

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Utilização de Microdietas Encapsuladas na Alimentação de Larvas de Camarões Ornamentais (*Lysmataamboinensis*)

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Andreia Sofia Martins Vitorino

Orientador: Professor Doutor Paulo José de Azevedo Pinto Rema



Vila Real, 2020

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Utilização de Microdietas Encapsuladas na Alimentação de Larvas de Camarões
Ornamentais (*Lysmataamboinensis*)**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Andreia Sofia Martins Vitorino

Orientador: Professor Doutor Paulo José de Azevedo Pinto Rema

Composição do Júri:

Presidente: Doutor António Mário Domingues Silvestre, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Vogais: Doutor Rui Jorge Miranda Rocha, Investigador do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro;

Doutor José Júlio Gonçalves Barros Martins, Professor Auxiliar do Departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;

Doutor Paulo José de Azevedo Pinto Rema, Professor Associado com Agregação do Departamento de Zootecnia da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Vila Real, 2020

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para efeito de obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica.

Este trabalho é parte do projeto ORNAFEEDS-17913, apoiado por Portugal e pela União Europeia através do FEDER, COMPETE 2020 e CRESC Algarve 2020, no âmbito do Portugal 2020.

This work is part of project ORNAFEEDS-17913, supported by Portugal and the European Union through FEDER, COMPETE 2020 and CRESC Algarve 2020, in the framework of Portugal 2020.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

- Ao professor Paulo Rema, por todos os ensinamentos e por desde sempre ser incansável;
- À equipa do Biotério de Organismos Aquáticos da UTAD;
- À minha família, que sempre me apoiou e me permitiu estar onde estou hoje;
- Ao João, por todo o apoio e paciência;
- À Inês e ao Jorge, fundamentais;
- À Filipa e à Rita, as minhas Pipas;
- À Transa Cooperativa Cultural e ao Teatro Municipal de Vila Real, por terem tornado estes 2 anos mais especiais;
- À ESAS, por me ter dado as melhores bases e as melhores pessoas.

Resumo

Globalmente, a aquacultura fornece cerca de 50% do peixe destinado ao consumo humano. Embora a produção de peixes ósseos domine a aquacultura de águas interiores, tem-se assistido a um crescimento na produção de outros grupos de espécies, principalmente de crustáceos. A aquacultura de espécies marinhas ornamentais é a alternativa utilizada à recolha de animais selvagens dos recifes de coral para satisfazer o comércio de espécies para aquários marinhos. O sucesso da produção em cativeiro destas espécies depende de características como a duração da fase larvar, o tamanho mínimo de comercialização e as necessidades nutricionais.

Com o objetivo de avaliar até que ponto algumas estratégias tecnológicas (como a utilização de sistemas de alimentação em suspensão) e nutricionais (como a utilização de microdietas encapsuladas) podem contribuir para modelar e melhorar o crescimento e a sobrevivência das fases larvares em crustáceos decápodes com interesse comercial, foi utilizado o camarão ornamental *Lysmata amboinensis* como modelo biológico.

Foram adquiridos 12 animais adultos que foram utilizados como reprodutores e permitiram a obtenção de larvas para a execução de, pelo menos, três réplicas de cada um dos nove tratamentos estudados: um constituído por uma mistura comercial baseada em microalgas liofilizadas (MA), três microdietas encapsuladas (A, B, C), dois alimentos vivos congelados (náuplios de *Artemia* congelados (NAc) e rotíferos congelados (ROc)), um alimento liofilizado (*Artemia* adulta (AL)) e um alimento vivo (náuplios de *Artemia* (NAv)). Na fase final do estudo foi testado um regime alimentar suplementar, em *co-feeding*, que resultou da combinação das duas dietas que apresentaram melhores resultados de sobrevivência (dieta A+NAv).

No que diz respeito à sobrevivência, foi possível constatar o fraco desempenho das dietas inertes quando comparadas com as dietas congeladas e vivas, tendo sido o regime *co-feeding* aquele que promoveu o melhor desempenho, com registo de 95% de sobrevivência larvar aos 15 dias. O padrão de atividade larvar relacionou-se diretamente com as taxas de sobrevivência larvar.

As larvas foram observadas ao microscópio de forma regular para poder acompanhar as mudas e conseqüente passagem para fases larvares mais avançadas. Também neste parâmetro o regime *co-feeding* foi aquele que permitiu atingir o estado larvar mais avançado. Foi possível concluir que os camarões são animais que apresentam uma complexidade extrema, com destaque para esta espécie ornamental, apresentando uma diversidade

considerável nas fases iniciais do seu desenvolvimento que são muito influenciadas pelas suas necessidades nutricionais e pelos aspetos relacionados com a sua fisiologia.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização do regime *co-feeding* poderá constituir uma base de estudo importante para trabalhos futuros, de modo a ultrapassar a notável dificuldade da alimentação e produção industrial de larvas desta espécie.

Palavras-chave: crustáceos; dietas; *co-feeding*; sobrevivência; atividade larvar.

Abstract

Overall, aquaculture provides around 50% of the fish intended for human consumption. Though the production of finfish rules the inland aquaculture, there has been a production growth of other groups of species, mainly crustaceans. Marine ornamental species aquaculture is an alternative used to the collection of wild animals from the coral reefs to please the species trade for marine aquariums. The success of the production of these species in captivity depends on features like the length of the larval phase, the minimum size of trade and nutritional needs.

With the aim of evaluating to what extent some technological (such as suspension feeding systems) and nutritional strategies (such as the use of encapsulated microdiets) can contribute to shape and improve the growth and survival of the larval stages in decapod crustaceans with commercial interest, the ornamental shrimp *Lysmata amboinensis* was used as a biological model.

There were acquired 12 adult animals that were used as breeding stock and allowed the acquisition of larvae for the execution of, at least, three replicas of each of the nine treatments studied: one made up by a commercial mixture based on lyophilized micro-algae (MA), three encapsulated micro-diets (A, B, C), two frozen living foods (frozen *Artemia* nauplii (NAc) and frozen rotifers (ROc)), one lyophilized food (adult *Artemia* (AL)) and one living food (*Artemia* nauplii (NAv)). In the final stage of the research it was tested an additional diet, co-feeding, that was a combination of the two best survival result diets (A+NAv).

Concerning survival, it was possible to determine the weak performance of the inert diets when compared to the frozen and living ones, having the co-feeding diet the one promoted the best performance, with 95% of survival by day 15. The larval activity pattern was related directly to the larval survival rates.

The larvae were observed regularly under the microscope in order to keep up with their changes and consequent passage to further larval stages. Also in this parameter, the co-feeding diet was the one that allowed to reach a more advanced larval stage.

It emerged clearly that shrimps are animals that have an extreme complexity, with emphasis on this ornamental specie, showing a considerable diversity on the initial stages of its development that are very influenced by their nutritional needs and by physiology related aspects.

The results obtained suggest that the use of a co-feeding diet can be an important study baseline to further researches in order to surpass the evident difficulty of feeding and industrial production of this specie larvae.

Keywords: crustaceans; diets; co-feeding; survival; larval activity.

Índice

I. Introdução	1
II. Revisão Bibliográfica	3
1. Produção mundial de crustáceos em aquacultura	3
1.1. Produção de crustáceos em Portugal.....	5
2. Comércio internacional de camarões ornamentais.....	6
2.1. Principais espécies	7
3. Espécie <i>Lysmataamboinensis</i>	7
3.1. Taxonomia.....	8
3.2. Morfologia	8
3.3. Ecologia.....	11
3.4. Reprodução	11
3.5. Nutrição e alimentação.....	13
3.6. Manutenção de reprodutores	17
4. Instalações para cultivos larvares.....	20
5. Dietas para larvas.....	22
III. Material e Métodos	27
1. Animais e instalações	27
2. Dietas	30
3. Análises	32
IV. Resultados	33
1. Sobrevivência larvar	33
2. Atividade larvar	34
2.1. Evolução das fases larvares	35
V. Discussão de Resultados	39
1. Sobrevivência larvar	39
1.1. Regime alimentar – dietas inertes.....	40
1.2. Regime alimentar – alimentos vivos liofilizados.....	41
1.3. Regime alimentar – alimentos vivos/congelados	41
1.4. Regime alimentar – <i>co-feeding</i>	42
VI. Considerações Finais.....	43
VII. Referências Bibliográficas	45

I. Introdução

O aumento significativo das capturas por pesca e produção em aquacultura desde o meio do século XX, especialmente nas duas últimas décadas, tem vindo a reforçar a procura mundial pelo consumo de uma alimentação variada e nutritiva.

Desde 1961, o aumento da média anual no consumo global aparente de peixe (3,2%) ultrapassou o crescimento populacional (1,6%) e excedeu o consumo de carne de animais terrestres, combinados (2,8%) e individualmente (bovinos, ovinos, suínos e outros), com exceção das aves (4,9%). Em termos de análise *per capita*, o consumo de peixe aumentou dos 9 kg em 1961, para 20,2 kg em 2015, com uma taxa média de crescimento anual de 1,5%. Em 2016 e 2017 foi confirmada a tendência para esse crescimento com valores que oscilaram entre 20,3 e 20,5 kg de peixe, respetivamente.

Este aumento do consumo *per capita* tem sido impulsionado não só pelo aumento da produção, mas também pela combinação de vários outros fatores como a redução de desperdícios, melhor utilização dos produtos, melhoria dos canais de distribuição e aumento da procura, associados ao aumento da população mundial, dos rendimentos e da urbanização (FAO, 2018).

Globalmente, a aquacultura fornece cerca de 50% do peixe destinado ao consumo humano (Nielsen *et al.*, 2017). A produção mundial de peixe atingiu o seu pico em 2016 com cerca de 171 milhões de toneladas (MT; Figura 1), sendo que a partir daí foi estabilizando nesse valor até ao final dos anos 80. Essa é uma das razões que explica o crescimento da atividade da aquacultura como tendo sido responsável pelo contínuo crescimento e fornecimento de peixe para consumo humano nas últimas décadas (FAO, 2018).

O comércio de peixe e produtos pesqueiros é caracterizado por uma enorme variedade de espécies e formas de produtos.

A expansão da produção em aquacultura, especialmente em camarões, salmão, moluscos bivalves, tilápia, carpa e peixe-gato reflete-se nas taxas de crescimento relativo do consumo *per capita* dos diferentes grupos de espécies nos últimos anos. Desde 2000, a taxa média de crescimento anual tem sido mais significativa para peixes de água doce (3,1%), moluscos (excluindo cefalópodes; 2,9%) e crustáceos (2,8%). Deve ser referido que algumas espécies carnívoras mais valorizadas como o camarão, a gamba, o salmão, o atum e o robalo

representam um comércio muito ativo mas essencialmente direcionado para mercados de países mais prósperos (FAO, 2018).

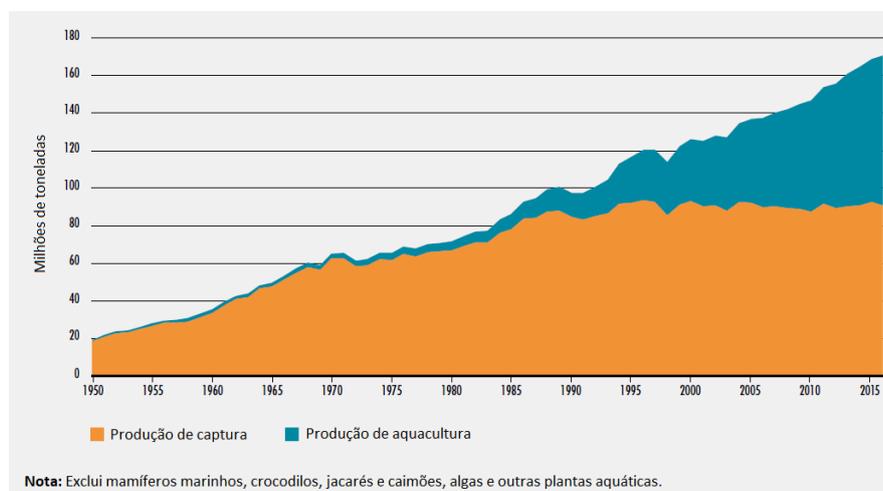


Figura 1. Capturas de pesca e aquicultura mundiais. Adaptado de FAO (2018).

Um setor satélite da produção aquícola diz respeito à produção de espécies para fins ornamentais que são altamente valorizadas. Todavia, a produção em regime de aquicultura de espécies marinhas ornamentais de água salgada é uma vertente ainda relativamente recente que pretende ser uma alternativa à recolha dos animais no seu estado selvagem, bem como uma ajuda ao repovoamento no seu meio. No entanto, ainda é necessário percorrer um longo caminho no que diz respeito à maioria das espécies. De facto, a gestão de reprodutores, a indução de desovas, a produção e a nutrição das larvas, as doenças, os sistemas aquáticos e custos produtivos são alguns dos obstáculos à produção intensiva comercial (Calado, Olivotto, Oliver & Holt, 2017).

Neste trabalho, o camarão *Lysmata amboinensis* será utilizado como modelo biológico representativo de outros crustáceos decápodes com interesse comercial. Pretende-se avaliar até que ponto algumas estratégias tecnológicas (sistemas de alimentação em suspensão) e nutricionais (microdietas encapsuladas) podem contribuir para modelar e melhorar o crescimento e a sobrevivência das fases larvares. Os dados obtidos podem ser extrapolados, com alguma margem de segurança, para outras larvas de camarões com interesse ornamental e/ou para a alimentação humana como é o caso do camarão de patas brancas (*Litopenaeus vannamei*).

II. Revisão Bibliográfica

1. Produção mundial de crustáceos em aquacultura

Embora a produção de peixes ósseos domine a aquacultura de águas interiores, tem-se assistido a um crescimento na produção de outros grupos de espécies, principalmente de crustáceos na Ásia, tais como camarões, lagostins e caranguejos, como é possível observar na Tabela 1 (FAO, 2018).

Tabela 1 – Produção em aquacultura dos principais grupos de espécies de peixes por continente em 2016 (milhares de toneladas; peso vivo). Adaptado de FAO (2018).

Categoria	África	Américas	Ásia	Europa	Oceania	Mundo
Aquacultura interior						
Peixes ósseos	1 954	1 072	43 983	502	5	47 516
Crustáceos	0	68	2 965	0	0	3 033
Moluscos			286			286
Outros animais aquáticos		1	531			531
Subtotal	1 954	1 140	47 765	502	5	51 367
Aquacultura marinha e costeira						
Peixes ósseos	17	906	3 739	1 830	82	6 575
Crustáceos	5	727	4 091	0	6	4 829
Moluscos	6	574	15 550	613	112	16 853
Outros animais aquáticos	0		402	0	5	407
Subtotal	28	2 207	23 781	2 443	205	28 664
Toda a aquacultura						
Peixes ósseos	1 972	1 978	47 722	2 332	87	54 091
Crustáceos	5	795	7 055	0	7	7 862
Moluscos	6	574	15 835	613	112	17 139
Outros animais aquáticos	0	1	933	0	5	939
Total	1 982	3 348	71 546	2 945	210	80 031

No que diz respeito às espécies produzidas, os peixes ósseos dominam com 27 espécies, perfazendo 90% do total da produção em 2016. Na Tabela 2 é possível observar as principais espécies de crustáceos produzidas, sendo que o camarão *Penaeus vannamei* é o mais produzido (FAO, 2018). Este camarão é considerado o mais adaptado para a produção industrial devido à sua alta rusticidade, rapidez de crescimento e tolerância a diferentes salinidades, entre outros (Ribeiro *et al.*, 2014).

Os camarões marinhos dominam a produção de crustáceos em aquacultura costeira e são uma importante fonte de rendimento para vários países em desenvolvimento na Ásia e América Latina. Embora a pesca de camarão selvagem contribua para os elevados valores de fornecimento, atualmente o grosso da sua produção deriva da atividade da aquacultura (FAO, 2018).

Tabela 2 – Espécies de crustáceos mais produzidas em aquacultura a nível mundial. Adaptado de FAO (2018).

	2010	2012	2014	2016	% do total, 2016
Crustáceos					
<i>Penaeus vannamei</i>	2 688	3 238	3 697	4 156	53
<i>Procambarus clarkii</i>	616	598	721	920	12
<i>Eriocheir sinensis</i>	593	714	797	812	10
<i>Penaeus monodon</i>	565	672	705	701	9
<i>Macrobrachium nipponense</i>	226	237	258	273	4
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	198	211	216	234	3
Outros crustáceos	700	606	654	767	10
Total dos crustáceos	5 586	6 277	7 047	7 862	100

A produção industrial de crustáceos e outras espécies aquáticas implica a utilização alargada de dietas comerciais nutricionalmente adequadas para os animais. Nesse sentido, a quantidade ideal de aminoácidos essenciais, vitaminas, ácidos gordos, minerais e elevada palatabilidade fazem da farinha de peixe um ingrediente de eleição para a formulação e fabrico de dietas para camarões marinhos (Pakravan *et al.*, 2017). O seu uso, bem como de óleos de peixe em alimentos aquáticos, é mais prevalente em peixes e crustáceos de níveis tróficos mais elevados. No entanto, animais de níveis tróficos mais baixos também utilizam estes ingredientes na sua dieta mas em percentagens de inclusão mais baixas (2-4% da dieta; Figura 2). Em 2015, os maiores consumidores de farinhas e óleos de peixe foram os camarões marinhos, seguidos pelos peixes marinhos, salmão e crustáceos de água doce (FAO, 2018).

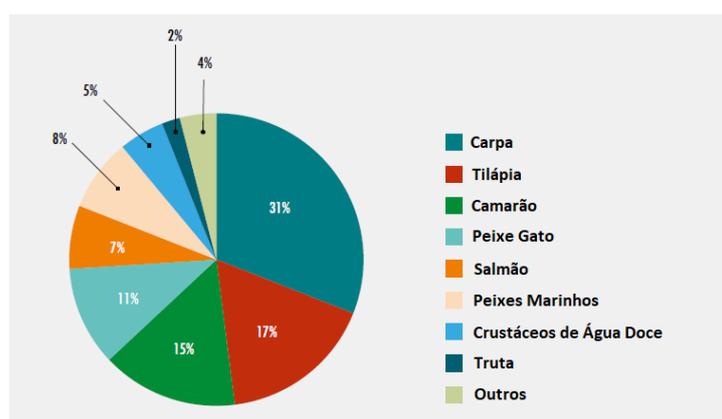


Figura 2. Percentagem de consumo de alimento comercial. Adaptado de FAO (2018).

A procura por produtos provenientes de aquacultura em países em vias de desenvolvimento continua a crescer, na medida que as preferências do consumidor evoluem em função do

aumento dos seus rendimentos. Em conformidade com esta tendência, os preços médios de comercialização do camarão têm vindo a aumentar nos dois últimos anos (FAO, 2018).

1.1. Produção de crustáceos em Portugal

Em Portugal, a produção em aquacultura aumentou 17,8%, embora a produção em águas salobras e marinhas continue a ser a mais importante, com 94% da produção total em 2016. A produção de moluscos e crustáceos representou 56,4% da produção total em 2016, tendo sido registado um aumento de 32,9% em relação ao ano de 2015 (INE, 2018).

No que diz respeito às importações e exportações (Figura 3), o grupo que evidenciou maior variação positiva foi o dos “moluscos e invertebrados aquáticos vivos, frescos, refrigerados, congelados, etc.” com um aumento de 26,1% (INE, 2018).

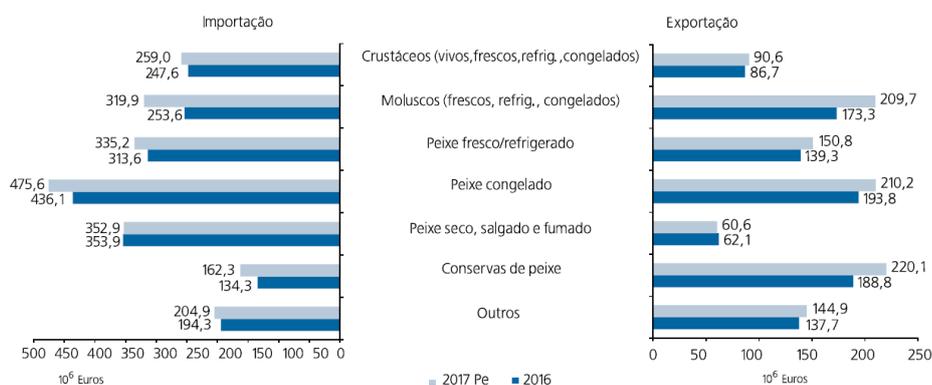


Figura 3 – Comércio internacional de produtos de pesca e relacionados, 2016-2017. Adaptado de INE, 2018.

Em 2017, o preço médio dos crustáceos também subiu para os 16,85€/kg (+1,8%), destacando-se os camarões com o preço mais elevado, seguidos das gambas e lagostins (Figura 4).

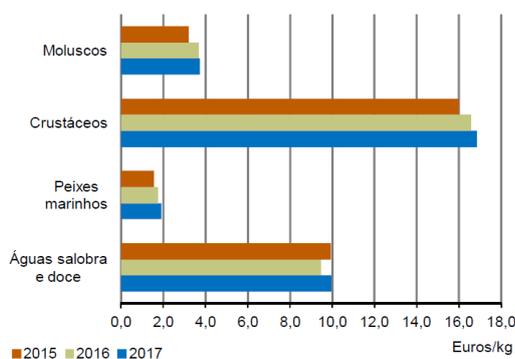


Figura 4. Preços médios anuais do pescado descarregado fresco ou refrigerado, por espécie. Fonte: INE & DGRM, 2018.

2. Comércio internacional de camarões ornamentais

A aquacultura de espécies marinhas ornamentais é a alternativa utilizada à recolha de animais selvagens dos recifes de coral para satisfazer o comércio de espécies para aquários marinhos (Kumar *et al.*, 2015). A sua viabilidade económica e sustentabilidade dependem da capacidade de reproduzir as espécies pretendidas em cativeiro.

Estima-se que são comercializadas mais de 2500 espécies marinhas ornamentais. Destas, cerca de 500 são de invertebrados (crustáceos e equinodermes; Calado *et al.*, 2017). Todos os anos são comercializados, aproximadamente, 10 milhões de indivíduos, desde moluscos (gastropodes, bivalves e cefalópodes), equinodermos (estrelas-do-mar, ouriços-do-mar e pepinos-do-mar), actinários (anémonas), crustáceos (camarões, caranguejos e lagostas), poliquetas sabelídeos (vermes filtradores) e poríferos (esponjas).

As vinte espécies de invertebrados mais importadas para os Estados Unidos da América (EUA) representam 75% do total do volume de importações (Calado *et al.*, 2017), sendo que os camarões ornamentais ocupam posições de destaque (Figura 5).

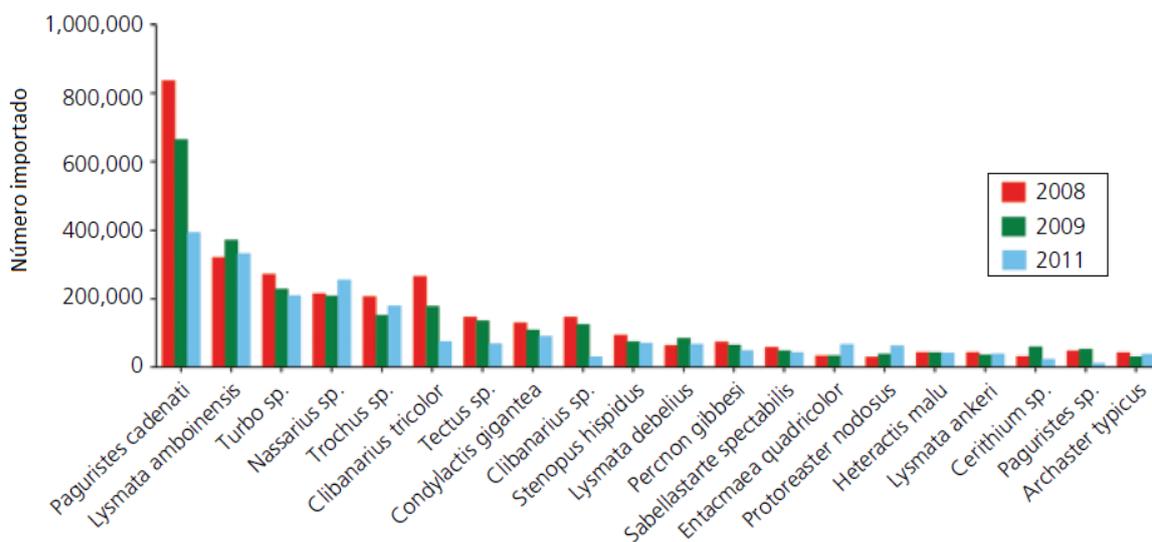


Figura 5. Principais espécies importadas para os EUA entre 2008 e 2011. Adaptado de Calado *et al.*, 2017.

Um camarão ornamental distingue-se por ter uma coloração exuberante, uma morfologia delicada e/ou bizarra, possuir características reprodutivas atípicas, exibir um comportamento de simbiose (como limpar os peixes), controlar organismos inconvenientes e ser seguro para os aquários de corais (Kumar *et al.*, 2015; Calado, 2008).

O sucesso da produção em cativeiro destas espécies depende de características como a duração da fase larvar, o tamanho mínimo de comercialização e as necessidades nutricionais.

A duração do ciclo de crescimento e o processo de desova também são aspetos importantes. Para isso, são ainda necessários vários estudos que permitam conhecer melhor as espécies e o seu funcionamento em termos fisiológicos, nutricionais e reprodutivos (Calado *et al.*, 2017).

Os principais importadores de camarões ornamentais devem trabalhar em conjunto com os principais exportadores de forma a adotarem procedimentos sustentáveis e desenvolverem a tecnologia necessária para a produção das principais espécies comercializadas.

2.1. Principais espécies

Dois grupos de camarões, *Lysmata* spp. e *Stenopus* spp., e um grupo de anémonas *Heteractis* spp. representam, aproximadamente, 15% de todos os invertebrados comercializados no mundo (Wabnitz *et al.*, 2003).

Segundo a base de dados “*The Global Marine Aquarium*”, são oito as espécies do género *Lysmata* e quatro do género *Stenopus* a ser comercializadas: *L. debelius* (camarão de fogo/sangue/escarlata), *L. grabhami* (camarão de riscas brancas do Atlântico), *L. amboinensis* (camarão limpador do Pacífico), *L. wurdemanni* (camarão bailarino), *L. intermedia*, *L. multicissa*, *L. rathbunae* (falso camarão bailarino), *L. californica* (camarão vermelho da rocha), *S. cyanoscelis* (camarão de riscas douradas), *S. hispidus* (camarão palhaço), *S. tenuirostris* (camarão de riscas azuis dos corais) e *S. zanzibaricus* (camarão de riscas douradas dos corais) (Wabnitz *et al.*, 2003).

Estes camarões destacam-se por se alimentarem de parasitas e tecidos pouco saudáveis dos peixes (podendo prevenir algumas patologias), daí o seu nome comum de camarões limpadores.

3. Espécie *Lysmata amboinensis*

De entre os camarões ornamentais, a espécie *Lysmata amboinensis* é a mais importada para os EUA (Figura 6).

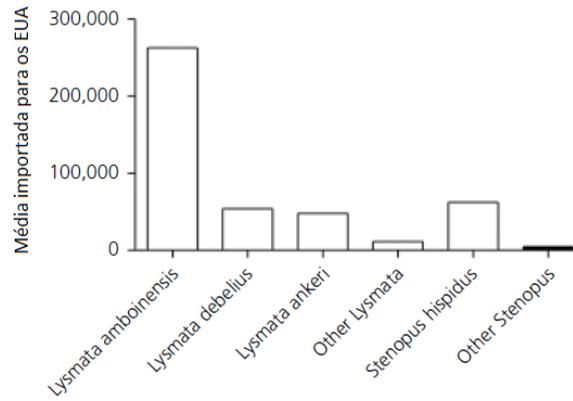


Figura 6. Principais espécies de camarões *Lysmata* e *Stenopus* importadas para os EUA (2008-2011).

Adaptado de Calado *et al.*, 2017.

3.1. Taxonomia

Com o nome comum de camarão limpador do Pacífico, o *L. amboinensis* pertence ao reino *Animalia*, filo *Arthropoda*, subfilo *Crustacea*, classe *Malacostraca*, ordem *Decapoda*, infraordem *Caridea*, família *Hippolytidae*, género *Lysmata* e espécie *Lysmata amboinensis* (de Man, 1888).

3.2. Morfologia

Na sua fase adulta pode chegar aos 6 cm de comprimento. Apresenta grandes antenas brancas e um terceiro par de maxilípedes. O seu corpo e patas são de cor amarelo vivo, com uma risca branca longitudinal que vai desde a cabeça à cauda, na superfície dorsal, delimitada dos dois lados por uma risca vermelha longitudinal. Esta risca branca termina de forma descontínua no télson, formando um triângulo invertido na sua parte posterior. Cada segmento do urópode tem uma mancha branca nas margens exteriores (Calado *et al.*, 2017; Calado, 2008).



Fotografia 1. Exemplos de *Lysmata amboinensis*.

No que diz respeito à fase larvar, algo característico desta espécie é o facto de a larva não eclodir como um náuplio, mas sim como uma *zoea* (fase larvar mais avançada, capaz de nadar através de apêndices torácicos). As larvas apresentam uma carapaça achatada lateralmente, um télson igualmente achatado e não são pigmentadas (Figura 7; Calado, 2008).

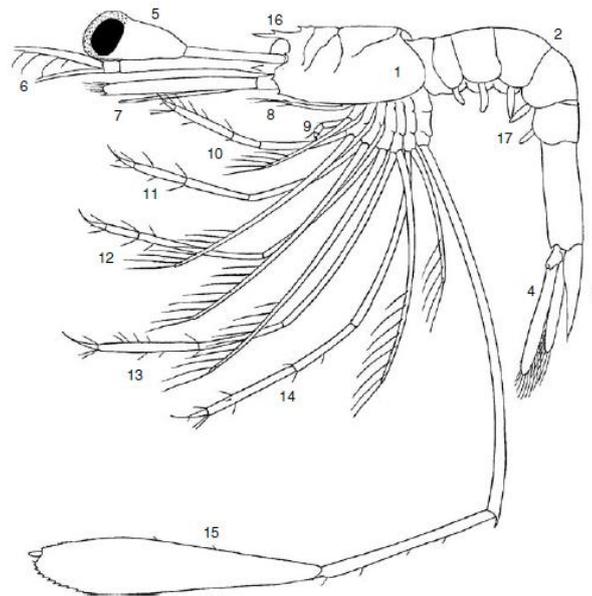


Figura 7. Morfologia de larva de *Lysmata*. Legenda: 1- carapaça, 2- segmentos abdominais, 3- télson, 4- urópodes (internos e externos), 5- olho (fundido na carapaça), 6- anténulas, 7- antenas, 8- primeiro maxilípede, 9- segundo maxilípede (exópode mostra sedas natatórias longas), 10- terceiro maxilípede (exópode mostra sedas natatórias longas), 11- primeiro pereiópode (exópode mostra sedas natatórias longas), 12- segundo pereiópode (exópode mostra sedas natatórias longas), 13- terceiro pereiópode (exópode mostra sedas natatórias longas), 14- quarto pereiópode (exópode mostra sedas natatórias longas), 15- quinto pereiópode (com apêndice alongado característico com um final da pata semelhante a um remo), 16- rostro (pode já apresentar espinhos), 17- pleópodes (na fase larvar estas estruturas não apresentam funções natatórias). Fonte: Calado, 2008.

As larvas do camarão *L. amboinensis* passam por, pelo menos, nove fases larvares (Calado, 2008), podendo chegar à fase *zoea* 14, como descrito na Tabela 3.

Mantidas em condições ótimas e estáveis, as larvas podem ter uma duração de fases *zoea* reduzida, até dois dias por fase. Assim, apresentando pelo menos nove fases larvares, podem esperar-se, pelo menos, 18 dias até completar a fase *zoea* (Calado, 2008).

Tabela 3 – Características morfológicas das diferentes fases larvares. Adaptado de Tziouveli (2011).

Fase	Características morfológicas distintivas
<i>Zoea 1</i>	Olhos sésseis, três pares de maxilípedes
<i>Zoea 2</i>	Olhos pedunculados, 1º pereiópode com botão birrâmio
<i>Zoea 3</i>	1º pereiópode funcional, 5º pereiópode com botão unirrâmio, urópodes desenvolvidos
<i>Zoea 4</i>	5º pereiópode funcional, 2º pereiópode com botão birrâmio, endópode do urópode mais pequeno que o télson
<i>Zoea 5</i>	2º pereiópode funcional, 3º pereiópode com botão birrâmio, endópode do mesmo tamanho que o télson
<i>Zoea 6</i>	3º pereiópode funcional, 4º pereiópode com botão birrâmio, um espinho dorsal no rostro
<i>Zoea 7</i>	Todos os pereiópodes funcionais, flagelo da antena triangular
<i>Zoea 8</i>	Flagelo da antena alongado, mais esguio
<i>Zoea 9</i>	Flagelo da antena segmentado em dois
<i>Zoea 10</i>	Flagelo da antena segmentado em 7, tão longo como o escafocerito, pleópodes desenvolvidos, pequeno espinho no rostro
<i>Zoea 11</i>	Flagelo da antena mais comprido que o escafocerito, pleópodes com botão birrâmio (exópodes rudimentares)
<i>Zoea 12</i>	Endópodes e pleópodes com menos de 10 sedas, exópodes com 1 ou 2 sedas (exceto o primeiro exópode pleópode que não tem sedas)
<i>Zoea 13</i>	Endópodes com mais de 10 sedas, exópodes com menos de 10 sedas (1º exópode pleópode só com uma seda)
<i>Zoea 14</i>	Endópodes e exópodes com mais de 20 sedas (1º pleópode não sofre mudança), télson triangular, rostro com mais de 5 espinhos dorsais

No caso de as larvas não serem mantidas nas condições ideais, podem atrasar o seu desenvolvimento, utilizando a sua energia apenas para manutenção das funções vitais e só depois para o seu crescimento e evolução enquanto larva. Neste caso, as larvas podem demorar cerca de 98 dias (Rhyne & Lin, 2004), ou mesmo 140 dias de desenvolvimento para finalizar a fase de *zoea* (Fletcher *et al.*, 1995).

Fatores como a qualidade e quantidade de alimento, canibalismo e densidade de animais são determinantes para a sobrevivência das larvas (Cunha *et al.*, 2008).

Raramente são referidos na bibliografia os dados relativos ao peso e comprimentos médios das larvas à eclosão, uma vez que o seu desenvolvimento é quantificado em outros moldes (duração das fases, taxa de sobrevivência, entre outros). Todavia, segundo Cunha *et al.* (2008), às 24 horas de vida, as larvas apresentavam um peso seco médio individual de $37 \pm 5 \mu\text{g}$ e um comprimento médio individual (da ponta do rostro à ponta do télson) de $2,6 \pm 0,1$ mm.

3.3. Ecologia

Natural do oceano Indo-Pacífico, Mar Vermelho e Havai, este camarão possui uma coloração estável, independentemente da região geográfica, sofrendo apenas pequenas alterações consoante a idade, o sexo e o fotoperíodo, devido ao tipo e número de cromatóforos (Calado, 2008). A espécie ocorre, normalmente, aos pares (Calado *et al.*, 2010) e procura proteção em rochas, depressões e corais dado que as suas antenas brancas atraem os outros animais.

O *L. amboinensis* é conhecido como “camarão limpador” devido à simbiose que estabelece com outros seres marinhos (normalmente peixes), limpando-os. Esta associação pode ser acidental ou programada quando ambas as espécies demonstram comportamentos para que tal aconteça. Acredita-se que os camarões removem ectoparasitas, bactérias, tecido morto e outras partículas da boca e tecidos dos seus “clientes” (Calado, 2008).

3.4. Reprodução

O género *Lysmata* compreende crustáceos decápodes que apresentam um sistema sexual único: hermafroditismo protândrico simultâneo. Numa primeira fase os camarões reproduzem-se como machos, passando numa segunda fase a hermafroditas simultâneos, mas sem nunca serem capazes de se autofertilizar; são sempre necessários dois indivíduos para se reproduzirem (Calado *et al.*, 2017; Calado, 2008; Figura 8).

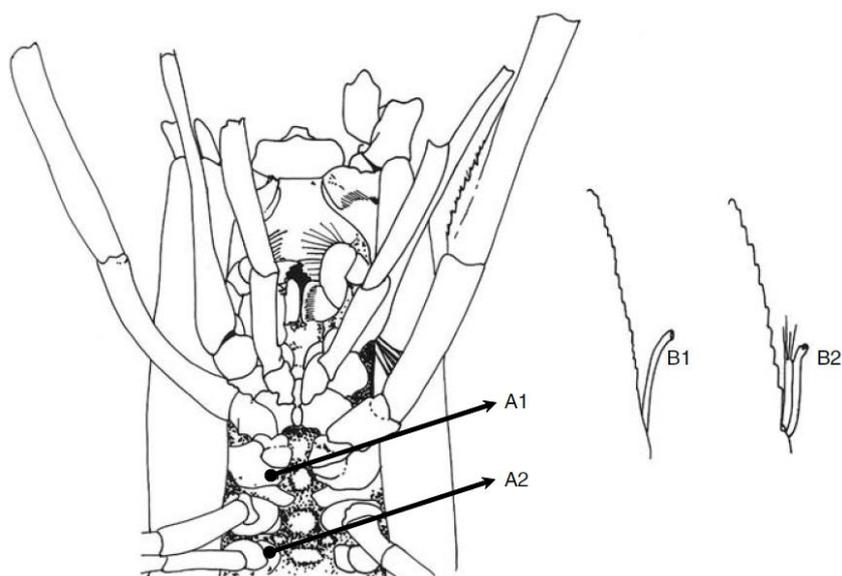


Figura 8. Características reprodutivas dos camarões da infraordem *Caridea*. A1- gonóporo feminino (abertura genital) localizado na coxa do terceiro par de pereiópodes; A2- gonóporo masculino (abertura genital) localizado na coxa do quinto par de pereiópodes; B1- detalhe do endópode do segundo par de pleópodes de um camarão fêmea exibindo um apêndice interno; B2- detalhe do endópode do segundo par de pleópodes de um camarão macho exibindo um apêndice interno e um apêndice masculino. Os desenhos não estão à escala. Fonte: Calado, 2008.

A maturação dos ovários ocorre naturalmente desde que as condições da água sejam estáveis e que a alimentação seja nutricionalmente adequada e realizada diversas vezes por dia. Nestas condições, os embriões são produzidos a cada duas a três semanas (Calado *et al.*, 2007).

Os *L. amboinensis* são, normalmente, reprodutores contínuos com a cópula a ter lugar depois de uma muda e os camarões a carregarem os embriões em desenvolvimento no abdômen durante cerca de 12 dias (Tziouveli *et al.*, 2011) enquanto os seus ovários continuam a maturar (Calado *et al.*, 2017; Calado, 2008).

Após as larvas eclodirem, o camarão realiza uma muda nas próximas 24-48 horas (Fletcher *et al.*, 1995) depois da qual está recetivo para acasalar e para iniciar um novo ciclo de incubação. Tziouveli & Smith (2009) constataram que a fecundidade aumenta com o tamanho corporal do camarão.

Os dois indivíduos de um par podem ter ovos fertilizados ao mesmo tempo com quatro a cinco dias de diferença de desenvolvimento embrionário (Fletcher *et al.*, 1995). Existe,

ainda, a possibilidade de o camarão carregar oócitos não fecundados (Calado *et al.*, 2017; Tziouveli *et al.*, 2011; Calado, 2008).

Segundo Fletcher *et al.* (1995), podem ser libertadas entre 300-400 larvas por desova. Cunha *et al.* (2008) verificaram que os camarões adultos possuem um ciclo reprodutivo regular e constante com uma média de 575 larvas por desova e por animal, aproximadamente, a cada 14 dias.

3.5. Nutrição e alimentação

Tal como noutras áreas da produção animal, também em aquacultura a nutrição desempenha um papel fundamental no crescimento, na saúde, na qualidade do produto e na produção de resíduos, representando cerca de 50% dos custos variáveis totais da empresa (NRC, 2011). A formulação e o desenvolvimento de dietas equilibradas que satisfaçam as necessidades nutricionais dependem do conhecimento profundo da espécie a produzir.

O trato digestivo do camarão está normalmente dividido em intestino anterior, médio e posterior (Figura 9). O anterior pode ser dividido em esófago, estômago cardíaco e estômago pilórico, tratando-se de uma câmara onde as partículas de alimento são moídas e filtradas. O estômago apresenta alguma complexidade, possuindo uma estrutura calcificada conhecida por moinho gástrico. O hepatopâncreas (glândula do intestino médio) é o maior órgão digestivo do camarão. A parte posterior do intestino é constituída pelo reto e ânus.

O estômago do camarão está coberto por uma camada de quitina e não secreta ácidos nem enzimas, embora por vezes possa mostrar atividade enzimática proveniente do hepatopâncreas ou de enzimas endógenas de animais dos quais se alimentou (NRC, 2011).

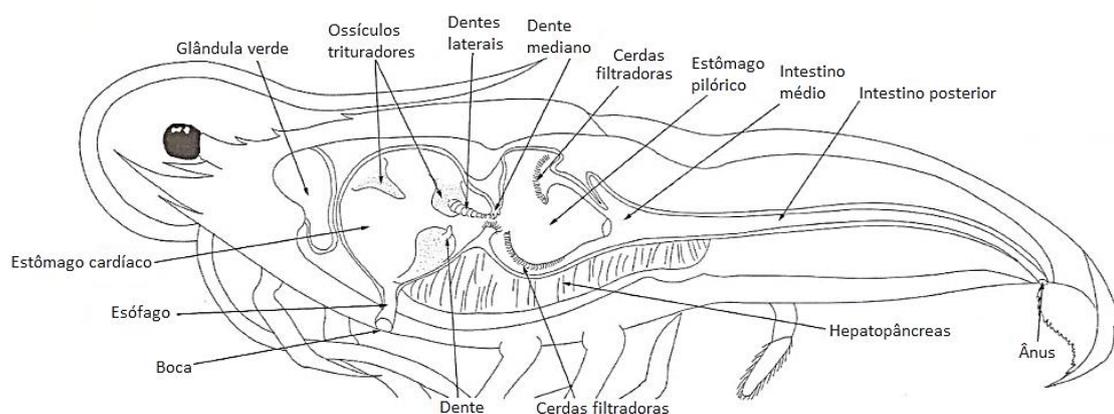


Figura 9. Anatomia do trato digestivo do camarão. Adaptado de NRC (2011).

As larvas de camarão começam com um intestino simplificado que se vai tornando mais complexo ao longo das suas fases. Até ao momento, nunca foi descrito nenhum caso de lecitotrofia em camarões marinhos ornamentais. A lecitotrofia corresponde à presença de reservas nutritivas no saco vitelino das larvas que permitem o seu desenvolvimento inicial sem ser necessária uma fonte exógena de alimento. No entanto, pode haver uma lecitotrofia secundária, na segunda fase *zoea* das larvas recém eclodidas que foram alimentadas, o que lhes permite passar para a terceira fase na ausência de alimento devido à acumulação de reservas na primeira fase da metamorfose (Calado *et al.*, 2007b). As larvas não podem passar por períodos de jejum depois de eclodirem devido a uma possível chegada a um “ponto de não retorno” em que os animais deixam de se desenvolver mesmo sendo alimentados. Adicionalmente, é descrito um “ponto de saturação de reserva” em que a larva não precisa de mais alimento para passar para a fase seguinte. As fases referidas são de extrema importância para o sucesso dos cultivos larvares, sendo essencial o conhecimento profundo destes dois pontos críticos (Calado, 2008).

A dieta fornecida aos adultos reprodutores é muito importante, pois influencia a qualidade dos gametas, dos embriões e das larvas (Tziouveli *et al.*, 2011; Calado, 2008). Esta pode consistir numa variedade de alimentos frescos e/ou congelados como náuplios ou adultos de *Artemia salina* (simples ou enriquecida), amêijoas, mexilhão, krill, camarão, lula, poliquetas e alimentos compostos comerciais. As formulações comerciais incluem normalmente entre 25 a 50% de farinha de peixe, que, como referido anteriormente, é um ingrediente caro e pouco sustentável (Pakravan *et al.*, 2017).

A inclusão de tecidos de crustáceos sexualmente maduros na dieta pode ser uma fonte valiosa de hormonas reprodutivas, contribuindo para um bom funcionamento endócrino no que diz respeito à maturação das gónadas. No entanto, coloca-se o risco de transmissão de doenças (Calado, 2008). Também os alimentos congelados não são considerados uma boa opção por degradarem rapidamente a qualidade da água.

Os pellets constituem a apresentação mais comum de alimento na dieta de camarões. Todavia, ainda não existem dietas formuladas específicas para estes animais (Calado *et al.*, 2017) que permitam uma disponibilidade regular, composição e qualidade reproduzíveis e controláveis, fácil dosagem, melhor estabilidade no armazenamento, redução da degradação da qualidade da água (bem como o risco de introdução de patogénicos) e uma maior

versatilidade na suplementação de produtos terapêuticos, imuno-estimulantes e hormonas (Calado, 2008).

De forma a repor as reservas energéticas gastas na maturação das gónadas, além dos vários ingredientes fornecedores de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, é essencial assegurar o fornecimento de compostos que não podem ser sintetizados “de novo”, como é o caso de algumas vitaminas e, essencialmente, pigmentos carotenóides.

Aparentemente, os camarões não têm uma necessidade absoluta de lípidos na dieta; apenas demonstram necessidade específica de alguns nutrientes como ácidos gordos altamente insaturados (HUFA), fosfolípidos e esteróis. Estes camarões não têm facilidade em alongar e desnaturar ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de forma a produzir HUFA (Calado, 2008; Cunha *et al.*, 2008). Os ácidos gordos essenciais para a dieta dos camarões são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA), o linoleico e o linolénico. O ácido araquidónico também é importante em camarões marinhos dado ser um precursor na síntese de prostaglandinas. Os triacilgliceróis, fosfolípidos e colesterol são considerados classes essenciais de lípidos para a produção de produtos sexuais, encontrando-se em grande quantidade nos ovários maduros.

O teor em lípidos totais a ser incluído na dieta pode atingir valores superiores aos 14% (Calado, 2008). Todavia, níveis demasiado elevados de lípidos podem afetar negativamente a ingestão de alimento, podendo causar deficiências nutricionais.

Na alimentação das larvas é normal a utilização de *Artemia* e rotíferos que, embora convenientes, são relativamente pobres em PUFA de cadeia longa. Por isso, estes devem ser enriquecidos, embora seja difícil alcançar níveis adequados de PUFA de cadeia longa e, especialmente, DHA (Conceição *et al.*, 2010).

As proteínas fornecem aminoácidos essenciais e não essenciais para o músculo, tecido conjuntivo e hemolinfa respiratória. Na nutrição de crustáceos são identificados os mesmos dez aminoácidos essenciais referidos para outras espécies aquáticas: trionina, metionina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina e triptofano (NRC, 2011). As necessidades de proteína assumem especial importância durante a maturação dos camarões devido à intensa biossíntese que ocorre. As dietas formuladas apresentam, geralmente, teores na ordem dos 50% de proteína, embora esta quantidade seja inferior à apresentada pela maioria das dietas frescas ou congeladas mais utilizadas (Calado, 2008).

Os hidratos de carbono são, normalmente, armazenados como glicogénio no músculo e hepatopâncreas, sendo importantes para a produção de pigmentos dos ovários (carotenoglicolipoproteínas) e produção de glucosamina (precursor da quitina – principal constituinte do exoesqueleto dos decápodes). Os hidratos de carbono não são considerados nutrientes essenciais para adultos reprodutores, embora os crustáceos tenham uma elevada capacidade de os catabolizar quando comparados com outros invertebrados marinhos. O seu metabolismo aparenta ser específico de algumas espécies de decápodes, com a absorção rápida de monossacáridos, que, por sua vez, são pouco utilizados. Todavia, o seu uso nas dietas é moderado, dado que níveis elevados de inclusão estão associados a quebras nas taxas de crescimento, menores taxas de eficiência de conversão da proteína e aumento de mortalidade (Calado, 2008).

A adição de amido ao alimento pode ajudar a cumprir objetivos ambientais e económicos, sendo um ingrediente mais barato quando comparado com as fontes de proteína e de lípidos. Os níveis de amido não devem, no entanto, ultrapassar os 20-40% de inclusão na dieta. Os níveis de fibra devem ser mantidos o mais baixo possível, não devendo ultrapassar os 10% de incorporação (NRC, 2011).

As vitaminas desempenham um papel importante em larvas e juvenis, sendo normalmente fornecidas nas dietas sob a forma de um *premix*. A vitamina A, por exemplo, quando fornecida em níveis elevados (60mg/kg) tem efeitos positivos na fecundidade e na qualidade das larvas. Já a vitamina C (ácido ascórbico) é considerada essencial em reprodutores, visto que os crustáceos não possuem a enzima oxidase gulonolactona necessária para a sua síntese (Calado, 2008).

A deficiência em vitamina C pode levar a problemas como a síndrome de morte negra, letargia, alterações no funcionamento dos órgãos e despigmentação. Uma solução pode ser o enriquecimento de *Artemia* com esta vitamina (NRC, 2011).

No que diz respeito ao nível ideal de minerais a ser fornecido na dieta, é difícil quantificar as necessidades dos camarões uma vez que os podem absorver diretamente da água. Sabe-se, no entanto, que deficiências em macroelementos podem afetar a reprodução ao induzir stress fisiológico e alterar a composição mineral dos oócitos (Calado, 2008).

Estes nutrientes também são fornecidos na forma de *premix*. Os macrominerais mais importantes são o cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e cloro. Relativamente aos microminerais destacam-se o ferro, cobre, zinco, manganésio, selénio e cobalto.

Devem ser evitados níveis de cálcio (Ca) superiores a 2,5% de forma a não afetar a disponibilidade de fósforo (P). Embora não exista nenhuma razão de Ca:P estipulada, a razão 2:1 aparenta bons resultados em dietas comerciais (NRC, 2011).

Dos ingredientes utilizados nas dietas, a farinha de peixe é a fonte mais rica em minerais endógenos, embora a sua utilização esteja a ser reduzida e a dar lugar a fontes vegetais devido a questões ambientais.

Como referido anteriormente, a coloração das espécies ornamentais é de especial importância. Os carotenóides têm um papel importante na pigmentação como fonte de provitamina A. Adicionalmente, possuem funções antioxidantes, protegem as células de danos fotodinâmicos, melhoram o crescimento e o potencial reprodutivo, estimulam o sistema imunitário, a maturação das gónadas e o desenvolvimento embrionário. Os pigmentos carotenóides também são utilizados nas dietas para prevenir a peroxidação dos PUFA (Calado, 2008).

A astaxantina e os esteróis são os principais carotenóides presentes nos ovários e hepatopâncreas dos camarões, bem como a zeaxantina e o β -caroteno (Calado, 2008). Em dietas para larvas podem incluir-se na formulação 230 mg de cantaxantina por 100 g de dieta, resultando numa pigmentação equivalente à obtida por administração de náuplios de *Artemia* (NRC, 2011).

De forma a corrigir possíveis deficiências em carotenóides nas dietas de reprodutores pode ser fornecido um suplemento de *Spirulina* aos animais.

3.6. Manutenção de reprodutores

Geralmente, os camarões ornamentais são mantidos em aquários aos pares e a sua produção é realizada recorrendo a metodologias semelhantes às utilizadas nas carciniculturas comerciais (Leal *et al.*, 2016).

Em relação ao tipo de água, pode ser utilizada água do mar natural ou água salgada, reconstituída a partir da mistura de sal marinho e água de osmose. Devem ser utilizados, preferencialmente, sistemas de recirculação de água para uma maior economia e eficiência.

Em sistemas fechados, e para garantir uma qualidade de água consentânea com as necessidades das espécies, devem ser realizadas mudanças parciais de água com alguma regularidade (Calado *et al.*, 2007a). As trocas de água nos sistemas devem ser realizadas com moderação (pequenos volumes de cada vez) para não alterar, de modo significativo, parâmetros como a temperatura, a salinidade e o pH.

Os sistemas devem possuir filtros mecânicos e biológicos, bem como escumadores de proteína. Para esterilizar a água é comumente utilizada a radiação ultravioleta (UV-C), e são ainda utilizadas lâmpadas para simular o fotoperíodo pretendido.

Os aquários de reprodutores devem ser feitos, preferencialmente, de materiais transparentes como o vidro, o plástico ou o acrílico de forma a permitir uma melhor monitorização dos animais (Calado, 2008).

É muito importante que os camarões não se reproduzam quando a qualidade da água não é a ideal de forma a evitar situações como: redução do número de embriões produzidos; nova muda ainda com embriões no abdómen que ficam retidas no exoesqueleto largado; não hidratação das larvas após a eclosão, permanecendo encaracoladas e morrendo poucas horas depois (Calado, 2008).

A nível de enriquecimento ambiental é importante fornecer espaço aos animais para demonstrarem os seus comportamentos naturais, sítios para se esconderem, fontes de sombra e locais onde possam estar agarrados de cabeça para baixo (Calado, 2008). As “rochas vivas” são uma escolha frequente; para além de servirem para este propósito também melhoram a filtração biológica do aquário, embora possam acumular detritos e introduzir espécies não desejáveis. Para além de rochas vivas, podem ser utilizados materiais como tubos de cloreto de polivinilo (PVC), redes plásticas de fruta e relva artificial, entre outros.

O controlo da temperatura é fundamental para garantir a correta maturação das gónadas e a incubação dos embriões. Caso a água possua uma temperatura mais elevada o tempo de embriogénese é encurtado (Calado, 2008). Para desencadear a maturação dos ovários é necessário assegurar uma boa qualidade da água, temperaturas estáveis entre os 26-28°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e uma dieta nutricionalmente adequada (Calado *et al.*, 2017; Calado *et al.*, 2007). A salinidade da água deve encontrar-se a 35±1 (por mil) e o pH a 8,1±0,1 (Tziouveli *et al.*, 2011; Calado *et al.*, 2010; Tziouveli & Smith, 2009; Cunha *et al.*, 2008; Calado *et al.*, 2008a; Calado *et al.*, 2007a; Calado *et al.*, 2007b).

Em certas situações a maturação dos ovários pode acontecer sem que estas condições relativas à qualidade da água sejam respeitadas. No entanto, nestas circunstâncias, podem ocorrer problemas relacionados com a redução do número de embriões produzidos, mudas com embriões no abdómen e maior mortalidade larvar com atrasos evidentes no seu desenvolvimento (Calado *et al.*, 2017).

A alimentação dos reprodutores deve ser *ad libitum* com uma frequência de uma a três vezes por dia (Tziouveli *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2008; Calado *et al.*, 2008a; Calado *et al.*, 2007). Segundo Tziouveli *et al.* (2011), os reprodutores alimentados com *Artemia* em *pellet* ou congelada produzem descendência com melhor qualidade e maior tamanho.

Após a eclosão das larvas, a separação destas do camarão que desova e de outros camarões deve ser realizada rapidamente de forma a evitar canibalismo. Para esse finalidade, podem ser utilizadas redes, que, com o auxílio de uma corrente de água unidirecional e uma fonte de luz (preferencialmente actínica) do lado oposto, permitem que as larvas nadem para o lado oposto em direção à luz ficando separadas dos adultos (Calado *et al.*, 2017; Calado 2008; Calado *et al.*, 2007a; Figura 10).

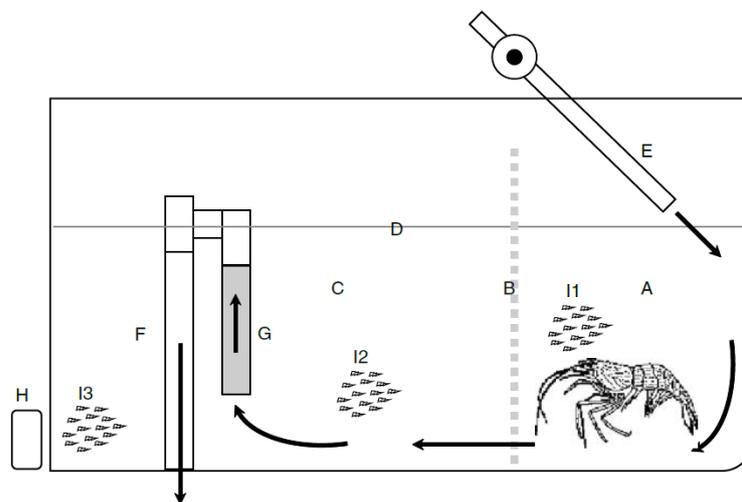


Figura 10. Aquário de maturação com sistema de separação de larvas. A- área dos reprodutores; B- divisão de rede grande, rígida e móvel para impedir contacto de adultos com larvas; C- área das larvas; D- nível da água; E- afluência de água; F- tubo de escoamento de água; G- rede de 500 µm para prevenir que as larvas sejam escoadas; H- fonte de luz; I- larvas de camarão; I1- a desovar; I2- a ser transportadas para a área de larvas; I3- concentradas perto da fonte de luz; as setas representam a corrente de água predominante. Fonte: Calado, 2008.

A presença de presas vivas no aquário (como náuplios de *Artemia* ou metanáuplios enriquecidos) pode ser uma solução viável para as larvas se alimentarem logo após a eclosão e não passarem por períodos de jejum. Nesse caso, a rede no tubo de escoamento deve ser de 150µm para permitir, exclusivamente, a passagem das presas e não das larvas.

4. Instalações para cultivos larvares

Os sistemas de recirculação de água são uma escolha comum para larvas, embora os sistemas de água parada sejam mais utilizados no caso de existir um número reduzido de larvas (até 100) e pequenos volumes de água (até 20L; Calado *et al.*, 2017; Calado, 2008).

O primeiro sistema de aquário com sucesso para cultura industrial de larvas de crustáceos decápodes foi o *planktonkreisel*, descrito pela primeira vez em 1968 por Greve. A sua forma arredondada combinada com a sua coluna central permitem a filtração da água bem como a sua rotação contínua no meio. De forma a simplificar, podem ser colocadas redes que permitem que o alimento vivo seja despejado do aquário sem que as larvas o sejam. No entanto, pela dificuldade de limpeza do aquário, este sistema pode não ser o mais adequado para períodos de desenvolvimento larvares muito longos, como é o caso do género *Lysmata* (Calado, 2008).

Inspirados por Greve, Calado *et al.* (2003) criaram o primeiro sistema de recirculação de água de cultura de larvas de crustáceos decápodes com um aquário cilíndrico-cônico (Figura 13). Este sistema também permite a utilização de redes, como referido acima. Todavia, pode não ser o mais adequado para as fases larvares mais avançadas, pois estas, com o seu peso, vão para a parte mais profunda e afunilada do tanque, ficando por vezes presas e danificando os seus apêndices (Calado, 2008). Aquários cilíndrico-esféricos aparentam ser a solução para este problema (Figura 11).

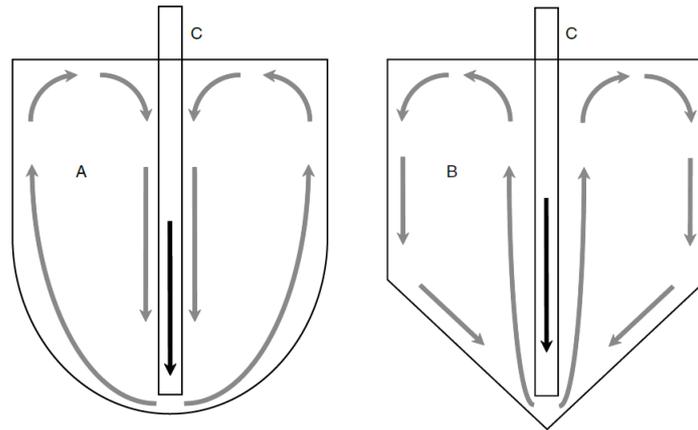


Figura 11. Aquários de criação de larvas. A- aquário cilíndrico-esférico, B- aquário cilíndrico-cônico, C- tubo de afluência de água. As setas pretas representam a afluência da água; as setas cinzas representam a corrente de água dominante no aquário. Fonte: Calado, 2008; Calado *et al.*, 2008b.

Como já foi referido, caso as condições do meio não sejam as ideais, as larvas podem atrasar o seu desenvolvimento por períodos de tempo variáveis (até várias semanas; Calado, 2008).

Para garantir a qualidade da água em sistema de recirculação, é conveniente realizar trocas parciais de água periódicas, com moderação (pequenos volumes) para não provocar alterações bruscas em parâmetros como a temperatura, a salinidade ou o pH.

Durante o período de pré-muda o cálcio é reabsorvido pela cutícula mais antiga (que vai ser descartada) para formar a nova, embora também exista cálcio armazenado internamente. Assim, a monitorização do pH e da concentração de cálcio deve ser rigorosa, de forma a permitir que as larvas passem de uma fase para a outra corretamente.

Para o controlo microbiológico da água pode ser utilizada radiação ultravioleta (UV-C) ou ozonização, que permite a oxidação de resíduos orgânicos e melhora o desempenho das outras unidades de tratamento da água (Calado, 2008).

A temperatura da água deve ser mantida entre os 25-26°C, embora possa ir até aos 28-29°C para uma duração da fase larvar mais curta (Calado, 2008). Temperaturas abaixo dos 22°C fazem com que as larvas cessem o seu desenvolvimento (Fletcher *et al.*, 1995).

Nesta fase, o fotoperíodo não influencia as taxas de ingestão pelo que não é necessário expor as larvas a fotoperíodos extremos. Quanto à densidade, o mais comum é trabalhar com menos de 50 larvas por litro de água de forma a evitar problemas como canibalismo e permitir que exibam os seus comportamentos naturais (Calado, 2008). No entanto, Cunha *et*

al. (2008) aconselham uma densidade relativamente baixa, de 10 larvas por litro de água, em detrimento de densidades superiores (20 larvas por litro) dado apresentarem taxas de sobrevivência mais elevadas.

5. Dietas para larvas

As larvas de crustáceos decápodes são carnívoras, podendo em ambiente natural alimentar-se de presas alternativas como microrganismos diversos, fitoplâncton (principalmente microplâncton de 20-200 μm), protistas, matéria orgânica dissolvida e detritos fecais. Em regime natural, no seu habitat, as larvas têm à disposição uma grande variedade de itens alimentares de dimensões variáveis, nomeadamente picoplâncton (tamanho inferior a 2 μm), nanoplâncton (2-20 μm), microzooplâncton (20-200 μm), mesozooplâncton (200-2000 μm) e macrozooplâncton (superior a 2000 μm) permitindo seleccionar os itens alimentares mais adequados para cada fase larvar (Figura 12).

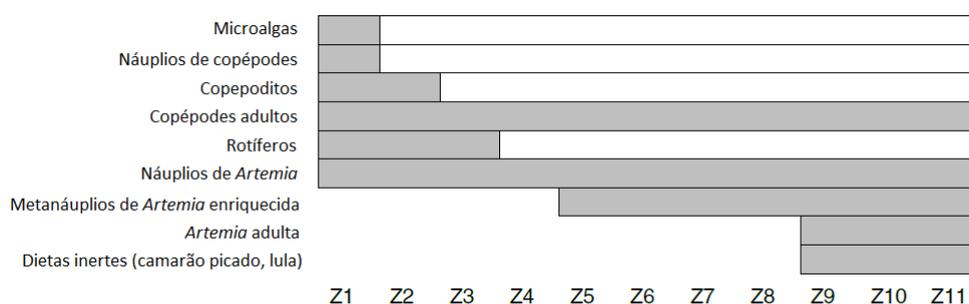


Figura 12. Esquema teórico de alimentação das larvas ao longo de 11 fases *zoea* (barras cinzentas); regime de alimentação potencial quando se utiliza um mesocosmo (barras brancas). Adaptado de Calado (2008).

As larvas de *L. amboinensis* são mais prejudicadas por períodos de jejum inicial do que as outras espécies que apresentam lecitotrofia facultativa. Esta situação de ausência de alimento pode ocorrer apenas pelo facto de os camarões normalmente desovarem durante a noite (Calado *et al.*, 2008a) ficando as larvas em jejum forçado até à manhã seguinte. Assim, torna-se essencial fornecer alimento adequado às larvas recém-eclodidas atempadamente para garantir a sua qualidade. Caso contrário, a sua sobrevivência e desenvolvimento ficam afetados bem como a duração das fases larvares (Calado *et al.*, 2017).

Existem vários tipos de alimentos vivos que são frequentemente utilizados na alimentação das larvas de camarões ornamentais. Destes, destacam-se vários tipos de microalgas,

rotíferos, náuplios de *Artemia* e copépodes. Qualquer um destes itens pode ser fornecido de modo isolado ou em associação.

As microalgas fazem parte do fitoplâncton e constituem a base da cadeia alimentar num ecossistema aquático (Kumar *et al.*, 2015). Aparentemente, uma dieta composta exclusivamente por microalgas parece ser insuficiente para uma correta nutrição de larvas de camarões ornamentais. Contudo, a sua suplementação é aconselhável devido à presença de vitaminas e outras substâncias promotoras de crescimento. Para além disso, têm um papel importante como probióticos e bactericidas seletivos e melhoram a pigmentação dos animais (Pakravan *et al.*, 2017). As microalgas ricas em HUFA podem ser utilizadas para melhorar o valor nutritivo do zooplâncton, principalmente em relação aos seus níveis de DHA (Calado, 2008). Pakravan *et al.* (2017) sugeriram a utilização de *Spirulina* como uma possível alternativa proteica à utilização de farinha de peixe na dieta destes camarões.

Os rotíferos, em especial o *Brachionus plicatilis*, fazem parte do zooplâncton e distinguem-se pelo seu tamanho, movimento e facilidade de produção (Kumar *et al.*, 2015). Trata-se de um alimento vivo importante na dieta de larvas recém-eclodidas que permite reduzir a sua mortalidade. O seu teor em ácidos gordos e DHA pode ser melhorado através do seu enriquecimento com o uso de microalgas selecionadas (Calado, 2008). À medida que as larvas vão crescendo vão preferindo presas maiores, como náuplios de *Artemia*, embora continuem a alimentar-se das mais pequenas caso estas estejam disponíveis.

Segundo Cunha *et al.* (2008), rotíferos enriquecidos proporcionam maior sobrevivência das larvas quando comparados com rotíferos não enriquecidos, sendo assim uma alternativa mais económica e eficiente à *Artemia* nos primeiros três dias de vida larvar.

A *Artemia* não faz parte do zooplâncton e, como tal, não é uma presa natural das larvas de decápodes, embora em cativeiro seja bastante utilizada com sucesso (Kumar *et al.*, 2015). Uma das razões para o seu uso é o facto dos seus cistos poderem ser armazenados e utilizados quando for conveniente (Nielsen *et al.*, 2017). É geralmente utilizada fresca mas pode ser fornecida congelada ou refrigerada de forma a diminuir a sua atividade e melhorar a ingestão de alimento pelas larvas (Calado, 2008). O seu valor nutricional pode ser corrigido através do enriquecimento com microalgas, tal como acontece com os rotíferos. Em fases mais avançadas, a *Artemia* pode ser complementada com outro tipo de alimentos (lula triturada, por exemplo; Calado *et al.*, 2007a).

Relativamente aos copépodes, estes são uma presa natural destas larvas e, como tal, são também fornecidos em cativeiro. Neste tipo de alimento vivo os HUFA são abundantes e altamente biodisponíveis para as larvas (Calado, 2008).

A eficácia do alimento inerte depende das suas propriedades: composição, tamanho, forma, humidade, flutuabilidade, estabilidade, palatabilidade e digestibilidade; bem como do comportamento predatório das larvas e as suas características fisiológicas. A maior parte das larvas é atraída por presas vivas e não pelos alimentos inertes, principalmente nas fases iniciais. A aceitação da dieta inerte é dependente da idade da larva e, em alguns casos, na capacidade desta conseguir transformar a partícula do alimento em partes mais pequenas – isso também pode ser influenciado pelos métodos utilizados no fabrico da dieta, principalmente na aglomeração e extrusão (Calado *et al.*, 2017).

A tecnologia de microencapsulação permite que uma partícula de alimento contenha a formulação ótima de nutrientes para o animal (podendo ser específica para cada espécie), possua o tamanho e flutuabilidade adequados para uma melhor eficiência e, acima de tudo, apresente um nível de lixiviação de nutrientes bastante reduzido. O alimento é mais estável e possui um maior período de armazenamento, com menores riscos de contaminação (Willer & Aldridge, 2017). Estas dietas são mais eficientes e melhoram a nutrição, o crescimento e a produção dos animais, ao mesmo tempo que reduzem a sua mortalidade e custos de produção.

A satisfação das necessidades nutricionais é induzida pelo tipo e quantidade de enzimas digestivas produzidas ao longo das fases larvares sendo que a tripsina e a amilase são as enzimas predominantes (NRC, 2011). Este pode ser um problema aquando da administração de dietas inertes dado que estas podem não ser formuladas de acordo com as enzimas presentes nas larvas.

A informação relacionada com a nutrição das larvas é reduzida, mas é assumido que as larvas necessitam dos mesmo dez aminoácidos essenciais que os adultos devido à incapacidade de os sintetizar. Além disso, de um modo geral, as larvas necessitam de níveis de proteína e de lípidos superiores aos dos indivíduos adultos devido às suas taxas metabólicas e de crescimento mais elevadas. Os níveis ótimos de proteína rondam os 50-60% enquanto os níveis de fosfolípidos se situam entre os 3,5-7% (NRC, 2011).

Ao testar dietas inertes em larvas também deve ser dada especial atenção ao tipo de fotoperíodo utilizado – intensidades luminosas elevadas fazem com que as larvas recém-eclodidas se concentrem mais próximo da superfície da água tendo, assim, acesso mais limitado a partículas de alimento que afundem rapidamente no aquário (Calado *et al.*, 2008a).

As larvas de camarão utilizam as patas para se alimentar; ao agarrar as partículas de alimento e, manipulando-as, conseguem reduzi-las a partículas mais pequenas possibilitando a ingestão. Deste modo, a forma e o tamanho do *pellet* não são assim tão preocupantes nesta espécie – quanto maior a larva, melhor a aceitação de partículas maiores (Calado, 2008). A presença de alimento vivo, como a *Artemia*, estimula as larvas a ingerirem partículas inertes da dieta, embora não o consigam fazer nas fases larvares iniciais (Calado, 2008).

Muitos estudos são ainda necessários, tanto a nível fisiológico como nutricional, para melhor compreender as necessidades nutricionais desta espécie e poder desenvolver dietas mais adequadas. Até serem desenvolvidas estas dietas que cumpram os requisitos nutricionais das larvas na íntegra, o cultivo larvar destas espécies de camarões marinhos ornamentais continua a depender do fornecimento de alimento vivo nas primeiras fases de vida.

III. Material e Métodos

Este estudo foi realizado no Biotério dos Organismos Aquáticos da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, desde janeiro até maio de 2019.

1. Animais e instalações

Para a realização dos ensaios foram utilizados 12 exemplares adultos selvagens de *Lysmata amboinensis* adquiridos à empresa Orni'Ex (Vila Nova de Gaia) que fez a importação direta de Singapura. Os animais encontravam-se numa fase de hermafroditismo simultâneo sexual e foram alojados, em grupo, num aquário de vidro retangular (100 cm x 50 cm x 30 cm; volume total de 200 L) ligado a um sistema de maturação de água salgada em regime de circulação fechado, para camarões decápodes ornamentais, tal como descrito por Calado *et al.* (2007). A água salgada reconstituída foi preparada utilizando água doce proveniente de um sistema de osmose (Puratck da Vertex®) e misturada com sal reconstituído (Crystal Sea®; Baltimore, USA) seguindo as instruções do fabricante. A salinidade foi medida diariamente com um densímetro (Instant Ocean Hydrometer; Aquarium Systems®) e mantida a $35/1000 \pm 3$. A temperatura da água foi mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ através da utilização de um termóstato de 200 W (Cromoelectra®). Os compostos azotados como amónia e nitritos foram mantidos a níveis residuais (não detetáveis), sendo que os nitratos não ultrapassaram os $4,5 \pm 2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os valores médios de pH, dureza e cálcio foram mantidos a $8,0 \pm 0,1$, $80 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ de carbonato de cálcio (CaCO_3) e $420 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$, respetivamente. A manutenção dos parâmetros da água foi complementada com mudanças parciais de água salgada natural (10% do volume total) a cada 15 dias. Os animais foram submetidos a um fotoperíodo artificial de 12h dia : 12h noite. Em termos de enriquecimento ambiental foram utilizadas algumas rochas de recife para fornecer abrigo e evitar agressões entre os reprodutores.

Durante um período de aclimatização de 2 semanas, os reprodutores foram alimentados (3 vezes por dia; 09:00h, 14:30h e 17:00h) com uma dieta específica de manutenção produzida pela SPAROS (proteína bruta 50%; gordura bruta 10%) e alimento congelado (*Artemia* adulta; Gamma Blister®). O alimento foi fornecido a cerca de 20% da biomassa total estimada dos reprodutores.

No início do período experimental o lote de camarões reprodutores foi medido apresentando um comprimento médio individual de 55 ± 4 mm (medido desde a ponta do rostro até à parte terminal do télson). Durante o primeiro mês todas as desovas dos reprodutores foram descartadas deixando que ocorressem, de forma livre, no aquário de maturação. Esta opção esteve relacionada com o facto de não ser possível realizar todos os tratamentos experimentais em simultâneo devido ao número de larvas produzidas por reprodutor (média de 100-230). Tentou-se, também deste modo, que as larvas obtidas posteriormente fossem homogéneas em termos de tamanho e provenientes de animais sujeitos a manuseio alimentar idêntico.

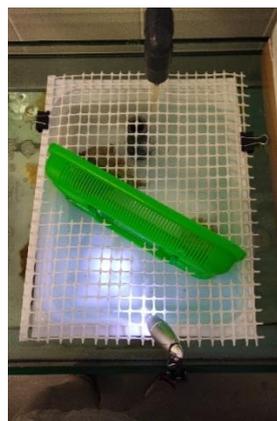
Em cada desova, apenas as larvas viáveis (mais ativas) eram escolhidas e repartidas pelo máximo de tratamentos possível significando que apenas 20% das larvas de cada desova foram aproveitadas. De qualquer dos modos, o número relativamente elevado de desovas possibilitou a execução de, pelo menos, três réplicas de cada um dos nove tratamentos durante os quatro meses de trabalho experimental da tese.

Segundo as condições de água e alimentação descritas, os camarões apresentaram um período médio de 15 ± 5 dias para completar uma desova. Os camarões ovados foram monitorizados diariamente para avaliar o estado de maturação dos embriões. Assim que a coloração dos embriões passava de verde para cinzenta, eles eram retiradas do aquário de maturação e estabulados, individualmente, numa maternidade construída para o efeito (Fotografia 2).

A maternidade consistiu num sistema de 6 boxes de plástico (32 cm x 14 cm x 10 cm; 4,5 L) abastecidas com água idêntica à do sistema de maturação. As primeiras 3 desovas foram perdidas porque os camarões canibalizaram as larvas. Nas desovas seguintes foi colocada uma rede de confinamento no sentido da corrente da água para evitar o canibalismo das larvas por parte do camarão. Além disso, foi colocado um foco de luz led branca num ponto distante da boxe para possibilitar a concentração das larvas dado o seu fototropismo positivo (Fotografia 3).



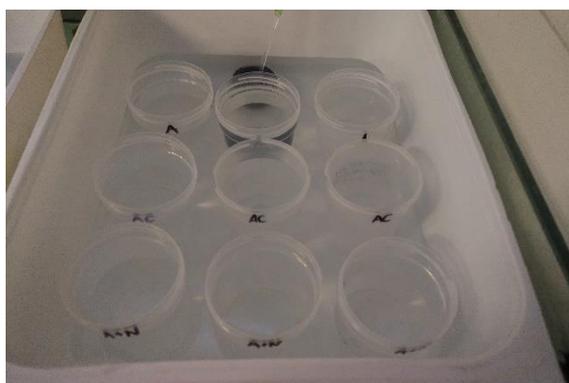
Fotografia 2. Maternidade.



Fotografia 3. Boxe da maternidade.

Após a desova, como foi referido, apenas as larvas viáveis foram escolhidas para a constituição das réplicas experimentais. Na impossibilidade de realizar o estudo num sistema semelhante ao do *planktonkreisel*, as larvas foram contadas individualmente utilizando uma pipeta de *Pasteur* e colocadas em grupos aleatórios de 10 indivíduos em recipientes plásticos de 100 ml (sistema estático) em regime de banho-maria nas boxes (Fotografia 4). A densidade média foi de 100 larvas L⁻¹.

Para a constituição de todos os grupos foi utilizado um total de 270 larvas (9 tratamentos x 10 larvas x 3 réplicas) o que representou uma utilização de cerca de 20% de todas as larvas produzidas em todas as desovas (1500 larvas; 12 desovas).



Fotografia 4. Sistema de banho-maria no sistema de cultivo larvar.

O maneiio alimentar consistiu no fornecimento de cada dieta com uma frequência de três vezes por dia (9h, 14h e 18h). As dietas foram distribuídas, manualmente, com pipeta de *Pasteur* após homogeneização de aproximadamente, 20 mg de dieta em 30 ml de água salgada num tubo *Falcon* (ver Tabela 7). O alimento foi fornecido em excesso de modo a criar uma concentração elevada de partículas em cada recipiente. Os náuplios de *Artemia*

foram fornecidos vivos, após a eclosão e sem enriquecimento, a uma concentração média de cerca de 2 indivíduos ml^{-1} de água (200 náuplios/recipiente).

Devido ao fornecimento em excesso do alimento, para prevenir a sua decomposição e manter uma boa qualidade de água nos cultivos larvares, as larvas de cada recipiente foram concentradas num pequeno volume de água e transvasadas para outro recipiente limpo e cheio com água salgada natural, devidamente filtrada e acondicionada, para a mesma temperatura. Esta operação foi realizada a uma taxa de 2 renovações diárias (manhã e final do dia) antes de novo fornecimento de dieta. No caso dos tratamentos com *Artemia*, a água foi mudada apenas uma vez por dia.

Todos os recipientes foram monitorizados diariamente para avaliar a atividade das larvas, a sobrevivência e a capacidade de muda para outras fases *zoea*. A atividade das larvas era realizada por observação visual. Também no caso de mortalidade as larvas eram recolhidas e analisadas ao microscópio ótico (Nikon®) para avaliar a sua fase de desenvolvimento.

2. Dietas

No total foram testados nove regimes alimentares. Um deles foi constituído por uma mistura comercial baseada em microalgas liofilizadas, três foram microdietas encapsuladas (A, B, C), dois alimentos vivos congelados (náuplios de *Artemia* congelados, rotíferos congelados), um alimento liofilizado (*Artemia* adulta) e um alimento vivo (náuplios de *Artemia*) como pode ser consultado na Tabela 4. Na fase final do estudo, dado o baixo desempenho zootécnico das larvas, foi testado um regime alimentar suplementar, em *co-feeding*, que resultou da combinação das duas dietas que apresentaram melhores resultados de sobrevivência (dieta A+NAv).

A formulação e composição em ingredientes das microdietas encapsuladas (A, B, C) não é apresentada por questões comerciais, sendo que apenas são referidos os ingredientes principais e a sua composição química aproximada (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Composição química (% da matéria seca) das dietas inertes, congeladas e vivas fornecidas às larvas.

<i>Dietas</i>	<i>Acrónimo</i>	<i>Composição Química (% MS)</i>		
		<i>PB</i>	<i>GB</i>	<i>Cinzas</i>
<i>Alimentos inertes</i>				
Microalgas ¹	MA	42	21	13
A	A	63,3	8,2	8
B	B	62,9	8,1	9
C	C	63,3	8,2	11
<i>Artemia</i> adulta liofilizada ²	AL	35,0	24,0	12
<i>Alimentos Congelados</i>				
Rotíferos congelados ³	ROc	41,2	7,3	11,2
Náuplios de <i>Artemia</i> congelados ⁴	NAc	54,0	22,5	5,7
<i>Alimentos Vivos</i>				
Náuplios de <i>Artemia</i> vivos ⁵	NAv	54,0	22,4	5,8

¹Mix de microalgas *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* e *Isochrysis sp.*; ²Humidade: 2%; ^{3,4}Gamma Blister (Tropical) Humidade: 90%; ⁵Ovos de *Artemia* (Hobby).

Tabela 5 – Principais ingredientes das dietas inertes (A, B, C).

Ingredientes (%)	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Proteína de origem marinha	55	65	65
<ul style="list-style-type: none"> • Farinha de peixe • Hidrolisado de peixe • Farinha de lula • Farinha de camarão • Farinha de <i>Krill</i> 			
Proteína de origem vegetal	25	0	0
<ul style="list-style-type: none"> • Concentrado proteico de ervilha • Glúten de trigo 			
Biomassa natural de <i>Artemia</i>	0	5	10
Mix de microalgas (<i>Spirulina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Tetraselmis</i>)	0	10	5
Mix de óleo de peixe e <i>Krill</i>	8	8	8
Vitaminas e minerais	2	2	2
Outros aditivos	10	10	10

As microdietas experimentais (A, B, C) foram produzidas pela SPAROS Lda. (Olhão) segundo a metodologia que se descreve seguidamente.

Todos os ingredientes na forma de pó foram inicialmente misturados e triturados num moinho de martelos micropulverizador (SH1, Hosokawa-Alpine, Alemanha).

Posteriormente, adicionou-se a fração de óleo, as dietas foram humidificadas com 25% de água e aglomeradas num processo de extrusão (Dominioni Group, Itália) com baixo cisalhamento e temperatura controlada. Os pellets resultantes foram secos num forno de convecção durante 4 h a 60°C (OP 750-UF, LTE Scientifics, Reino Unido), amassados (Neuro Farm, Alemanha) e peneirados para obter os tamanhos de partícula desejados (<80-120 µm).

3. Análises

A composição analítica de todas as dietas foi realizada pelos seguintes processos: a matéria seca por secagem a 105°C durante 24 h; as cinzas por combustão a 550°C durante 12 h; a proteína bruta (Nx6,25) através da libertação de azoto por técnica de combustão seguida pela deteção térmica de condutividade (LECO FP528, Leco Instruments, USA); a gordura bruta após a extração de diclorometano pelo método de Soxhlet.

Como referido anteriormente, as dietas foram distribuídas, manualmente, com pipeta de *Pasteur* de acordo com a metodologia apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Metodologia de preparação das dietas experimentais fornecidas às larvas.

Dietas	Preparação
Microdietas encapsuladas (dietas A, B, C)	Prévia hidratação e homogeneização em água salgada
MA	Prévia hidratação e homogeneização em água salgada
<i>Artemia</i> adulta liofilizada	Prévia hidratação e homogeneização em água salgada
Náuplios de <i>Artemia</i> vivos	Fornecidos <i>tal qual</i>
Náuplios <i>Artemia</i> congelados	Homogeneização em água salgada
Rotíferos congelados	Homogeneização em água salgada
<i>Co-feeding</i> (dieta A+NAV)	Prévia hidratação e homogeneização em água salgada + fornecidos <i>tal qual</i>

IV. Resultados

1. Sobrevivência larvar

Na Figura 13 apresentam-se os dados relativos à taxa de sobrevivência das larvas alimentadas com dietas inertes (MA, A, B, C e AL). De um modo geral todas as dietas apresentaram taxas de mortalidade elevadas com três das dietas a resultarem em 100% de mortalidade aos 6 dias de vida. A dieta AL apresentou o pior resultado (100% de mortalidade ao 4º dia), enquanto a dieta A não permitiu a sobrevivência das larvas além dos 7 dias.

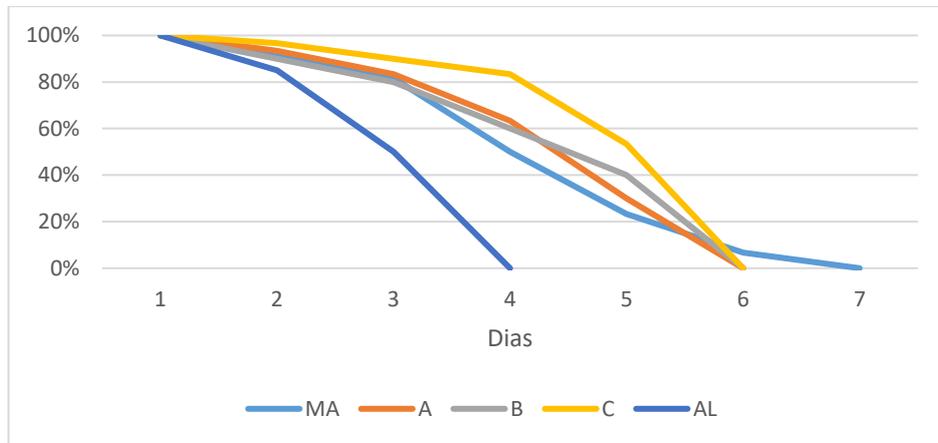


Figura 13. Sobrevivência (%) das larvas alimentadas com dietas inertes. Cada valor é a média de três replicados.

Na Figura 14 são apresentados os valores médios de sobrevivência das larvas alimentadas com as dietas baseadas em alimentos congelados (NAC, ROc) e alimento vivo (NAv).

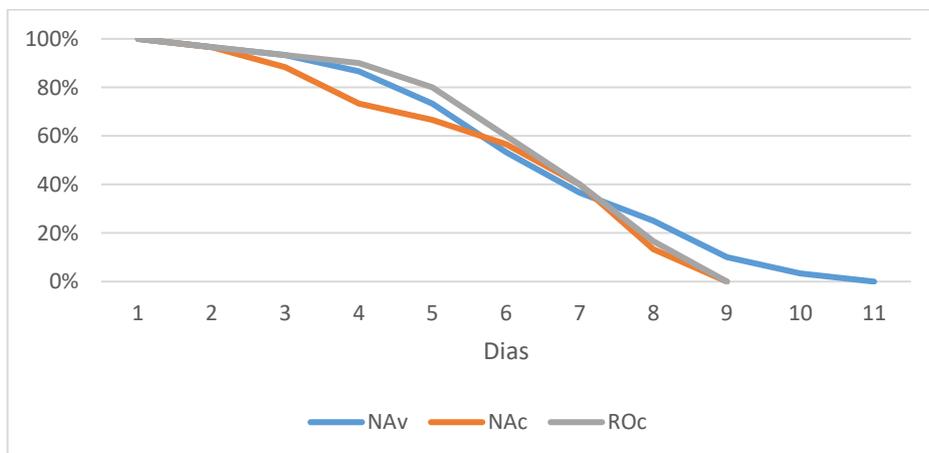


Figura 14. Sobrevivência (%) das larvas alimentadas com dietas vivas e congeladas. Cada valor é a média de três replicados.

A duração média de vida das larvas alimentadas com estas dietas aumentou para os 9 dias (dietas congeladas) e 11 dias (alimento vivo). Apesar do baixo desempenho, quando comparadas com as dietas inertes, verificou-se uma melhoria geral das taxas de sobrevivência com destaque para a dieta baseada em alimento vivo (NAv).

Na Figura 15 são confrontados todos os regimes alimentares incluindo o regime suplementar de *co-feeding* (dieta inerte A + alimento vivo). A observação do gráfico permite registar o fraco desempenho das dietas inertes quando comparadas com as dietas congeladas e vivas. Além disso, é possível constatar que o regime *co-feeding* foi aquele que promoveu o melhor desempenho em termos de sobrevivência, com registo de 95% de sobrevivência larvar aos 15 dias. Todavia, este valor foi diminuindo gradualmente (77% aos 20 dias) até se registar a mortalidade total das larvas (100% ao 28º dia).

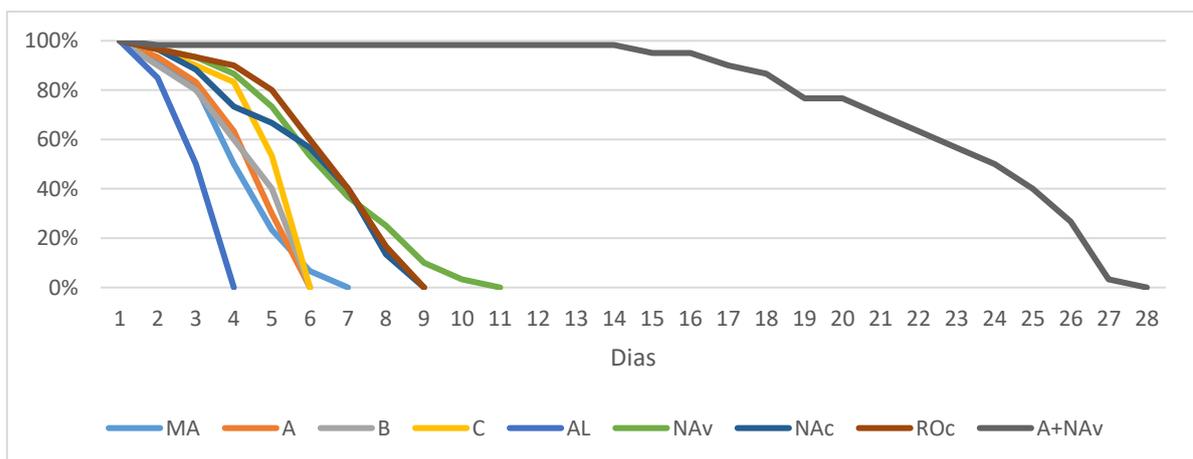


Figura 15. Sobrevivência das larvas alimentadas com todos os tipos de dieta, em percentagem.

Apresenta-se uma melhoria significativa nos dias de vida, que de 11 dias na dieta NAv passou para os 28 dias na dieta A+NAv.

2. Atividade larvar

Na Figura 16 são apresentados os dados relativos à evolução da atividade larvar durante o estudo realizado. A observação dos dados permite constatar que o padrão de atividade larvar se relacionou diretamente com as taxas de sobrevivência larvar.

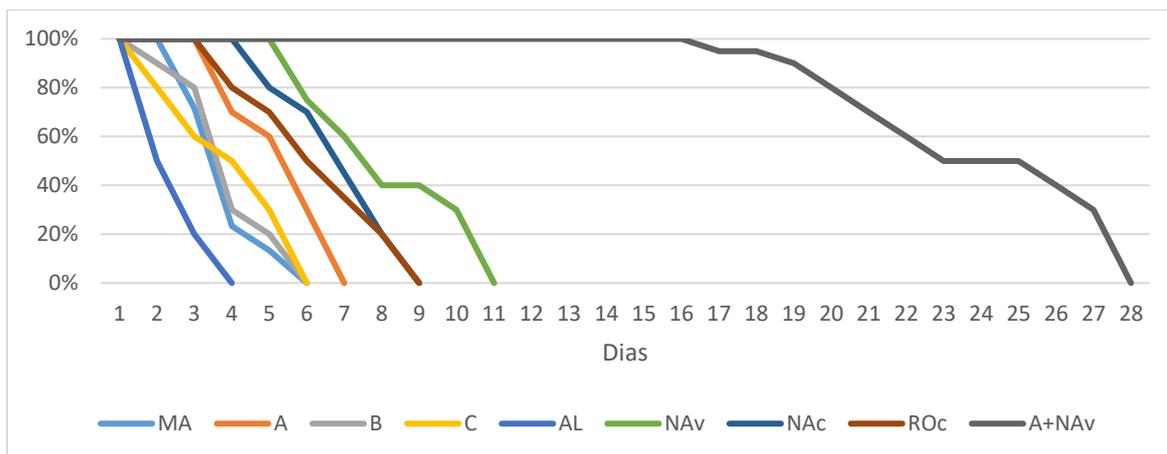


Figura 16. Atividade das larvas, em percentagem.

Verifica-se que a morte das larvas foi antecedida de abaixamentos proporcionais da atividade larvar. Neste parâmetro, os regimes alimentares associados podem ser organizados por ordem decrescente: (A+NAv) < (NAv) < (NAc) = (ROc) < (A) < (MA) = (B) = C < (AL). Mais uma vez resulta evidente o desempenho elevado do regime de *co-feeding* em relação à fraca prestação da dieta baseada em *Artemia* liofilizada (AL), enquanto o grupo das dietas baseadas em alimentos congelados se posicionou em zona intermédia mas superior ao desempenho das dietas inertes.

2.1. Evolução das fases larvares

As larvas foram observadas ao microscópio (ampliações 40x e 100x) de forma regular para poder acompanhar as mudas e consequente passagem para fases larvares mais avançadas. Esta evolução encontra-se registada graficamente na Figura 17.

As larvas do tratamento MA passaram da fase *zoea* I para *zoea* II ao 4º dia. As larvas das dietas A, B e C demoraram, em média, 3 dias a passar para *zoea* II. No tratamento A as larvas atingiram a fase *zoea* III ao 6º dia. As larvas alimentadas com a dieta AL não conseguiram ultrapassar a primeira fase larvar.

Todas as larvas alimentadas com as dietas vivas e/ou congeladas passaram a fase de *zoea* I para *zoea* II ao 3º dia. As larvas alimentadas com a dieta NAc passaram a *zoea* III ao 4º dia e as da dieta NAv ao 5º dia. A fase de *zoea* IV foi atingida ao 9º dia.

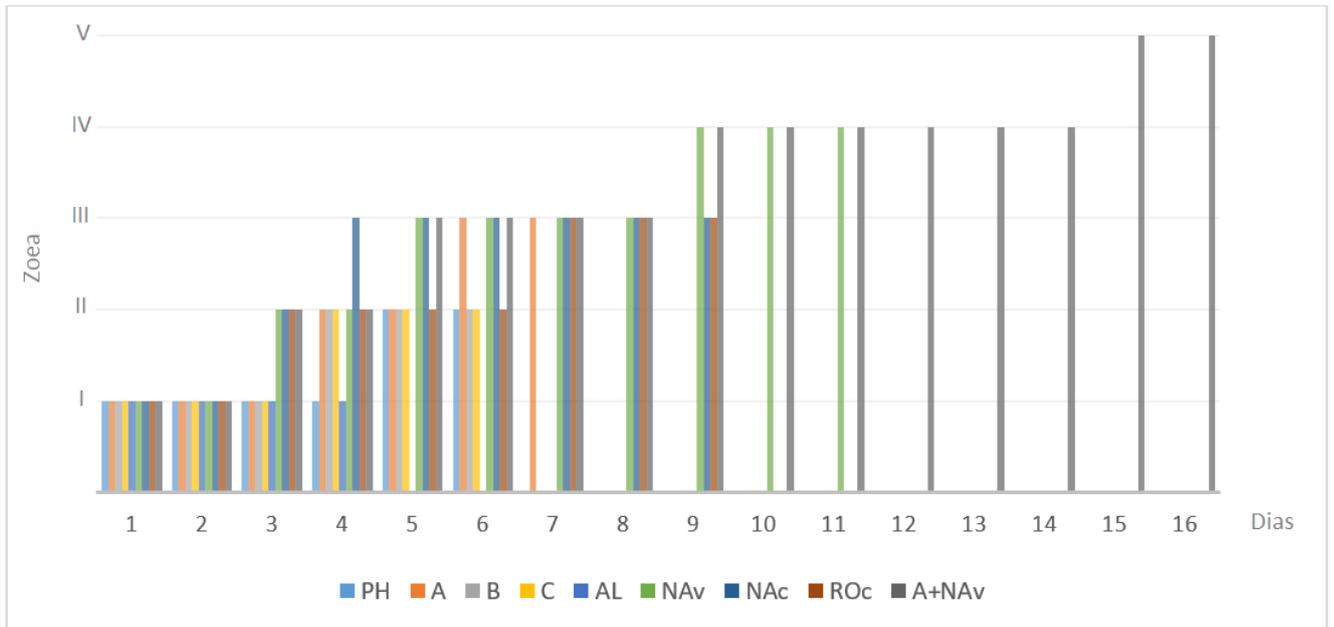


Figura 17. Evolução diária dos estados larvares em função do regime alimentar.

O regime *co-feeding* (dieta A+NAv) foi aquele que permitiu atingir o estado larvar mais avançado. Com efeito, as larvas atingiram as fases de *zoea* II, III, IV e V aos 3º, 5º, 9º e 10º dias, respetivamente.

Na sequência seguinte (Fotografias 5 a 10) são apresentadas as fotografias ao microscópio das diferentes fases larvares observadas ao longo do trabalho.



Fotografia 5. *Zoea* I.



Fotografia 6. *Zoea* II.



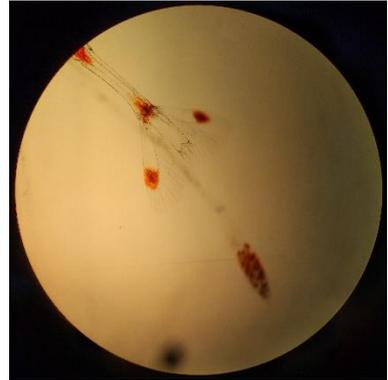
Fotografia 7. *Zoea* III.



Fotografia 8. *Zoea IV.*



Fotografia 9. *Zoea V.*



Fotografia 10. *Zoea V.*

V. Discussão de Resultados

1. Sobrevivência larvar

A sobrevivência é considerada um fator de extrema importância na avaliação da qualidade das larvas. Todavia, segundo Calado *et al.* (2005), deve ser estabelecido um limite para o caso de as larvas suspenderem o seu desenvolvimento (estagnarem na mesma fase *zoea*). Nestas condições, independentemente da taxa de sobrevivência, as larvas deverão ser consideradas de fraca qualidade.

Segundo Calado (2008), tendo ocorrido uma mortalidade de 50% das larvas até meio do seu período de desenvolvimento, aquelas que sobreviveram também vão experienciar uma alta mortalidade nas fases seguintes. Além disso, nas últimas fases larvares (geralmente em número inferior a 5% do efetivo inicial) é possível que ocorra uma muda extra. Este tipo de situação é mais evidente nos casos em que não é feita a correção de fatores (dieta, por exemplo).

No estudo realizado, as larvas alimentadas com dietas inertes atingiram os 50% de mortalidade entre o 3º e 5º dias, tendo atingido um máximo de 7 dias de vida. Utilizando dietas vivas e congeladas, a taxa de 50% de mortalidade ocorreu, sensivelmente, ao 7º dia sendo que a dieta com melhor resultado permitiu a sobrevivência de algumas larvas até aos 11 dias de vida. As larvas alimentadas com o regime alimentar de *co-feeding*, composto pela junção das dietas que originaram melhores resultados (inerte + viva) atingiram os 50% de mortalidade ao 24º dia, tendo as restantes larvas sobrevivido até aos 28 dias.

Assim, comprova-se que a taxa de mortalidade aumenta rapidamente depois de atingidos os 50% de mortalidade os animais.

Além de permitir avaliar a qualidade da produção larvar, como referido anteriormente, a taxa de sobrevivência é um critério que permite aferir, em termos nutricionais, a qualidade da dieta, em geral, e a eficácia de alguns ingredientes, em particular (NRC, 2011). Os resultados obtidos neste estudo não permitem tecer considerações acerca das necessidades nutricionais das larvas, dado que as respostas de sobrevivência foram muito baixas.

1.1. Regime alimentar – dietas inertes

A utilização exclusiva de dietas inertes (artificiais) no cultivo larvar é um objetivo de longa data em nutrição de larvas de peixes e crustáceos. De facto, este tipo de dietas pode ser utilizado em regime de substituição parcial ou total do alimento vivo, minimizando os custos de produção e eliminando a variação de qualidade nutricional dos alimentos vivos. Todavia, o seu sucesso na alimentação larvar depende do tamanho, da forma, do conteúdo nutricional, palatabilidade e tipo de aglomerante da partícula, entre outros fatores. De um modo geral é reconhecida a dificuldade na alimentação de larvas recém eclodidas apenas com dietas inertes que se reflete em taxas elevadas de mortalidade (Johnston *et al.*, 2005). Segundo D’Abramo (2002), o baixo desempenho destas dietas pode, também, estar relacionado com os seus níveis mais baixos de humidade e de atividade enzimática que interferem com a palatabilidade e consumo. Dos vários regimes alimentares testados, a dieta AL (artémia adulta liofilizada) foi aquela que apresentou o pior desempenho em termos de sobrevivência. Os níveis muito baixos de humidade (<3%) e de enzimas endógenas desta dieta podem ter estado relacionados com a pior prestação das larvas.

Nos camarões ornamentais, a aceitação da dieta inerte (prensada ou extrudida) é dependente da idade da larva e, em alguns casos, da sua capacidade em conseguir transformar a partícula do alimento em porções mais pequenas (Calado *et al.*, 2017). Nos anos mais recentes, foi dada particular atenção à tecnologia de microencapsulação de ingredientes e dietas para larvas. Esta técnica permite que as partículas de alimento contenham, além da formulação adequada em nutrientes, um tamanho e fluabilidade adequados e, acima de tudo, um nível de lixiviação de nutrientes bastante reduzido (Willer & Aldridge, 2017). As microdietas encapsuladas (A, B, C) utilizadas neste estudo apresentaram-se adequadas em termos de tamanho de partícula, fluabilidade e estabilidade. No entanto, estiveram associadas a níveis de ingestão muito baixos, o que condicionou de modo severo o crescimento e a sobrevivência das larvas.

Deve ser referido que em termos de desempenho larvar a dieta A se destacou das restantes microdietas (B e C), tendo ainda superado o desempenho das dietas baseadas em *Artemia* liofilizada (AL) e microalgas (MA). Olhando para a composição das dietas, verifica-se que a componente proteica da dieta A incluiu 25% de proteína de origem vegetal (não marinha) em detrimento da inclusão de *Artemia* (dieta C) ou de microalgas (dieta B). Parece evidente que o concentrado proteico de ervilha teve um efeito positivo na nutrição das larvas, que

estará relacionado com a elevada digestibilidade do ingrediente. Esta eficiência é reforçada quando se avalia o desempenho das larvas alimentadas com uma dieta rica em microalgas (dieta MA) e em *Artemia* (dieta AL).

1.2. Regime alimentar – alimentos liofilizados

O desempenho das larvas de camarão alimentadas com a dieta rica em microalgas liofilizadas (dieta MA) foi medíocre, sendo que as larvas apresentaram uma sobrevivência máxima de 6 dias. Segundo Zhang *et al.* (1998), os regimes alimentares larvares constituídos integralmente por microalgas parecem ser inadequados para as fases iniciais do desenvolvimento larvar. A baixa palatabilidade e digestibilidade dificultada pelas paredes celulares das microalgas podem estar na origem destas evidências. No entanto, o suplemento de microalgas durante o seu desenvolvimento posterior pode ser vantajoso (Simões *et al.*, 2002).

A *Artemia* não enriquecida é deficiente em fosfolípidos, vitamina A e C e, especialmente HUFAs da série n-3 (Sorgeloos *et al.*, 2001). Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a *Artemia* adulta liofilizada (dieta AL) não se adequa ao crescimento destas larvas. De facto, este regime alimentar foi aquele que conduziu aos piores resultados. Os níveis baixos de humidade do ingrediente, a ausência de movimento próprio e a sua composição nutricional deficitária estarão na origem destes resultados.

1.3. Regime alimentar – alimentos vivos/congelados

Os náuplios de *Artemia* e os rotíferos são alimentos vivos muito utilizados em cultivos larvares. Todavia, em termos nutricionais, são pobres em HUFA n-3 e ricos em ácido linoleico e linolénico (Calado *et al.*, 2017), mas os processos de enriquecimento com microalgas melhoram significativamente o seu valor nutricional (Palmtag & Holt, 2007; McKinnon *et al.*, 2003). Segundo Palmtag *et al.* (2006), a alimentação das larvas dos crustáceos com rotíferos (até à fase *zoea* III) pode ser importante para minimizar a mortalidade larvar das primeiras fases.

No estudo que se realizou estes itens alimentares foram utilizados na sua forma congelada (náuplios de *Artemia* – dieta NAc; rotíferos congelados – dieta ROc). Qualquer uma destas

dietas revelou-se mais adequada para a alimentação das larvas, aumentando as taxas de sobrevivência e longevidade para 9 dias.

O fator movimento da presa foi testado no regime NAV constituído por náuplios de *Artemia* vivos e, como seria expectável, o desempenho larvar foi melhorado com as larvas a atingir uma longevidade média de 11 dias. Estes resultados evidenciam a importância e dependência da utilização de alimento vivo no cultivo larvar desta espécie de camarão. No entanto, apesar dos melhores resultados observados com as dietas congeladas ou vivas quando comparadas com as dietas inertes ou liofilizadas, nenhuma delas se mostrou adequada para o crescimento, sobrevivência, atividade e desenvolvimento larvar do camarão *L. amboinensis*.

1.4. Regime alimentar – *co-feeding*

Geralmente, a presença de alimento vivo estimula a ingestão de um maior número de partículas de dietas inertes (Rhyne *et al.*, 2001) e é este o princípio em que assenta o *co-feeding* utilizado nas maternidades de peixes e crustáceos para desmame larvar. O alimento vivo em *co-feeding* também é responsável pela melhoria da digestibilidade e da assimilação das dietas inertes devido à sua composição bioquímica – presença de atividade enzimática endógena (D'Abramo, 2002).

O regime complementar de alimentação por *co-feeding* que se realizou no final do estudo vem confirmar este pressuposto. De facto, a junção da dieta inerte A com náuplios de *Artemia* vivos (dieta A+NAV) fez disparar os valores de sobrevivência e atividade das larvas, que atingiram 28 dias de longevidade e atingiram a fase larvar mais avançada de todos os ensaios. Rhyne & Lin (2004) obtiveram resultados de sobrevivência semelhantes na fase zoea V (que foi atingida no dia 15) quando utilizaram um regime alimentar de *co-feeding* com uma dieta inerte e *Artemia* viva.

Estes resultados sugerem que a utilização deste tipo de dieta poderá constituir uma base de estudo importante para trabalhos futuros de modo a ultrapassar a notável dificuldade da alimentação e produção industrial de larvas desta espécie.

VI. Considerações Finais

A realização deste estudo permitiu constatar que os camarões são animais que apresentam uma complexidade extrema, com destaque para esta espécie ornamental, apresentando uma diversidade considerável nas fases iniciais do seu desenvolvimento que são muito influenciadas pelas suas necessidades nutricionais e pelos aspetos relacionados com a sua fisiologia.

Estimar as necessidades nutricionais destes animais é extremamente difícil não só por estes passarem por várias metamorfoses até à fase adulta mas, também, por poderem incluir na sua dieta organismos planctónicos e minerais dissolvidos presentes na água de cultivo.

A possibilidade da realização de estudos relacionados com a determinação das necessidades nutricionais das larvas é, também, fortemente condicionada pela baixa sobrevivência larvar causada por formas físicas inadequadas e/ou fraca aceitação das dietas.

Embora a alimentação exclusiva com alimento composto represente uma redução de custos significativa em alimentação e mão-de-obra, ainda não é possível criar estes animais sem recurso a alimento vivo nas fases iniciais de vida tal como foi possível constatar neste estudo.

Os resultados obtidos sugerem que a utilização do regime *co-feeding* com uma dieta inerte de base nutricional semelhante à A e náuplios de *Artemia* vivos poderá constituir uma base de estudo importante para trabalhos futuros, de modo a ultrapassar a notável dificuldade da alimentação e produção industrial de larvas desta espécie.

VII. Referências Bibliográficas

- Calado, R. (2008). *Marine Ornamental Shrimp – Biology, Aquaculture and Conservation*. Wiley-Blackwell, Oxford, U.K. ISBN: 978-1-4051-7086-4.
- Calado, R., Dionísio, G., & Dinis, M. T. (2007b). Starvation resistance of early zoeal stages of marine ornamental shrimps *Lysmata* spp. (Decapoda: Hippolytidae) from different habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 351, pp. 226–233.
- Calado, R., Dionísio, G., Bartilotti, C., Nunes, C., dos Santos, A. & Dinis, M. T. (2008a). Importance of light and larval morphology in starvation resistance and feeding ability of newly hatched marine ornamental shrimps *Lysmata* spp. (*Decapoda: Hippolytidae*). *Aquaculture*, 283, pp. 56–63.
- Calado, R., Figueiredo, J., Rosa, R., Nunes, M. L., & Narciso, L. (2005). Larval culture of Monaco shrimp *Lysmata seticaudata* (Decapoda: Hippolytidae): effect of temperature rearing density and larval diet. *Aquaculture*, 245. 221-237.
- Calado, R., Narciso, L., Morais, S., Rhyne, A.L., & Lin, J. (2003). A rearing system for the culture of ornamental decapod crustacean larvae. *Aquaculture*, 218, pp. 329–339.
- Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M. P., & Holt, G. J. (2017). *Marine Ornamental Species Aquaculture*. Wiley Blackwell, Oxford, U.K. ISBN: 978-047-06-7390-4.
- Calado, R., Pimentel, T., Cleary, D. F. R., Dionísio, D., Nunes, C., da Silva, T. L., & Dinis, M. T. (2010). Providing a common diet to diferente marine decapods does not standardize the fatty acid profiles of their larvae: a warning sign for experimentation using invertebrate larvae produced in captivity. *Marine Biology*, 157, pp. 2427-2434.
- Calado, R., Pimentel, T., Vitorino, A., Dionísio, G., & Dinis, M. T. (2008b). Technical improvements of a rearing system for the culture of decapod crustacean larvae, with emphasis on marine ornamental species. *Aquaculture*, 285, pp. 264–269.
- Calado, R., Vitorino, A., Dionísio, G., & Dinis, M. T. (2007a). A recirculated maturation system for marine ornamental decapods. *Aquaculture*, 263, pp. 68-74.
- Conceição, L. E. C., Yufera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*. 41(5):613-640.
- Cunha, L., Mascaro, M., Chiapa, X., Costa, A., & Simões, N. (2008). Experimental studies on the effect of food in early larvae of the cleaner shrimp *Lysmata amboinensis* (De Mann, 1888) (Decapoda: Caridea: Hippolytidae). *Aquaculture*, 277, pp. 117-123.
- D'Abramo, L. R. (2002). Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans. *Avances en Nutrición Acuicola VI*. Memorias del VI

- Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (eds L. E. Cruz Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, N. Simões). Pp 143-151. Cancún, Quintana Roo, México.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Fletcher, D., Kotter, I., Wunsch, M., & Yasir, I. (1995). Preliminary observations on the reproductive biology of ornamental cleaner prawns. *International Zoo Yearbook*, 34, pp. 73–77.
- INE – Instituto Nacional de Estatística (2018). *Anuário Estatístico de Portugal 2017*. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN 978-989-25-0466-7.
- INE & DGRM – Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (2018). *Estatísticas da Pesca 2017*. Instituto Nacional de Estatística, I.P. ISBN 978-989-25-0393-6.
- Johnston, M. D., Johnston, D. J., Knott, B., & Jones, C. (2005). Mouthpart and foregut ontogeny in phyllosomata of *Panulirus ornatus* and their implications for development of a formulated larval diet. *European Aquaculture Society, Special Publication*, 36. 223-226.
- Kumar, T. T. A., Gunasundari, V., & Prakash, S. (2015). Breeding and Rearing of Marine Ornamentals. *Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture*, pp. 101-107.
- Leal, M. C., Rocha, R. J. M., Rosa, R., & Calado, R. (2016). Aquaculture of marine non-food organisms: what, why and how? *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 400-423.
- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., & Robino, B. (2003). The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223. 89-106.
- Nielsen, R., Nielsen, M., Abate, T. G., Hansen, B. W., Jepsen, P. M., Nielsen, S. L., ..., Buchmann, K. (2017). The importance of live-feed traps–farming marine fish species. *Aquaculture Research*, 48(6), 2623-2641.
- NRC – National Research Council of the National Academies (2011). *Nutrient Requirements of fish and shrimp*. Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies. ISBN 978-0-309-16339-2.
- Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M. M., Hajimoradloo, A., & Noori, F. (2017). Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities,

- fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. *Aquaculture Research*, 48(11), 5576-5586.
- Palmtag, M. E., & Holt, G. J. (2007). Experimental studies to evaluate larval survival of the fire shrimp, *Lysmata debelius*, to the juvenile stage. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38. 102-113.
- Palmtag M. R., Holt, G. J., & Faulk, C. K. (2006). Highly unsaturated fatty acid composition of rotifer (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* fed various enrichments. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37. 126-131.
- Racotta, I. S., Palacios, E., & Ibarra, A. M. (2003). Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227. 107-130.
- Rhyne, A. J., Linm J., Calado, R., & Turigan, R. (2001). *Improvements in marine ornamentals shrimp culture: high speed video analysis of feeding kinematics in dietary study*. Marine Ornamentals 2001. "Collection, Culture and Conservation". Orlando, Florida, USA. Book of Abstracts, 29-30.
- Rhyne, A. L., & Lin, J. (2004). Effects of different diets on larval development in a peppermint shrimp (*Lysmata* sp. (Risso)). *Aquaculture Research*, 35, pp 1179-1185.
- Ribeiro, L., Souza, M., Barros, F., & Hatje, V. (2014). Desafios da carnicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. *Revista de Gestão Costeira Integrada – Journal of Integrated Coastal Zone Management*. Volume 14(3), setembro 2014. ISSN: 1646-8872. Pp 365-383.
- Rufino, M. M., & Jones, D. A. (2001). Observations on the function of the fifth pereopod in late stage larvae of *Lysmata debelius* (Decapoda, Hippolytidae). *Crustaceana*, 74. 977-990.
- Simões, F., Ribeiro, F., & Jones, D. A. (2002). Feeding early larval stages of the fire shrimp *Lysmata debelius* (Caridea, Hippolytidae). *Aquaculture International*, 10. 349-360.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., & Candreva, P. (2001). Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200. 147-159.
- Tziouveli, V. (2011). *Broodstock conditioning and larval rearing of the marine ornamental white-striped cleaner shrimp, Lysmata amboinensis (de Man, 1888)*. PhD thesis, James Cook University.
- Tziouveli, V., Hall, M., & Smith, G. (2011) The effect of maturation diets on the reproductive output of the white-striped cleaner shrimp, *Lysmata amboinensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, pp. 56–65.

- Tziouveli, V., & Smith, G. (2009). Sexual maturity and environmental sex determination in the white-striped cleaner shrimp *Lysmata amboinensis*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 53:3, pp. 155-163.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., & Razak, T. (2003). *From Ocean to Aquarium: The Global Trade in Marine Ornamental Species*. UNEP-WCMC, Cambridge, U.K.
- Willer, D., & Aldridge, D. C. (2017). Microencapsulated diets to improve bivalve shellfish aquaculture. *Royal Society Open Science*, 4, 171142.
- Zhang, D., Lin, J., & Creswell, R. L. (1998). Effects of food and temperature on survival and development in the peppermint shrimp *Lysmata wurdemanni*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29, 471-476.