aumentava-se a dose fornecida, se a quantidade não ingerida fosse substancialmente maior do que 5 *pellets*, diminuía-se a quantidade fornecida. Este procedimento foi adotado de modo a minimizar as perdas de alimento não ingerido, o que originou um menor desperdício de alimento.

A dieta utilizada era uma dieta semi-húmida, preparada na empresa, a partir de uma pre-mistura preparada pela SPAROS Lda, mediante a adição de água e óleo de peixe. A dieta foi preparada para um máximo de quatro dias e foi preservada no congelador. A composição da dieta não foi revelada, pelo que não é apresentada.

Procedimentos analíticos para avaliação da performance reprodutiva

A avaliação da performance reprodutiva dos linguados foi realizada em cada ciclo de reprodução, usando os seguintes indicadores:

Quantidade de ovos em número:

$$[\text{Peso de ovos flutuantes (g)} * 655] / 0,5$$

em que, 655 corresponde ao número médio de ovos por cada 0,5 g de seu peso.

Taxa de viabilidade de ovos:

$$[\text{Peso de ovos flutuantes (g)} / \text{Peso de ovos total (g)}] * 100$$

Tamanho dos ovos:

Medidos através de um micrómetro numa amostra de 10 larvas por desova.

Número de larvas:

Amostragens das incubadoras antes da passagem para a sala de cultivo larvar. Com uma pipeta de 10ml retiram-se dez amostras e faz-se uma média do número total de larvas de cada desova.

Taxa de eclosão:

$[\text{Número de larvas} / \text{quantidade de ovos (número)}] * 100$

Tamanho das larvas – as larvas foram medidas ao dia 1 após a eclosão fazendo uma média da medição de 10 larvas por desova.

Análise dos dados

Os resultados são apresentados como média das observações totais. Não foi possível proceder a uma comparação dos dados recolhidos por sala, uma vez que não havia homogeneidade no número, peso dos indivíduos e idade dos indivíduos de cada sala.

Procedimentos analíticos para avaliação da ingestão

A ingestão foi avaliada diariamente em % de alimentação de peso vivo de peixe, pela seguinte fórmula:

$\% \text{ Alimentação de peso Vivo de peixe} = [(\text{Média de alimento ingerido/dia (g)} * 100) / \text{Biomassa total do tanque (g)}] * 10$

Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores (ensaio Repling)

Para o ensaio do Repling o procedimento alimentar seguido foi o mesmo descrito para o ensaio 1. Contudo foram testadas duas dietas, a dieta controlo (CTL), a mesma usada durante o ensaio 1 (comummente usada para alimentar os reprodutores da piscicultura) e a dieta ARA, em que a dieta controlo foi suplementada com ácido araquidónico. Ambas as dietas foram apresentadas sob a forma de dieta semi-húmida, preparada na empresa, a partir da pré-mistura preparada pela SPAROS Lda, mediante a adição de água e óleo de peixe, variando este último componente nas diferentes dietas, a controlo e a suplementada com ácido araquidónico. A dieta foi preparada para um máximo de sete dias e foi preservada no congelador. A composição de ambas as dietas não foi revelada.

O ensaio Repling foi realizado noutra área da piscicultura, separada da produção, uma vez que se usaram tanto exemplares F1, provenientes da Aquacria como indivíduos capturados do meio natural. Um grupo de 24 exemplares de linguados foram capturados do meio selvagem e foram distribuídos ao acaso por dois tanques. Este grupo de peixes foi aclimatado primeiramente com poliquetas e de seguida com alimento semi-húmido. Um grupo adicional de 97 exemplares F1, provenientes da empresa Aquacria na Torreira, foram distribuídos ao acaso por quatro tanques. No início do ensaio, todos os peixes foram pesados, foi retirada uma amostra de sangue e aleatoriamente distribuídos pelos 6 tanques experimentais. Foi mantida uma densidade média de 4,0 kg/m² e um rácio de machos e fêmeas de 1:1, com fotoperíodo e temperatura natural.

A alimentação foi iniciada a uma taxa de 0,17% do peso vivo dos tanques. Tal como o que aconteceu nos reprodutores da produção, esta taxa de alimentação era diariamente ajustada, conforme referido anteriormente. A ingestão voluntária de alimento foi registada diariamente, bem como o comportamento alimentar. A avaliação do comportamento alimentar foi realizada do mesmo modo que o descrito para o ensaio 1, deste relatório.

Avaliação do comportamento alimentar e quantificação da ingestão

A avaliação do comportamento alimentar foi avaliada, diariamente, para cada tanque experimental, conforme descrito no ensaio 1 deste relatório.

A taxa de ingestão alimentar foi quantificada do seguinte modo:

Taxa de ingestão (% peso vivo de peixe) = [(Média de alimento ingerido/dia (g) * 100) / Biomassa total do tanque (g)]

Análise dos dados

Os resultados de taxa de ingestão de alimento e o número de comportamentos positivos ou negativos obtidos foram submetidos a uma análise de comparação de média, aplicando o teste Two-way ANOVA, com um nível de significância de 5%.

3 - Resultados e discussão

Ensaio 1 – Análise descritiva da performance dos reprodutores de linguado do Senegal na empresa Safiestela.

Em ambiente empresarial, o controlo da reprodução é um processo chave na gestão de uma aquacultura que inclua maternidade. A avaliação da performance reprodutiva é de elevada importância, pois esta determina toda a produção de larvas. Uma avaliação rigorosa do panorama da empresa, em termos de performance reprodutiva, permite uma gestão e previsão, com maior rigor e segurança, da produção de ovos viáveis, garantindo um aporte de ovos/larvas, sempre que a empresa assim o desejar.

A capacidade para avaliar a qualidade da desova tem, também, elevadas implicações para a aquacultura. Esta avaliação permitiria à empresa diminuir o risco de, por exemplo misturar, lotes de ovos de má e de boa qualidade, prevenindo o risco de obter taxas de fertilização reduzidas, que muitas vezes resultam na perda de lotes inteiros de ovos. Trata-se pois de uma ferramenta de grande importância para a gestão dos stocks de peixe em aquacultura.

Tanto no meio natural quanto em aquacultura, a quantidade e qualidade dos gâmetas dos peixes pode variar amplamente e está dependente de um elevado número de fatores. Na realidade, são diversos os fatores que podem condicionar a performance reprodutiva, a taxa e a sincronização das desovas. A variação da idade dos reprodutores e o seu tamanho, aquando da maturação, fatores abióticos como a temperatura e o fotoperíodo, a alimentação e a dieta, a proporção entre machos e fêmeas no tanque, entre outros, são fatores que condicionam as desovas, dificultando a padronização da performance reprodutiva em ambiente empresarial.

De um ponto de vista biológico, a qualidade dos gâmetas pode ser definida como a sua capacidade de fertilizar ou ser fertilizado e, conseqüentemente, desenvolver num embrião normal (Bobe e Labbé, 2010). A qualidade dos ovos e do esperma são temas que têm sido discutidos e estudados ao longo dos últimos anos, mas são áreas que ainda estão longe de estarem bem compreendidas, no caso do linguado do Senegal, ainda não é possível a implementação de protocolos de melhoramento da performance reprodutiva a escalas industriais (Brooks et al., 1997; Bobe e Labbé, 2010).

Neste contexto, a primeira tarefa deste projeto tinha como objetivo rastrear e documentar a situação atual da Safiestela em termos de performance reprodutiva.

Na tabela 2 são apresentados os parâmetros de desova avaliados, no decorrer dos quatro ciclos de reprodução estudados. Dada a grande variabilidade no número e tamanho dos reprodutores de cada tanque, em cada sala, e a impossibilidade de determinar o tamanho dos reprodutores, só nos é possível apresentar os dados brutos, ou seja o valor total por tanque. Por este motivo, não foi possível efetuar a análise estatística da performance reprodutiva das diferentes salas.

Tabela 2: Dados relativos aos parâmetros de avaliação da performance reprodutiva nas salas de Outono, Inverno e Verão dos reprodutores da empresa Safiestela durante 4 meses.

Sala	Tanque	Ciclo de produção	Número de desovas	Total de ovos				Média da taxa de viabilidade (%)	Média do tamanho dos ovos (µm)	Total de larvas (nr)	Média taxa de eclosão (%)	Média tamanho das larvas (mm)
				Total ovos (g)	Não flutuantes (g)	Flutuantes (g)	Flutuantes (nr)					
Outono	2	Janeiro	2	141	88	53	69430	54	1025	58000	100	3,0
		Fevereiro	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Março	2	241	41	200	262000	81	988	258000	92	3,0
Outono	3	Janeiro	6	2005	1223	782	1024420	37	1008	631000	66	3,1
		Fevereiro	5	1472	927	545	713950	42	975	500000	71	3,0
		Março	2	680	447	233	305230	43	1000	70000	21	3,1
Outono	4	Janeiro	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Fevereiro	1	89	67	22	28820	25	975	10000	35	3,1
		Março	2	355	257	98	128380	32	1000	58000	37	3,1
Inverno	1	Janeiro	2	609	305	304	398240	49	1025	182000	53	3,2
		Fevereiro	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Março	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inverno	2	Janeiro	2	339	183	156	204360	49	975	148000	61	3,2
		Fevereiro	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Março	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Verão	4	Abril	3	1108	455	653	855430	56	1017	364000	46	3,0

* Os valores são representados como média de valores relativos ao número de desovas, obtidos no mês de postura referente. Os meses são relativos ao mês em que o ciclo de reprodução foi efetuado.

- Meses em que as posturas provenientes dos ciclos de reprodução não foram aproveitados para os lotes larvares da empresa.

Total de ovos flutuantes = Total de ovos (g) – Total de ovos não flutuantes (g)

Total de ovos flutuantes (nr) = [Quantidade de ovos flutuantes (g) * 655] / 0,5

Taxa de viabilidade = [Quantidade de ovos flutuantes (g) / Quantidade de ovos total (g)] * 100

Taxa de eclosão = [Número de larvas / quantidade de ovos (nr)] * 100

Durante este período, as desovas ocorreram sempre no período de escuridão, reportado como característico desta espécie em condições naturais (Oliveira et al., 2009).

Como se pode visualizar na tabela 2 o número de desovas em cada ciclo de reprodução variou entre os tanques e nas diferentes salas. O tanque 3, da sala de Outono, revelou ser o tanque que obteve mais desovas, muito embora não tenha sido o tanque que produziu maior número de larvas por desova. Fazendo uma média do número de larvas em cada desova, o tanque que produziu mais larvas foi o tanque 2, da sala de Outono. O tamanho médio das larvas, medido ao 1º dia após a eclosão,

também não variou muito entre posturas, sendo ligeiramente superior ao reportado anteriormente por Dinis (1992), que obteve valores de $2,67 \pm 0,03$ mm, logo após a eclosão e de $2,80 \pm 0,01$ mm, ao dia 2^a dia após eclosão.

O tamanho dos ovos é considerado um indicador de qualidade do ovo. Geralmente ovos maiores têm maior viabilidade, dando origem a larvas mais capazes, devido a uma maior inclusão de proteínas vitelogénicas durante a vitelogénese (Bobe e Labbé, 2012; Geffen e Nash, 2012). Na realidade, para a espécie *Solea solea* verificou-se que os ovos maiores davam origem a larvas de maior tamanho e continham maior vitelo, na altura da abertura da boca (Baynes e Howell, 1996). No entanto, no presente trabalho, dado o número reduzido de desovas, acompanhadas durante o tempo de estágio, não foi possível verificar a existência ou não de uma correlação, entre o tamanho dos ovos e a taxa de eclosão, bem como entre a taxa de viabilidade e a taxa de eclosão (figura 16). Na bibliografia está descrito que, para diferentes espécies de peixes, a taxa de mortalidade do ovo/larva é inversamente proporcional ao tamanho do ovo (Kamler, 1992.). Para o linguado senegalês, Martín et al. (2014) observou que o diâmetro dos ovos era mais pequeno nas desovas mais tardias da época de desova, mas, após um período de inatividade das fêmeas, o tamanho do ovo voltava a aumentar. No presente trabalho não se observaram diferenças significativas no tamanho dos ovos das posturas analisadas.

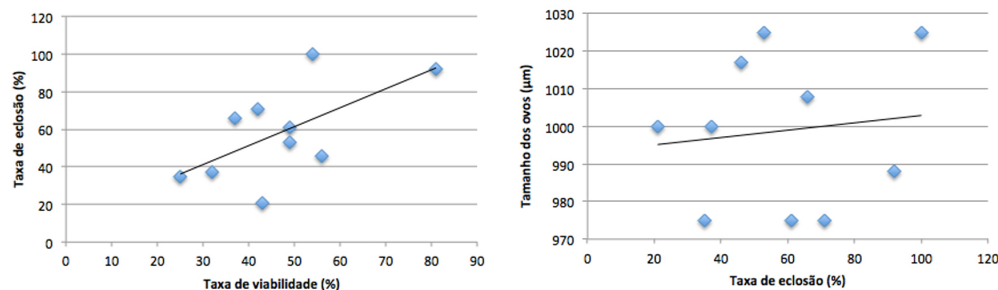


Figura 16: Gráficos de dispersão entre a taxa de viabilidade (%) e taxa de eclosão (%) e entre o tamanho das ovos (µm) e taxa de viabilidade (%).

A qualidade dos ovos pode ser definida como a sua capacidade de ser fertilizado e conseqüentemente de se desenvolver e dar origem a um embrião. A avaliação do sucesso da fertilização é, provavelmente, um dos primeiros parâmetros para determinar a qualidade dos ovos. Para algumas espécies, a determinação da taxa de fertilização é relativamente simples (Bobe e Labbé, 2010). A taxa de fertilização pode ser calculada através da contagem do número de ovos fertilizados dividido pelo número de ovos observados. No entanto, no caso do linguado do Senegal a distinção de ovos fecundados dos não fecundados é algo complexa, mesmo para pessoas com bastante experiência no ramo (observação pessoal). No presente trabalho, o termo taxa de viabilidade e não taxa de fertilização foi aplicado, uma vez que a metodologia utilizada foi referente à quantidade de ovos flutuantes e não flutuantes, não sendo considerado um método 100% eficaz na avaliação da taxa de fertilização.

A viabilidade ou não dos ovos pode também ser calculada através da taxa de fecundidade relativa calculada a partir do número total de ovos de um tanque pelo peso total das fêmeas nesse tanque. No entanto, alguns autores defendem que esta avaliação no linguado tem também de ser analisada com cuidado, uma vez que nem todas as fêmeas estão envolvidas da mesma forma nas posturas, isto é, a maior parte das posturas são provenientes de um casal dominante do tanque, o que influenciaria o peso das fêmeas interveniente no cálculo da taxa de fecundidade relativa (Martín et al., 2014).

A taxa de viabilidade e a taxa de eclosão foram apenas analisadas mais detalhadamente nos tanques da sala de Outono, uma vez que no decorrer deste estágio não se obtiveram dados suficientes de outras salas.

Taxa de viabilidade

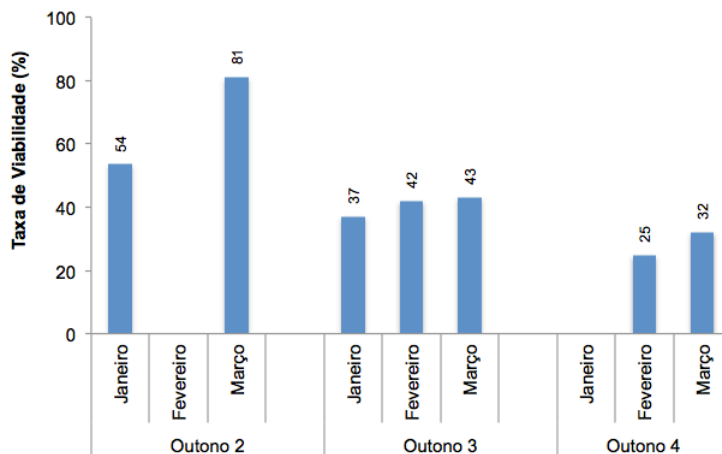


Figura 17: Percentagem da taxa de viabilidade nos tanques 2, 3 e 4 da sala de Outono, nos meses de amostragens (Janeiro, Fevereiro e Março).

A taxa de viabilidade dos ovos (figura 17) variou largamente entre os tanques, da sala de Outono, desde os 25 % até aos 81 %. A taxa de viabilidade não revelou ser um critério eficaz para avaliar a qualidade dos ovos, uma vez que baixas taxas de viabilidade não significaram baixas taxas de eclosão. Como se pode observar na tabela 2, na sala de Outono – tanque 3, as taxas de viabilidade de 42 % e 43 % resultaram em taxas de eclosão de 71 % e 21 %, respetivamente. De fato, outros autores referem que o sucesso da fertilização não reflete necessariamente o sucesso do desenvolvimento do embrião (Shields et al., 1997). Após a fecundação, inicia-se a divisão celular, um processo que pode comprometer a viabilidade do embrião, resultando numa mortalidade prematura do embrião (Bobe e Labbé, 2010).

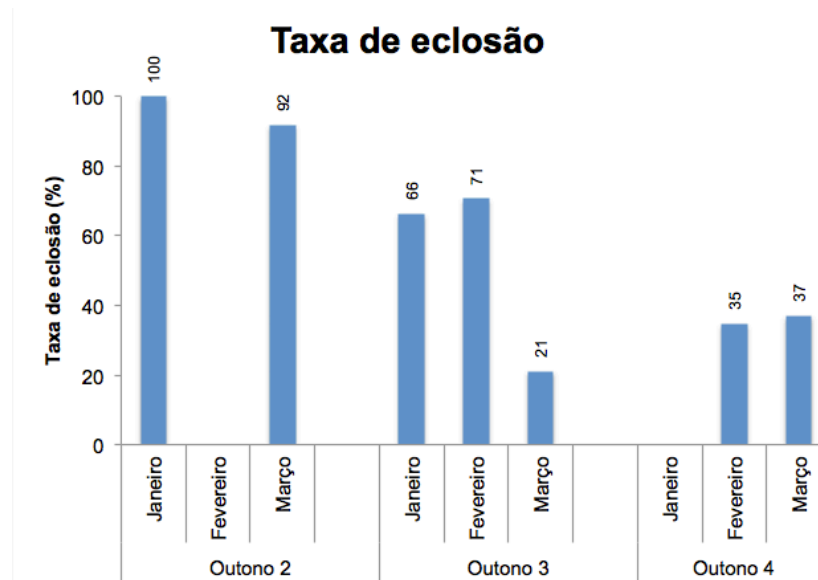


Figura 18: Percentagem da taxa de eclosão nos tanques 2, 3 e 4, da sala de Outono, nos meses de amostragens (Janeiro, Fevereiro e Março).

No presente trabalho, as taxas de eclosão observadas de $60,3 \pm 30\%$ (figura 18) foram semelhantes às reportadas por Anguis e Cañavate (2005), para mesma espécie, tendo obtido uma taxa de eclosão de $69,7 \pm 24\%$ e $56,5 \pm 25\%$ e às reportadas por Martín et al. (2014) que obtiveram taxas de eclosão de $73,28 \pm 1,54\%$. No entanto, a taxa de eclosão no tanque 2, da sala de Outono, foi substancialmente mais alta (100 e 92 %) do que a dos outros tanques. Esta taxa de eclosão elevada não indica necessariamente que o tanque 2 tenha tido uma performance reprodutiva superior à dos outros tanques, pois a contribuição deste tanque, para o total de larvas da produção, foi muito baixa comparativamente ao tanque 3, da mesma sala. O tanque 3 da sala de Outono, por observação pessoal, revelou ser o tanque que mais larvas forneceu para a produção da empresa. Neste tanque, os baixos resultados, tanto a nível da taxa de viabilidade como da taxa de eclosão, podem ter sido devidos a estas desovas não terem sido as primeiras posturas do tanque, apesar de aqui não se terem apresentado os dados referidos. De igual modo, num estudo de longa duração, Martín et al. (2014) observou que, durante quatro épocas de desovas consecutivas, o equivalente a quatro anos, as fêmeas obtiveram valores máximos de estádios de maturação sexual nas

primeiras desovas. O tanque 4 teve taxas de eclosão mais baixas não contribuindo muito para a produção de larvas na produção.

Martín et al. (2014) também observou que existiram diferenças nos parâmetros relativos à qualidade dos ovos nos reprodutores estudados, com taxas de reprodução de 5 a 10 vezes mais elevadas em alguns dos tanques. De fato, como referido anteriormente, o número de ovos e a qualidade dos mesmos variam muito entre reprodutores, estando condicionada por diferentes fatores. No caso do linguado, o maior contributo, em termos de número de ovos provém de um casal dominante (Anguis e Cañavate, 2005; Martín et al., 2014). No presente estudo, a grande variabilidade pode também ser devida ao facto de os tanques serem constituídos por indivíduos com idades diferentes. Este fator é reportado por alguns autores como sendo um fator determinante nas desovas, uma vez que peixes mais velhos parecem produzir ovos de melhor qualidade (Tveitten et al., 2001). Por outro lado, Anguis e Cañavate (2005) refere que, Dinis num comunicado pessoal, indicou que os reprodutores de *S. senegalensis* produzem ovos com taxas de fertilização decrescentes num período de 5 anos. Estas hipóteses vêm confirmar a necessidade de estudos mais longos em reprodutores de linguado.

A qualidade dos ovos e a performance reprodutiva estão relacionadas com o estado nutricional dos reprodutores, especialmente a nível dos lípidos, proteínas, vitaminas minerais e elementos vestigiais pois estes elementos são necessários para a gametogénese dos oócitos e do esperma (Hardy et al., 2002; Howell et al., 2003). As rações comerciais extrudidas contém uma porção significativa de farinha de peixe, incorporada como principal fonte proteica. No entanto, estas dietas são frequentemente suplementadas com alimentos frescos como as poliquetas, lulas e moluscos para assegurar que as necessidades nutricionais dos reprodutores sejam asseguradas dos reprodutores (Fermández- Palacios et al., 1997; Izquierdo et al., 2001).

Durante a gametogénese e desovas as necessidades energéticas dos reprodutores ultrapassam muitas vezes a energia fornecida pela dieta. Tal ocorre, porque durante este período, a taxa de ingestão voluntária é fortemente reduzida, pelo que os reprodutores mobilizam energia adicional das reservas nos tecidos corporais de modo a satisfazerem as necessidades energéticas (Bureau et al., 2002; Halver et al.,

2002). Os estudos demonstram que o linguado, pelo menos durante a fase de juvenil, requer dietas com níveis proteicos elevados ou moderados (50-45 % da dieta) e com teores baixos ou moderados de lípidos (8-16 % da dieta) (Guerreiro et al., 2012, 2014). No entanto para a fase reprodutiva, as necessidades nutricionais e energéticas ainda não foram avaliadas.

A regulação da ingestão de alimento é altamente complexa envolvendo mecanismos de feedback positivo ou negativo que atuam sobre uma hierarquia de escalas cronológicas para determinar o tamanho de uma refeição individual, o balanço de nutrientes essenciais e, a longo prazo, a composição do corpo (Houlihan et al., 2008). O feedback positivo determina o início dos padrões de alimentação assim como a manutenção dos mesmos, e resulta numa relação entre as propriedades sensoriais da comida, disponibilidade de nutrientes e o estado fisiológico do animal. O feedback negativo pode ser composto em duas vertentes: gastrointestinal e metabólica, ou nas fases pré e pós absorptivas (Houlihan et al., 2008).

Como referido, nos peixes a ingestão de alimento varia consideravelmente entre dias e épocas do ano, estádios de desenvolvimento, como nas épocas de posturas e maturação sexual, por agentes patogénicos ou devido a fatores abióticos (Luquet e Watanabe, 1986). Dentro dos fatores abióticos estão a concentração de oxigénio dissolvido ou de amónia. A temperatura é também um dos fatores que mais afetam a ingestão, uma vez que tem uma grande influência no metabolismo. Esta relação origina que, ligeiras flutuações da temperatura dentro dos limites de tolerância dos peixes, afete a taxa de ingestão de alimento (Houlihan et al., 2008).

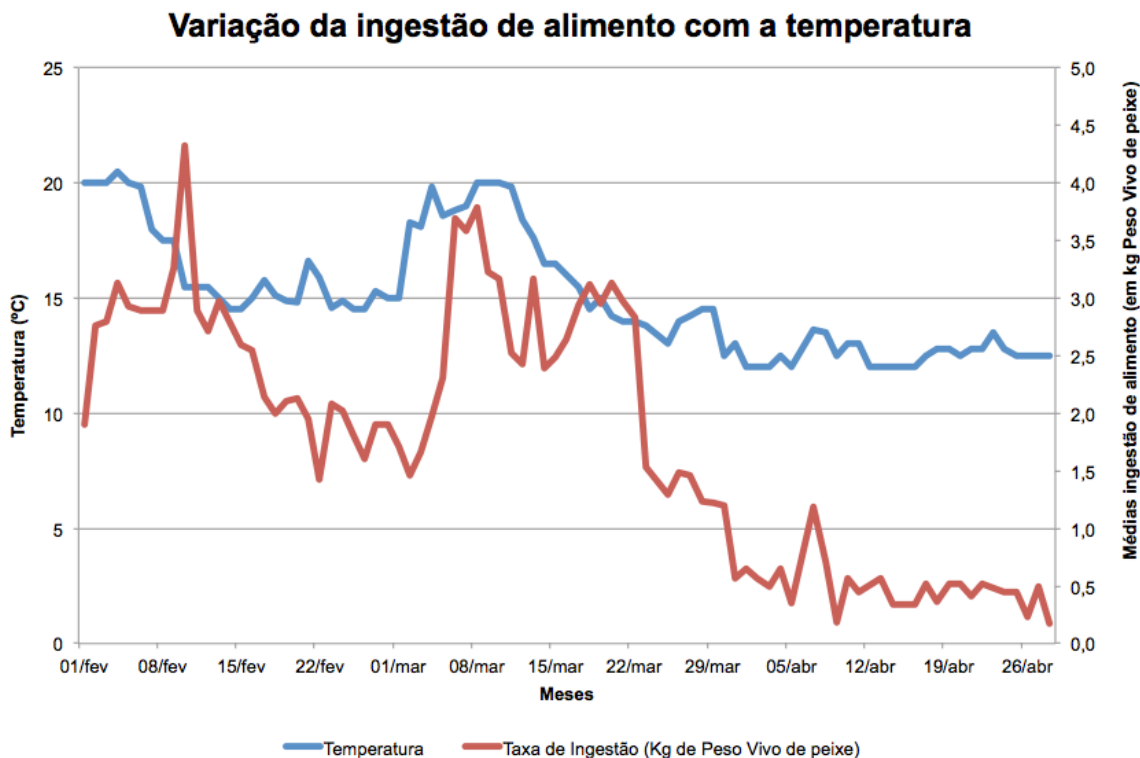


Figura 19: Varição da ingestão diária com o aumento ou diminuição da temperatura. A taxa de ingestão está representada a vermelho e a temperatura a azul. $\text{Ingestão diária (\% \text{ Peso Vivo por dia}) peixe} = \left[\frac{\text{Média de alimento ingerido/dia (g)} \times 100}{\text{Biomassa total do tanque (g)}} \right] \times 100$

Na figura 19 é apresentada a flutuação da temperatura, bem como a ingestão voluntária dos reprodutores (em kg de Peso Vivo), ao longo de 3 meses, nos reprodutores da sala de Outono.

Podemos verificar que as flutuações de temperatura são acompanhadas por uma flutuação da ingestão voluntária. Verifica-se que após uma subida ligeira da temperatura, os peixes aumentaram a ingestão de alimento e, quando a temperatura descia, a sua ingestão de alimento também diminuía (figura 19). Esta modelação não foi imediata, após a subida ou descida da temperatura, o que supõe um pequeno período de adaptação destes animais às mudanças de temperatura. A estreita relação entre a temperatura da água e a taxa de ingestão de alimento é uma característica dos peixes, já que estes são espécies ectotérmicas. Esta característica foi reportada para diferentes espécies de salmonídeos, como a truta arco-íris, truta do Ártico, salmão do Atlântico ou

salmão-rei (Houlihan et al., 2008) e também no linguado senegalês (Guereiro et al., 2012, 2014).

Durante estes 3 meses, foram registados 3 ciclos de desovas, nomeadamente entre 2 e 7 de fevereiro, 8 e 12 de março e 13 e 16 de abril. Verificamos que durante os dias de desova a ingestão foi reduzida. Verifica-se, também que, antes da desova propriamente dita houve, um aumento da ingestão, associada a um aumento da temperatura da água e, possivelmente ao facto dos reprodutores se estarem a preparar para a desova. Este aumento é mais evidente na segunda desova, no entanto na terceira desova, verifica-se que houve um aumento da ingestão antes da desova, não associado a qualquer aumento da temperatura.

Em reprodutores de linguado Senegalês foi verificado que a ingestão voluntária está diretamente relacionada com a temperatura (Filcun, 2012). Estes autores verificaram um aumento da ingestão durante o verão e outono e um posterior declínio durante o inverno, correlacionada com a temperatura. No entanto, verificaram também um aumento de ingestão na primavera, que não estava correlacionado com a temperatura. Segundo estes autores, é provável que este aumento da ingestão esteja relacionado com o aumento das reservas energéticas dos reprodutores antes da desova, o que foi anteriormente relatado por outros autores (Guzmán et al., 2009). Contudo, durante a desova, propriamente dita, verifica-se uma diminuição da ingestão. No presente trabalho, também se verificou que na época de desova os animais ingeriam menos alimento. Uma menor ingestão de alimento durante a desova foi também registada para o linguado senegalês, assim como para outras espécies como a dourada (Martin et al., 2009), truta arco-íris (Nassour e Leger, 1989) e peixe gato (Lal e Singh, 1987). Para estas espécies, verificou-se que durante a maturação sexual, o aumento dos esteróides no sangue coincidia com a diminuição da ingestão voluntária (Guzmán et al., 2009; Norambuena et al., 2013a).

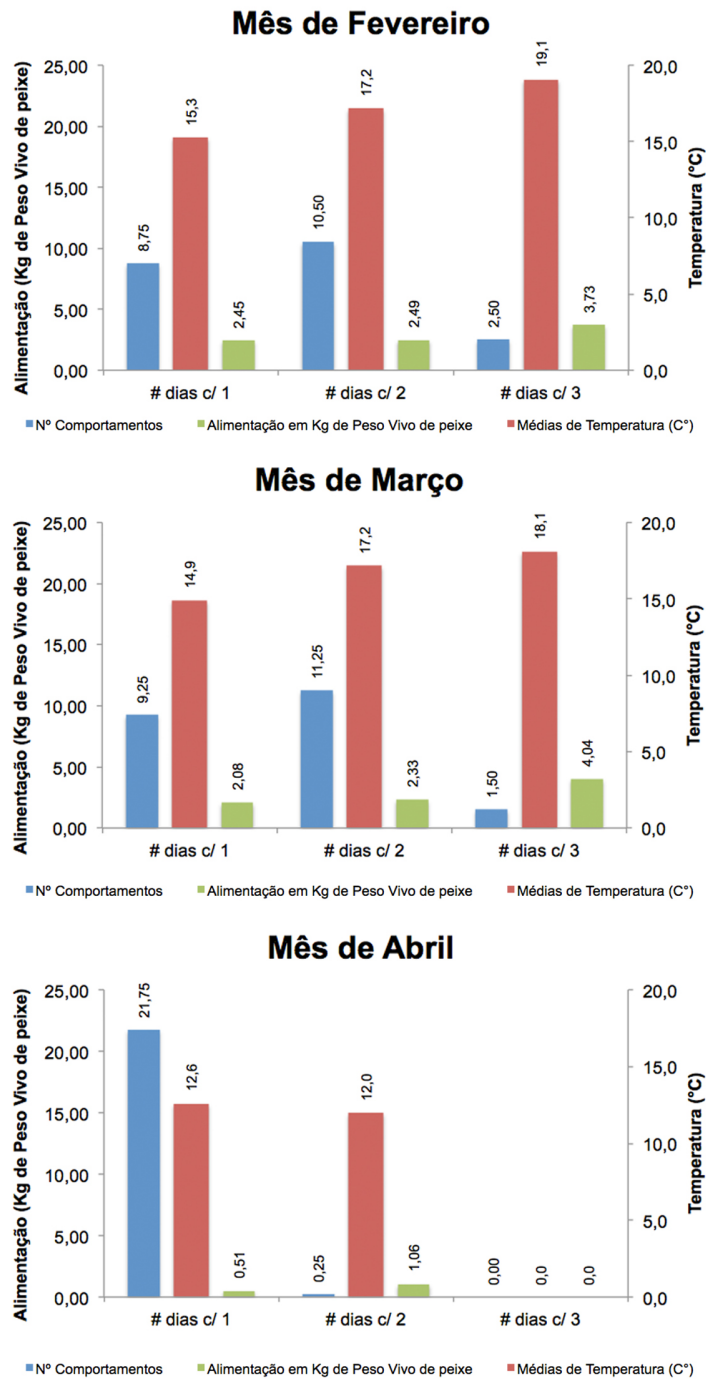


Figura 20: Número total de comportamentos, alimentação (ingestão voluntária de alimento em % do peso vivo) avaliados nos reprodutores de linguados, durante os três meses de ensaio (Fevereiro, Março, Abril). Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

A temperatura influenciou não só a taxa de ingestão voluntária como também o comportamento alimentar, que os animais exibiam aquando da alimentação (figura 20). A temperaturas mais altas os animais apresentaram mais comportamentos do tipo 3, ou seja um comportamento em que a maioria dos peixes do tanque se aproximava e ingeria mais rapidamente o alimento, registando-se também taxas de alimentação mais altas nesses dias (meses de Fevereiro e Março – comportamento 3). A temperaturas intermédias (entre 15-17 °C), os animais apresentavam mais comportamentos do tipo 1 e do tipo 2, em que nenhum ou apenas alguns peixes do tanque se aproximavam e ingeriam o alimento. Aqui, as taxas de alimentação foram relativamente semelhantes, não se observando grande diferença entre a ingestão nestes dias (meses de Fevereiro e Março – comportamentos 1 e 2). No mês de abril, onde foram registadas as temperaturas mais baixas, o número de comportamentos foi maioritariamente do tipo 1, o que se repercutiu nas suas taxas de ingestão. Também neste mês, não se observou comportamentos do tipo 3. Estas observações suportam a hipótese de que, a temperatura influencia não só a ingestão como o comportamento alimentar.

No momento da alimentação, foi avaliada a natação dos reprodutores da empresa. O comportamento foi apenas descrito como positivo, quando existia algum tipo de natação por parte dos peixes, ou negativo, quando não existia natação. Este tipo de comportamento foi desencadeado pela alimentação no entanto, coloca-se a hipótese de estes restar relacionado com comportamento de corte. O comportamento observado aproxima-se do descrito por Carazo et al. (2011) como sendo uma natação de corte específica em reprodutores de linguado do Senegal adaptados ao cativeiro e que pode ser descrito em 3 períodos: 1) período com intensa atividade entre uma potencial fêmea desovante e um macho ou entre eles; 2) a fêmea nada do fundo do tanque acompanhada pelo macho; 3) a fêmea e o macho nadam em sincronia na superfície da água com os ductos genitais juntos e libertam e fertilizam os gâmetas. No entanto, como a avaliação da natação foi realizada apenas no momento da alimentação não nos é possível aferir de este tipo de comportamento se mantinha quando os animais não eram alimentadas. É política da empresa manter a menor perturbação possível nas salas dos reprodutores, uma vez que os linguados são peixes sensíveis a fatores externos.

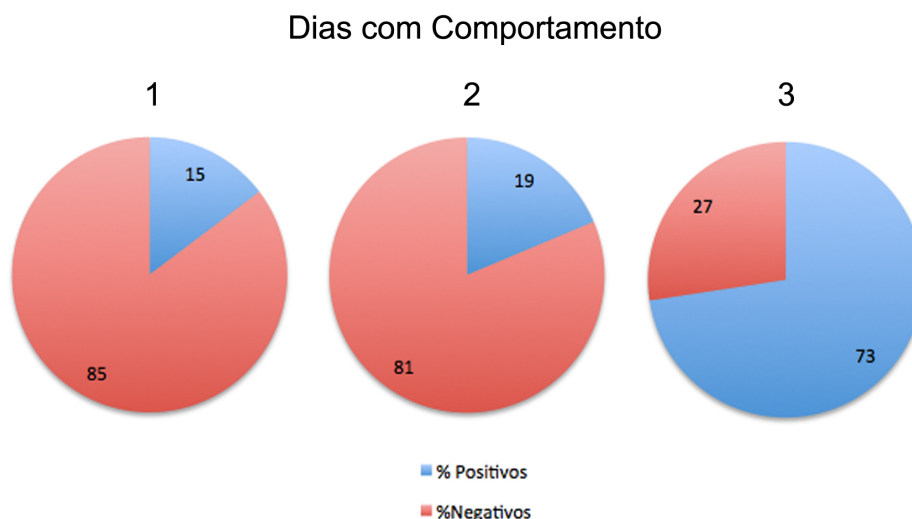


Figura 21: Comparação dos dias com comportamento alimentar 1, 2 ou 3 com o comportamento natatório positivo (com natação) e negativos (sem natação). Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

Na análise da relação dos comportamentos positivos ou negativos (existência ou não de natação, respetivamente) consoante o nível de comportamento exibido aquando a alimentação (1, 2 ou 3), verificou-se que nos dias em que os peixes exibiam menor aproximação e ingestão do alimento, dias 1 e 2, a natação exibida por estes era quase nula (no dia 1 – 85 % e no dia 2 – 81 %). Nos dias com comportamento do tipo 3, onde foram registadas as temperaturas mais altas (correspondentes à altura das posturas) verificou-se um comportamento de natação positiva muito superior ao comportamento negativo, isto é, os peixes exibiam um comportamento que se aproximava daquele descrito por Carazo et al. (2011) (73 % de comportamento positivo comparativamente aos 27 % de comportamento negativo). Verificou-se, também, que nos dias que antecediam a desova, a ingestão foi mais elevada e que os animais registavam maior número de comportamentos 3, e menor número de comportamentos do tipo 1. Assim, poderia ser equacionado que o aumento do comportamento 3 poderia estar relacionado com o comportamento de corte dos linguados que se preparavam para a desova. No entanto, o período de colheita de dados foi relativamente pequeno, não sendo possível estabelecer uma relação entre esta parâmetros.

Estas observações da existência de comportamentos típicos na altura da reprodução foram consistentes com aqueles encontrados por Carazo (2013) e Martín et al. (2014) que descrevem a existência de corte através de uma natação típica de dois indivíduos, um macho e uma fêmea que acasalam nadando em proximidade e de forma coordenada.

Como foi referido anteriormente, uma vez que não nos foi possível aferir o peso dos reprodutores, apenas podemos apresentar os dados “em bruto”, não sendo possível correlacionar os dados obtidos com a maior ou menor performance reprodutiva dos diferentes tanques das diferentes salas. Sendo assim, não foi possível encontrar uma correlação entre o tamanho dos ovos, a taxa de viabilidade e a taxa de eclosão das larvas. No entanto, para a empresa seria importante dar continuidade a estes registos no sentido de desenvolver ferramentas de análise e quantificação da qualidade das desovas de modo a permitir um melhoramento nas posturas.

Ensaio 2 – Efeito da suplementação da dieta com ácido araquidónico no comportamento alimentar de reprodutores (ensaio Repling)

Atualmente está bem estabelecido que a performance reprodutiva e a qualidade dos ovos está fortemente relacionada com o estado nutricional dos reprodutores, ou seja com a disponibilidade dos nutrientes necessários para a gametogénese e o controlo reprodutivo (Izquierdo et al., 2001). De entre os vários nutrientes, a composição em ácidos gordos da dieta é essencial para alcançar uma boa performance e sobrevivência da espécie, em especial os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), o ácido araquidónico (ARA), o ácido eicosapentanoico (EPA) e o ácido docosa-hexanoico (DHA) (Filcun, 2012). Foi observada que a inclusão de níveis altos de ácidos gordos essenciais (EFAs) nas dietas de reprodutores aumenta a taxa de sucesso da desova (Meunpol et al., 2005; Pickova et al., 2007).

Os EFAs são importantes para um bom desenvolvimento embrionário e do saco vitelino, especialmente em espécies que apresentam posturas contínuas e períodos

vitelogénicos curtos (Filcun, 2012). Os EFAs são, também, necessários para a manutenção da permeabilidade da membrana e estão envolvidos no desenvolvimento das funções neurais, sendo constituintes das células do cérebro e dos olhos. O ácido araquidónico (ARA) é um dos EFAs mais estudados em reprodutores de peixes e é considerado um importante fator nutricional para uma reprodução bem sucedida (Filcun, 2012). De fato, o teor ótimo de em EFAs nas dietas de reprodutores tem de ser devidamente avaliado. Nos linguados, foi observado que o aumento do nível de inclusão na dieta de EFAs, acima de determinado nível, pode aumentar a sensibilidade das membranas e a peroxidação lípidica dos espermatozoides, o que posteriormente pode afetar as reservas vitelinas, e conseqüentemente a sobrevivência e o crescimento das larvas após a eclosão e antes da abertura da boca (Ferreira, 2009).

O ARA é o maior precursor de eicosanóicos que incluem, entre outros, as prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXA₂). Em peixes, as PGs tem demonstrado estimular a esteroidogênese ovárica e testicular e a maturação folicular e atuam como hormona ou um “gatilho” que desencadeia o comportamento sexual das fêmeas e uma maior produção de esperma nos machos (Filcun, 2012). Bell et al. (1997) relataram a importância do ARA 20:4n-6, no crescimento, qualidade dos ovos e também na formação de esteróides no desenvolvimento das gônadas.

Considerando as falhas existentes na reprodução das gerações F1 de linguado do Senegal, comparativamente aos bons resultados obtidos com as desovas de indivíduos capturados do meio selvagem, os EFAs, especialmente, o ARA têm sido exaustivamente estudados para determinar a sua influência na reprodução e na disfunção reprodutiva apresentada por esta espécie (Bell e Sargent, 2003; Norambuena et al., 2012; Norambuena et al., 2013a, 2013b). Vários estudos demonstraram que existe maior conteúdo de ARA e seus precursores, produzidos através da elongação e dessaturação do ARA, nos tecidos de peixes selvagens comparado com peixes produzidos em cativeiro (Filcun, 2012).

No estudo 2 foi estudado o efeito da inclusão de ARA na dieta de reprodutores F1 avaliada a nível de ingestão de alimento e comportamento alimentar. Com este objetivo, foram analisadas as taxas de ingestão e avaliado o comportamento alimentar dos

reprodutores alimentados com um dieta controlo (comummente usada na empresa) e com outra suplementada com ARA.

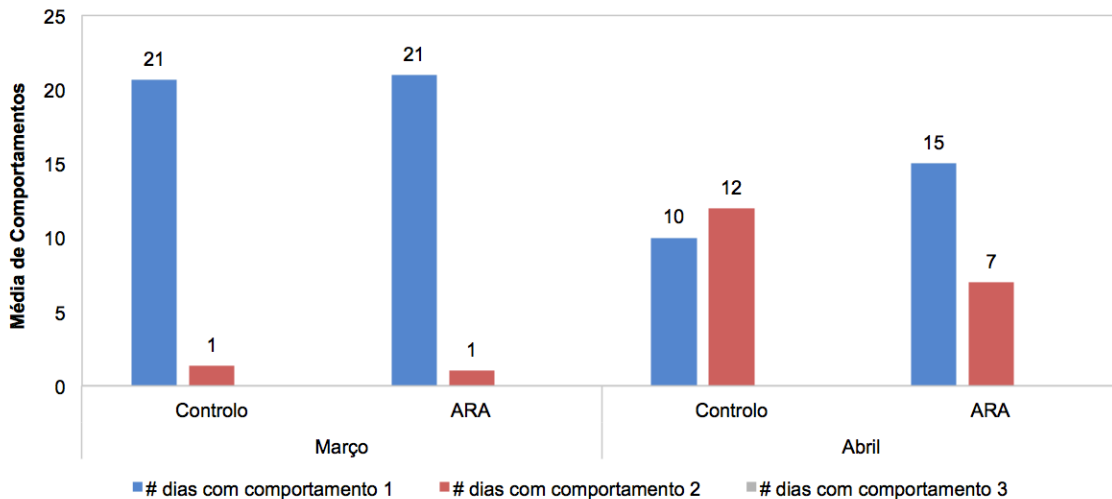


Figura 22: Número total de comportamentos avaliados nos reprodutores de linguados dos grupos de controlo e teste (ARA), durante os dois meses de ensaio. Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento; Comportamento 3 - A maioria dos peixes aproxima-se e ingere o alimento.

Analisando o comportamento dos reprodutores verificou-se que no mês do Março registaram-se na sua maioria comportamentos do tipo 1, caracterizado pela não aproximação nem ingestão imediata por parte de nenhum peixe no tanque. No mês de Abril, os comportamentos registados foram do tipo 1 e do tipo 2, este último caracterizado pela aproximação e ingestão de alimento por parte de alguns peixes do tanque. Neste mês, a média de número de comportamentos do tipo 1 ou 2 foi semelhante (15 e 19, respetivamente) e verificaram-se mais registos de comportamentos do tipo 2 na dieta controlo. Em nenhum dos meses foi registado comportamento do tipo 3, caracterizado por existir uma grande aproximação e ingestão de alimento pelos peixes.

O comportamento alimentar não foi muito ativo, o que pode ter sido devido às baixas temperaturas registadas nos dois meses de ensaio (13,5 °C). Esta observação

está de acordo com as realizadas nos reprodutores da produção em que (ensaio 1). Neste, a temperaturas mais baixas (12 °C) os peixes também apresentaram mais comportamentos do tipo 1. Apesar de existirem algumas diferenças na média dos comportamentos 1 e 2 no mês de Abril, estas observações não apontaram para nenhum tipo de preferência da dieta controlo ou a dieta ARA.

Na tabela 3 são apresentados os dados obtidos da ingestão voluntária das dietas experimentais, expressa em % do peso vivo de peixe, e o número de comportamentos positivos ou negativos, ou seja, com natação ativa ou sem natação, respetivamente.

Tabela 3: Avaliação da taxa de ingestão, comportamentos positivos ou negativos na dieta controlo e na dieta teste, durante os 60 dias*.

Comportamento	1	1	2	2
Dieta	CTL	ARA	CTL	ARA
Ingestão (% do peso vivo)	0,24±0,15	0,15±0,1	0,28±0,25	0,24±0,11
Comportamentos Positivos	1,5±1,6	0,3±0,5	0,8±0,4	1,25±1,5
Comportamento Negativos	13,8±5,5	17,5±5,6	7,2±5,6	5±5,0
Two-way ANOVA	Dieta	Comp	Interaction	
Ingestão (% do peso vivo)	ns	ns	ns	
Comportamentos Positivos	ns	ns	ns	
Comportamento Negativos	ns	0,001	ns	

*Os valores são representados como média±desvio padrão e foram submetidos a uma análise de comparação de médias, aplicando o teste Two-way ANOVA, com um nível de significância de 5%.

Comp – Comportamento alimentar dos peixes. Comportamento 1 - Nenhum peixe se aproxima e ingere o alimento; Comportamento 2 - Um ou mais peixes aproximam-se e ingerem o alimento;

Ingestão (% do peso vivo) = [(Alimentação ingerida (g) * 100) / Biomassa do tanque (g)].

Comportamentos positivos – Existia natação no tanque; Comportamentos negativos – não existia natação no tanque.

Em relação à taxa de ingestão e análise do comportamento alimentar não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a dieta controlo ou a suplementada com ARA, não existindo aparente preferência por qualquer tipo de dieta. Norambuena et

al. (2012) observou que os linguados tinham variações nas preferências por dietas ARA durante o ano, relacionado com as mudanças sazonais na temperatura da água. Esta preferência ocorria gradualmente, em paralelo com o aumento da temperatura da água, começando no final do Inverno (12 °C) e alcançando o máximo no início do Outono (21 °C) com um decréscimo bastante acentuado no início da Primavera com a queda da temperatura da água. Noutro estudo com linguado senegalês, também foi observado que preferência de dietas ricas em ARA ocorria quando a temperatura da água era mais alta, ou seja durante os meses verão e início de outono e mais baixa durante os meses de inverno (Filcun, 2012). Em estudos com outras espécies, como a solha (*Solea solea*), o capelim (*Mallotus villosus*) e sargo (*Diplodus sargus*) demonstrou-se que existia uma variação sazonal na composição de ácidos gordos, bem como na necessidade de nutrientes (Henderson et al., 1984; Pérez et al., 2007), suportando também a ideia de que os animais escolhem os nutrientes conforme as suas necessidades. Neste estudo não foi possível obter tal relação, uma vez que a duração do ensaio foi relativamente curta, não existindo grandes flutuações de temperatura.

Norambuena et al. (2012) também demonstrou que o conteúdo de ARA foi significativamente maior nas gonadas de machos do que de fêmeas de linguado, o que sugere que existem diferenças nas preferências alimentares entre machos e fêmeas, durante o período de reprodução.

No presente trabalho, independentemente da dieta, verifica-se que a taxa de comportamentos negativos, em que não existiu natação é significativamente maior nos animais com comportamento 1 (sem qualquer tipo de aproximação ou ingestão de alimento) do que nos com comportamento 2 (em que alguns dos peixes do tanque se aproximam e ingerem a comida). Esta observação pode ser explicada pelas baixas temperaturas registadas nos meses de ensaio (13,5 °C) que se repercutiu tanto no comportamento alimentar, ou seja na aproximação ao alimento, como na atividade natatória.

No presente estudo não se verificou um efeito do teor em ARA da dieta na ingestão voluntária de alimento ou no comportamento alimentar. Verificou-se que, independentemente da dieta, o comportamento natatório, afeta significativamente o comportamento alimentar.

IV - Conclusão

A avaliação da performance reprodutiva é de elevada importância numa maternidade pois esta determina toda a produção de larvas. Com base nos resultados obtidos não foi possível aferir as razões para as diferentes performances reprodutivas registadas nos diferentes tanques e salas dos reprodutores. No entanto, podemos concluir que a elaboração de um registo diário da alimentação, comportamento alimentar, e performance reprodutiva dos reprodutores poderá constituir uma valiosa ferramenta para a empresa de modo a aferir com maior exatidão a qualidade das desovas, bem como os fatores que a afetam e assim melhor os lotes e sincronização das desovas. Os estudos em reprodutores são estudos morosos sendo por isso necessário prolongar a recolha deste tipo de dados para se obterem resultados mais fiáveis que possibilitem a implementação de protocolos de melhoramento da performance reprodutiva.

Na avaliação do efeito da suplementação das dietas dos reprodutores com ácido araquidónico não foram observadas preferências por qualquer tipo de dieta utilizada. No entanto, o estudo da inclusão do ácido araquidónico é importante uma vez que este tem demonstrado regular diversos aspetos da função endócrina, modificando a composição do esperma e conseqüentemente a performance reprodutiva dos machos. Por este motivo, as etapas futuras do projeto serão analisar a composição dos ovos e do esperma provenientes de peixes alimentados com suplementação de ácido araquidónico.

É importante salientar que a realização de ensaios experimentais, em condições industriais ou em condições laboratoriais é díspar, uma vez que em laboratório é possível um maior controlo das variáveis que poderão afetar direta ou indiretamente os resultados de um ensaio. No entanto, a investigação em aquaculturas é de extrema importância uma vez que só assim será possível otimizar as produções.

No cômputo geral, este estágio permitiu adquirir novas competências em ambiente real de produção, o que poderá ser uma mais-valia em termos profissionais, num futuro próximo.

Bibliografia

- Andrade, T. S. (2012). Effects of different stocking densities on growth, feed-intake, oxidative stress status and humoral immune parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. Tese de Mestrado em Ciências do Mar e Recursos Marinhos. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto, Porto. 47 pp.
- Anguis, V., Cañavate, J.P. (2005). Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*. **243**: 133-145.
- Aquaculture: Opportunities and challenges. Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Badiola, M., Mendiola, D., Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*. **51**: 26-35.
- Baynes, S. M., Howell, B. R. (1996). The influence of egg size and incubation temperature on the condition of *Solea solea* (L.) larvae at hatching and first feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **199**: 59-77.
- Beirão, J., Soares, F., Pousão-Ferreira, P., Diogo, P., Dias, J., Dinis, M. T., Herráez, M. P., Cabrita, E. (2015). The effect of enriched diets on *Solea senegalensis* sperm quality. *Aquaculture*. **435**: 187-194.
- Bell, J. G., Sargent, J. R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*. **218**: 491-499.
- Bobé, J., Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*. **165**: 535-548.
- Brooks, S., Tyler, C. R., Sumpter, J. P. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **7**: 387-416.

- Buentello, J. A., Gatlin III, D. M., Neill, W. H. (2000). Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. **182**: 339-352.
- Bureau, D.P., Kaushik, S.J., Y, C.C. (2002). *Bioenergetics in Fish Nutrition*. Em: J.E.H.a.R.W Hardy (eds.). Academic Press. San Diego.
- Cabral, I.L. (2014). Estágio na Aquacultura Safiestela – Efeito da manipulação do fotoperíodo no crescimento e utilização do alimento em juvenis de linguado (*Solea senegalensis*). Tese de Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos. Faculdade de Ciências – Universidade do Porto, Porto.
- Carazo, I., Martin, I., Hubbard, P., Chereguini, O., Mañanós, E., Canário, A., Duncan, N. (2011). Reproductive behaviour, the absence of reproductive behaviour in cultured (G1 generation) and chemical communications in the senegalese sole (*Solea senegalensis*). Proceedings of the 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Cochin, India, 9-14 Agosto 2011. pp. 96-97.
- Cardinaletti, G., Mosconi, G., Salvatori, R., Lanari, D., Tomassoni, D., Carnevali, O., Polzonetti-Magni, A. M. (2009). Effect of dietary supplements of mussel and polychaetes on spawning performance of captive sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*. **113**: 167-176.
- Carrasquinho, R. (2009). Gestão e manejo de uma unidade de piscicultura em mar aberto na costa sul de Portugal. Tese de Mestrado em Aquacultura e Pescas. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade do Algarve, Algarve. 107 pp.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. (2007). Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*. **270**: 1-14.
- DGPM Direcção-Geral de Política do Mar. (2013). Estratégia Nacional para o Mar 2013-2020. Lisboa, Portugal.

- Dinis, M.T. (1992). Aspects of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to an artificial diet. *Aquaculture and Fisheries Management*. **23**: 515-520.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F. e Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*. **176**: 27-38.
- Ebeling, J., Jensen, G., Losordo, T., Masser, M., McMullen, J., Pfeiffer, L., Rakocy, J., Sette, M. (1995). Model Aquaculture Recirculating System (MARS). Iowa State University, Agricultural Education and Studies, Ames, Iowa.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. (2014). The State of Worlds Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- FAO Fisheries Technical Paper. No. 361 (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Roma: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M, Montero, D. (1997). The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. **148**: 233-246.
- Ferreira, P. M. (2009). *Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos* (IPIMAR ed.). Lisboa, Portugal.
- Filcun, F.N. (2012). Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) broodstock nutrition: arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) and reproductive physiology. Tese de Doutoramento em Ciências Experimentais. Universidade Autónoma de Barcelona.
- Fishbase. Acedido em: 25, Junho, 2014, em: <http://www.fishbase.org/summary/Solea-senegalensis.html>.
- Fisheries - European Comission. (2014). Facts and figures on the Common Fisheries Policy. p. 48pp.

- Geffen, A. J., Nash, D. M. R. (2012). Egg development rates for use in egg production methods (EPMs) and beyond. *Fisheries Research*. **117-118**: 48-62.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. (2012). Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* **18**: 98-106.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro, C., Perez-Jimenez, A., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. (2014). Water temperature does not affect protein sparing by dietary carbohydrate in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture Research*. **45**: 289-298.
- Gutierrez-Wing, M. T., Malone, R. F. (2006). Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*, 34, 163-171.
- Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C, Mañanós, E.L. (2009). Spawning performance and plasma levels of GnRH α and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRH α -delivery systems. *Aquaculture*. **291**: 200-209.
- Halver, J.E., Hardy, R.W. (2002). *Fish Nutrition*. 3ª Edição. Elsevier Science. California, EUA.
- Houlihan, D., Boujard, T., Joblin, M. (2008). *Food intake in fish*. Blackwell Science.
- Howell, B., Prockett, R., Baynes, S., Canavate, P. (2003). The cultivation of Soles. Relatório do 2º workshop no CICEM El Toruño, Cadiz, Espanha, 29 Setembro-1 Outubro. pp.21.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P. (2003). A review of the culture potential of *Solea Solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **13**: 379-407 pp.
- INE e DGRM Instituto Nacional de Estatística e Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. (2014). Estatísticas da Pesca 2013. Lisboa, Portugal.

- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A. G. J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. **197**: 25-42.
- Kamler, E. (1992). *Early Life History of Fish: An energetics approach*. Springer Science, Lomianki, Poland, 262 pp.
- Lal, B. e Singh, T. (1987). Changes in tissue lipid levels in the freshwater catfish (*Clarias batrachus*) associated with the reproductive cycle. *Fish Physiology and Biochemistry*. **3**: 191-201.
- Luquet, P. e Watanabe, T. (1986). Interaction “nutrition-reproduction” in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. **2**: 121-129.
- Marinho, G., Peres, H., Carvalho, A.P. (2014). Effect of feeding time on dietary protein utilization and Growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture research*. **45**: 828-833 pp.
- Martín, I., Rasines, I., Gómez, M., Rodríguez, C., Martínez, P., Chereguini, O. (2014). Evolution of egg production and parental contribution in Senegalese sole, *Solea senegalensis*, during four consecutive spawning seasons. *Aquaculture*. **424**: 45-52.
- Martín, M.V., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Pérez, M.J., Jerez, S., Lorenzo, A. (2009). Body lipid and fatty acid composition in male gilthead seabream broodstock at different stages of the reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 and n-6 HUFA. *Aquaculture Nutrition*. **15**: 60-72.
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., Verdegem, M. C. J., Heinsbroek, L. T. N., Schneider, O., Blancheton, J. P., Roque d’Orbcastel, E., Verreth, J. A. J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*. **43**: 83-93.
- Matusse, N.R.D (2012). Avaliação da qualidade dos ovos e das larvas de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) através da manipulação alimentar dos seus reprodutores. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica. *Departamento de Ciências Agrárias – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo*.

- Morais, S., Mendes, A.C., Castanheira, M. F., Coutinho, J., Bandarra, N., Dias, J., Conceição, L. E. C., Pousão-Ferreira, P. (2014). New formulated diets for *Solea senegalensis* broodstock: Effects of parental nutrition on biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids and performance of early larval stages and juvenile fish. *Aquaculture*. **432**: 374-382.
- Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmerman, S. (Org.) (2001). *Fundamentos da moderna aqüicultura*. 1ª edição, editora da ULBRA. Brasil.
- Muenpol, O., Meejing, P., Piyatiratitivorakul, S. (2005). Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture research*. **36**: 1216-1225.
- Nassour, I. e Leger, C.L. (1989). Deposition and mobilization of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri*). *Aquatic Living Resources*. **2**: 153-159.
- Norambuena, F., Estévez, A., Mañanós, E., Bell, J. G., Carazo, I., Duncan, N. (2013a). Effects of graded levels of arachidonic acid on the reproductive physiology of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Fatty acid composition, prostaglandins and steroid levels in the blood of broodstock bred in captivity. *General and Comparative Endocrinology*. **191**: 92-101.
- Norambuena, F., Estévez, A., Sánchez-Vázquez, F. J., Carazo, I., Duncan, N. (2012). Self-selection of diets with different contents of arachidonic acid by Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock. *Aquaculture*. **364-365**: 198-205.
- Norambuena, F., Morais, S., Estévez, A., Bell, J.G., Tocher, D.R., Navarro, J.C., Cerdà, J., Duncan, N. (2013b). Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock reared in captivity. *Aquaculture*. **372-375**: 80-88.
- Oliveira, C., Dinis, M. T., Soares, F., Cabrita, E., Pousão-Ferreira, P., Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Lunar and daily spawning rhythms of Senegal sole *Solea senegalensis*. *Journal of Fish Biology*. **75**: 61-74.

- Ortega, I. C. (2012). Comportamiento reproductivo y fisiología del lenguado senegalés, (*Solea senegalensis*) en cautividad. Programa de Doctorado en Fisiología. Facultad de Biología – Universidad de Barcelona. 326 pp.
- Pickova, J., Brannas, E., Anderson, T. (2007). Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Artic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquaculture International*. **15**: 305-311.
- Piedrahita, R. H. (2003). Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*. **226**: 35-44.
- Rijn, J. (2013). Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 53, 49-56.
- Schneider, O., Schram, E., Kals, J., van der Heul, J., Kankainen, M. and van der Mheen, H. (2012). Welfare interventions in flatfish recirculating aquaculture systems and their economical implications. *Aquaculture Economics & Management*. **16**: 399-413.
- Sea8 (2015). Better Business. Acedido a 20 de Agosto de 2015, em: <http://www.sea8.eu/pt>.
- Sharrer, M. J., Summerfelt, S. T. (2007). Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. *Aquaculture Engineering*. **37**: 180-191.
- Shields, RJ; Brown, NP; Bromage, NR, (1997). Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture*. **155**: 1-12.
- Summerfelt, S. T. (2003). Ozonation and UV irradiation – an introduction and examples of current applications. *Aquaculture Engineering*. **28**: 21-36.
- Summerfelt, S. T., Vinci, B. J., Piedrahita, R. H. (2000). Oxygenation and carbon dioxide control in water reuse systems. *Aquacultural Engineering*. **22**: 87-108.
- Tveiten, H., Solevåg, S.E., Johnsen, H.K. (2001). Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolfish. *Journal of Fish Biology*. **58**: 374-385.

- Villanueva, J. L. R., Alonso, J. B. P (2014). Cuadernos de acuicultura – Cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). 1ª edição. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid.
- Zhang, S.-Y., Li, G., Wu, H.-B., Liu, X.-G., Yao, Y.-H., Tao, L., Liu, H. (2011). An integrated recirculating aquaculture system (RAS) for land-based fish farming: The effects on water quality and fish production. *Aquaculture Engineering*. **45**: 93-102.