

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-graduação em Zootecnia**

**Imaculada de Moraes Carvalho Ananias**

**PRODUÇÃO DE TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) E  
PIRAPITINGA (*PIARACTUS BRACHYPOMUS*) EM DIFERENTES  
DENSIDADES DE ESTOCAGEM EM RAS**

**Belo Horizonte**

**2025**

**Imaculada de Moraes Carvalho Ananias**

**PRODUÇÃO DE TAMBAQUI (*COLOSSOMA MACROPOMUM*) E  
PIRAPITINGA (*PIARACTUS BRACHYPOMUS*) EM DIFERENTES  
DENSIDADES DE ESTOCAGEM EM RAS**

Tese apresentada ao Pós-graduação em  
Zootecnia da Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor (a) em Zootecnia.  
Linha de pesquisa: Produção animal  
Área de concentração: Aquicultura

**Orientador:** Ronald Kennedy Luz

**Coorientador:** Fábio Aremil da Costa  
Santos

**Belo Horizonte**

**2025**

A533p Ananias, Imaculada de Morais Carvalho, 1995-  
Produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirapitinga (*Piaractus  
brachypomus*) em diferentes densidades de estocagem em RAS/Imaculada de  
Morais Caravilho Ananias.- 2025.  
108 f: il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz

Coorientador: Fábio Aremil da Costa Santos

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da  
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Aquicultura.

Inclui Bibliografia.

1. Estresse oxidativo - Teses – 2. Tambaqui -- Criação – Teses – 3.  
Pirapitinga -- Criação – Teses - I. Luz, Ronald Kennedy - II. Santos, Fábio  
Aremil da Costa - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária - IV. Título.

CDD – 639.31

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### Defesa de Doutorado

#### IMACULADA DE MORAIS CARVALHO ANANIAS

Tese de Doutorado defendida e aprovada, por modalidade remota, às 13:30h no dia **vinte e cinco de abril de dois mil e vinte e cinco**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos seguintes professores:

**Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto**

Universidade Federal de Santa Maria



Documento assinado digitalmente

**BERNARDO BALDISSEROTTO**

Data: 30/04/2025 07:35:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Walisson de Souza e Silva**

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Documento assinado digitalmente

**WALISSON DE SOUZA E SILVA**

Data: 29/04/2025 11:20:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Gisele Cristina Favero**

Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente

**GISELE CRISTINA FAVERO**

Data: 30/04/2025 08:08:26-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Cristiano Campos Mattioli**

Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente

**CRISTIANO CAMPOS MATTIOLI**

Data: 30/04/2025 07:54:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz - Orientador**

Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado digitalmente

**RONALD KENNEDY LUZ**

Data: 30/04/2025 08:25:26-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Belo Horizonte, 25 de abril de 2025.

À Deus, nada eu seria sem sua infinita  
bondade e misericórdia.

Ao meu pai Julio, meu maior  
incentivador.

À minha mãe Euziane, que sempre  
esteve presente.

Vó Eulza, vô Josa e tia Héliida (*in*

*memoriam*)

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço à Deus, só foi possível chegar até aqui pela Sua bondade, agradeço também a intercessão de Nossa Senhora Aparecida, me guardando sob Seu manto nas melhores e piores horas.

Aos meus pais Julio Ananias Neto e Euziane de Moraes Carvalho Ananias por todo amor, paciência e confiança, independente das dificuldades que passamos, nunca mediram esforços para que esse momento chegasse. Amo vocês!

Ao meu irmão Emanuel, pela amizade e companheirismo, obrigada pelo melhor abraço do mundo e por me fazer lembrar que somos capazes de ir além do que nos dizem.

Ao meu orientador, professor Dr. Ronald Kennedy Luz, muito obrigada pelos seus ensinamentos, desde a primeira oportunidade de estagiar no Laboratório de Larvicultura, por toda paciência e confiança depositada, apoio, profissionalismo e colaboração para meu crescimento profissional e pessoal.

À Jessica Miranda, minha psicóloga, que desde 2022 acompanha todos meus dilemas, medos, alegrias e frustrações.

À memória das mulheres da minha vida, cada uma com seu jeito de ser me ensinaram a verdadeira definição das palavras forças, resiliência, dedicação, amor e fé, e nunca desistir de um sonho, Vó Eulza, Vó Lourdes, Tia Gê, Tia Héliida e bisas Laura e Pituca e não poderia jamais me esquecer do melhor avô que alguém poderia ter, dono do sorriso mais receptível e pessoa mais humana que poderia existir, Vô Josa. De onde vocês estiverem, saibam que os amo e sou eternamente grata por terem feito parte da minha vida, além da saudade carrego a certeza do reencontro!

Minha eterna gratidão aos meus amigos irmãos, Caroline Lopes, Williane Menezes, Rayssa Carvalho, Laís Alvarenga, Hélio Júnior (Toru), Kamila de Oliveira, Clara de Assis, obrigada por estarem por perto durante todos os erros e os acertos, quando pensei que iria desmoronar, vocês me seguraram de pé até que eu me recuperasse, o companheirismo de vocês torna a vida mais leve.

Às minhas companheiras de apartamento, Victória, Juliana e Marcela, obrigada pela parceria e amizade, todas as conversas afio, madrugadas sentadas na sala e principalmente pela ajuda durante o pós-cirúrgico.

À professora Dra. Gisele Favero e técnica Dra. Suellen Cristina Moreira Sales pela ajuda e apoio durante a execução e escrita deste trabalho.

Aos professores Dr. Bernardo Baldisseroto, Dra. Maria Amália Pavanato e doutoras Elisia Gomes da Silva, Isabela Finamor e Caroline Azzolin Bressan pela oportunidade, disponibilidade e colaboração para realização das análises na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, principalmente pela calorosa acolhida durante minhas idas para Santa Maria.

Aos colegas do laboratório de larvicultura, Fábio, André, Nárcia, Thamara, Rafael, por toda ajuda para execução dos trabalhos, em especial meu amigo Sidney, irmão de doutorado, obrigada por toda ajuda, pela companhia nas noites sem fim fazendo análises sanguíneas e experimentos de baixas temperaturas, pelos conselhos, e puxões de orelha.

Aos meus ex-professores Thiago Jorge e Deliane Costa, sempre serei grata aos conselhos e direcionamentos que me deram ao final graduação, minhas escolhas de hoje são frutos das nossas conversas na sala dos professores do IFSULDEMINAS.

Aos membros da banca examinadora agradeço imensamente pelas considerações valiosas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos do doutorado.

Com carinho, muito obrigada!

*A verdadeira coragem é ir atrás de seu sonho mesmo quando todos dizem que ele é impossível. (Cora Coralina)*

## RESUMO

A densidade de estocagem é uma ferramenta crucial para a produção comercial de peixes, está diretamente ligada ao potencial produtivo do sistema utilizado para a produção de peixes, a saúde, bem-estar e desempenho da espécie alvo da produção. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de juvenis em diferentes fases de produção de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* em distintas densidades de estocagem em sistema de recirculação de água (RAS), levando em conta o desempenho zootécnico, parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos e índices somáticos do *C. macropomum* e da *P. brachypomus*, além do estado oxidativo, sinalização purinérgica, morfometria e rendimento de carcaça e filé, e morfometria braquial de *P. brachypomus*. Para *C. macropomum*, foram conduzidos três experimentos utilizando juvenis com pesos médios iniciais de 0,54 g, 8,22 g e 142,18 g, avaliados por 15 e 75 dias sob densidades variando de 0,3 a 6,0 kg m<sup>-3</sup>. Os resultados indicaram que, nas fases iniciais, a densidade de estocagem não comprometeu o desempenho zootécnico, embora a biomassa final tenha aumentado proporcionalmente à densidade. Para peixes maiores, maiores densidades impactaram parâmetros hematológicos e metabólicos, como hemoglobina, glicose e colesterol, indicando alterações fisiológicas, porém sem prejuízo ao crescimento, evidenciando boa adaptabilidade da espécie ao cultivo intensivo em RAS. Para *P. brachypomus*, dois experimentos iniciais avaliaram os efeitos de densidades crescentes (até 7,90 kg m<sup>-3</sup>) em juvenis com peso entre 1,5 g e 6,66 g por 20 dias. Os dados mostraram que densidades elevadas reduziram o oxigênio dissolvido, caracterizando um ambiente de hipóxia, o que afetou negativamente o crescimento, o ganho de peso e parâmetros hematológicos, como hemoglobina e volume corpuscular médio. Em experimentos subsequentes, juvenis com 29,55 g e 250 g foram mantidos por 90 dias sob densidades de até 4,5 kg m<sup>-3</sup>. Nessa fase, foram avaliados desempenho zootécnico, perfil oxidativo, atividade enzimática e morfometria branquial. As densidades mais elevadas aumentaram o consumo alimentar, a biomassa e a atividade de enzimas antioxidantes hepáticas e musculares (SOD, CAT, GST, GSH), além de induzirem alterações morfológicas nas lamelas branquiais. A sinalização purinérgica, avaliada pela atividade da NTPDase, foi modulada pela densidade, mas sem comprometer o desempenho produtivo. De forma geral, os resultados demonstram que *C. macropomum* apresenta maior tolerância fisiológica a elevadas densidades em RAS desde as fases iniciais, enquanto *P. brachypomus* responde negativamente a altas densidades nos primeiros

estágios, apresentando melhor desempenho em fases mais avançadas, mesmo sob desafios metabólicos. O estudo reforça a importância da definição de protocolos de estocagem específicos para cada fase do ciclo produtivo e espécie, visando otimizar a produção e garantir o bem-estar dos animais. Recomenda-se a realização de experimentos de longa duração que integrem todas as fases do cultivo, a fim de subsidiar práticas sustentáveis e eficientes para a piscicultura de espécies nativas em sistemas intensivos.

**Palavras-Chave:** estresse oxidativo; fisiologia; morfometria branquial; pirapitinga; sinalização purinérgica; tambaqui

## ABSTRACT

Stocking density is a crucial tool for commercial fish production, linked to the production potential of the fish production system and the health, welfare, and performance of the target species. In this context, this study aimed to evaluate juvenile fish production at different production stages of *Colossoma macropomum* and *Piaractus brachypomus* under different stocking densities in a recirculating water system (RAS). This study took into account the zootechnical performance, hematological and blood biochemical parameters, and somatic indices of *C. macropomum* and *P. brachypomus*, as well as the oxidative status, purinergic signaling, morphometry, carcass and fillet yield, and brachial morphometry of *P. brachypomus*. For *C. macropomum*, three experiments were conducted using juveniles with average initial weights of 0.54 g, 8.22 g, and 142.18 g, evaluated for 15 and 75 days at densities ranging from 0.3 to 6.0 kg m<sup>-3</sup>. The results indicated that, in the initial phases, stocking density did not compromise growth performance, although final biomass increased proportionally to density. For larger fish, higher densities impacted hematological and metabolic parameters, such as hemoglobin, glucose, and cholesterol, indicating physiological changes, but without significant growth impairment, demonstrating good adaptability of the species to intensive cultivation in RAS. For *P. brachypomus*, two initial experiments evaluated the effects of increasing densities (up to 7.90 kg m<sup>-3</sup>) on juveniles weighing between 1.5 g and 6.66 g for 20 days. The data showed that high densities reduced dissolved oxygen, creating a hypoxic environment, negatively affecting growth, weight gain, and hematological parameters such as hemoglobin and mean corpuscular volume. In subsequent experiments, juveniles weighing 29.55 g and 250 g were maintained for 90 days at densities of up to 4.5 kg m<sup>-3</sup>. During this period, growth performance, oxidative profile, enzyme activity, and gill morphometry were evaluated. Higher densities increased feed intake, biomass, and the activity of hepatic and muscle antioxidant enzymes (SOD, CAT, GST, GSH), in addition to inducing morphological changes in the gill lamellae. Purinergic signaling, assessed by NTPDase activity, was modulated by density, but without compromising productive performance. Overall, the results demonstrate that *C. macropomum* exhibits greater physiological tolerance to high densities in RAS from the initial stages, while *P. brachypomus* responds negatively to high densities in the early stages, performing better in later stages, even under metabolic challenges. The study reinforces the importance of defining specific stocking protocols for each phase of the production cycle and species,

aiming to optimize production and ensure animal welfare. Long-term experiments that integrate all phases of cultivation are recommended to support sustainable and efficient practices for fish farming of native species in intensive systems.

**Keywords:** gill morphometry; oxidative stress; physiology; pirapitinga; purinergic signalin; tambaqui

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Mecanismo de defesa antioxidante..... 33

### ARTIGO II

**Figure 1.** Dissolved oxygen level (means and standard error) in culture tanks during the production of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) at different stocking densities. (A) Phase 1. (B) Phase 2..... 64

**Figure 2.** Growth performance (means and standard error) of juvenile pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of culture in Phase 1 at different stocking densities in RAS. (A) Final weight, (B) final length, (C) weight gain, (D) daily weight gain, (E) final biomass, (F) specific growth rate, (G) feed consumption, and (H) feed conversion..... 65

**Figure 3.** Growth performance (means and standard error) of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of culture in Phase 2 at different stocking densities in RAS. (A) Final weight, (B) final length, (C) weight gain, (D) daily weight gain, (E) final biomass, (F) specific growth rate, (G) feed consumption, and (H) feed conversion..... 66

**Figure 4.** Plasma triglycerides (means and standard error) of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of culture in Phase 2 at different stocking densities in RAS..... 66

### ARTIGO III

**Figura 1.** Diagrama das medidas morfométricas de *Piaractus brachypomus*. CT - comprimento total (cm), CP - comprimento padrão (cm), CTr - comprimento do tronco (cm), CC - comprimento da cabeça (cm), ATr - altura do tronco (cm), LTr - largura do tronco (cm). Relação comprimento da cabeça/comprimento padrão = CC/CP; Relação comprimento padrão/comprimento total = CP/CT; Relação largura do tronco/comprimento do tronco = LTr/CTr; Relação largura do tronco/altura do tronco = LTr/ATr; Relação altura do tronco/comprimento do tronco = ATr/CTr..... 81

**Figura 2.** Histologia de brânquias demonstrando as medidas morfométricas de altura total das lamelas e distância interlamelar de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS..... 83

**Figura 1.** Estado oxidativo hepático e muscular (média ± erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..... 88

**Figura 2.** Enzimas relacionadas ao sistema purinérgico (média ± erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..... 89

**Figura 3.** Histologia branquial (média ± erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam

diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ )..... 90

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

<b>Table 1.</b> Physicochemical variables of water (mean $\pm$ standard deviation) for the three experiments testing different stocking densities in the rearing tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) in RAS.....	50
<b>Table 2.</b> Growth parameters (mean $\pm$ standard deviation) of tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 15 days in an RAS (experiment 1) .....	51
<b>Table 3.</b> Growth parameters (mean $\pm$ standard deviation) of tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in RAS (experiment 2) .....	51
<b>Table 4.</b> Somatic indices (mean $\pm$ standard deviation) for tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 2) .....	51
<b>Table 5.</b> Physiological parameters (mean $\pm$ standard deviation) for tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 2) .....	52
<b>Table 6.</b> Growth parameters (mean $\pm$ standard deviation) of tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3) .....	52
<b>Table 7.</b> Somatic indices (mean $\pm$ standard deviation) for tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3) .....	52
<b>Table 8.</b> Physiological parameters (mean $\pm$ standard deviation) for tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3) .....	53

### ARTIGO II

<b>Table 1.</b> Water quality parameters (means $\pm$ standard deviations) in culture tanks during the production of pirapitinga ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) after 20 days of production in Experiment I and Experiment II at different stocking densities in RAS .....	64
<b>Table 2.</b> Hematological and biochemical parameters and viscerosomatic and hepatosomatic indices (means $\pm$ standard error) for juvenile pirapitinga ( <i>Piaractus brachypomus</i> ) after 20 days of production in Experiment II at different stocking densities in RAS .....	68

### ARTIGO III

<b>Table 1.</b> Zootechnical performance (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 1) .....	84
<b>Table 2.</b> Hematology and blood biochemistry (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 1) .....	85
<b>Table 3.</b> Somatic indices (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 1) .....	85

<b>Table 4.</b> Zootechnical parameters of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 2) .....	86
<b>Table 5.</b> Hematology and blood biochemistry (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 2) .....	86
<b>Table 6.</b> Somatic indices (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 2) .....	87
<b>Table 7.</b> Morphometric parameters, carcass yield, and fillet yield (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile <i>Piaractus brachypomus</i> after 90 days of culture at different stocking densities in RAS (Experiment 2) .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

% Porcentagem

°C Graus Celsius

μL Microlitro

ADA Adenosina desaminase

Ado Adenosina

ADP Adenosina Difosfato

ALT Alanina aminotransaminase

AMP Adenosina Monofosfato

ANOVA Análise de variância

AST Aspartato aminotransferase

AT Altura de tronco

ATP Adenosina trifosfato

BF Biomassa final

CA Conversão alimentar

CAA Conversão alimentar aparente

CAT Catalase

CC Comprimento cabeça

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CF Comprimento final

CGV Contagem de glóbulos vermelhos

CHCM Concentração de hemoglobina corpuscular média

CL Concentração letal

cm Centímetros

CP Comprimento padrão

CT Comprimento total

CTR Comprimento tronco

CV Cavalo-vapor

D<sub>0.3</sub> Densidade 0.3 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>0.5</sub> Densidade 0.5 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>0.6</sub> Densidade 0.6 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>0.68</sub> Densidade 0.68 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>0.8</sub> Densidade 0.8 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>0.9</sub> Densidade 0.9 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>1</sub> Densidade 1.0 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>1.2</sub> Densidade 1.2 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>1.45</sub> Densidade 1.45 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>1.6</sub> Densidade 1.6 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>1.95</sub> Densidade 1.95 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>2</sub> Densidade 2.0 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>4</sub> Densidade 4.0 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>4.41</sub> Densidade 4.41 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>5.93</sub> Densidade 5.93 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>6</sub> Densidade 6.0 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>7.71</sub> Densidade 7.71 kg m<sup>-3</sup>

D<sub>7.90</sub> Densidade 7.90 kg m<sup>-3</sup>

EROs Espécies reativas a oxigênio

Fk Fator de condição de Fúlton

g Gramas

GLI Glicose

GP Ganho de peso

GPD Ganho de peso diário

GPx Glutathione peroxidase

GSH Glutathione reduzida

GSSH Glutathione oxidada

GST Glutathione-S-transferase

h Hora

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

HCM Hemoglobina corpuscular média

Ht Hematócrito

IGV Índice de gordura visceral

IHS Índice hepatossomático

IVS Índice viscerossomático

Kg Quilogramas

L Litro

LAQUA Laboratório de aquacultura

lnPF Logaritmo natural de peso final

lnPI Logaritmo natural de peso inicial

LT Largura de tronco

m<sup>-2</sup> Metros quadrados

m<sup>-3</sup> Metros cúbicos

mg Miligramas

min Minutos

ml Mililitros

mm Milímetros

n número

NADPH Adenosina dinucleotideo fosfato redutase

NH<sub>3</sub> amônia tóxica

nm Nanômetros

nmol Nanomol

NTPDase

O<sup>2-</sup> superóxido de oxigênio

OD Oxigênio dissolvido

p/v Peso/volume

PF Peso final

pH Potencial hidrogeniônico

PI Peso inicial

PPT Proteínas plasmáticas totais

RAS Sistema de recirculação de água

RPM Rotações por minuto

SOD Superóxido dismutase

TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA Taxa de conversão alimentar

TCE Taxa de crescimento específico

TG Triglicerídeos

tHb Taxa de hemoglobina

U Unidade

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VCM Volume corpuscular médio

$\Delta T$  Duração do experimento em dias

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1. Objetivo Geral .....	24
2.2. Objetivos Específicos .....	24
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
3.1. Espécies Nativas .....	25
3.2. Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) .....	25
3.3. Pirapitinga ( <i>Piaractus brachypomus</i> ).....	26
3.4. Densidade de estocagem.....	27
3.5. Cultivo em sistema de recirculação de água (RAS) .....	28
3.6. Cadeia Fisiológica do Estresse .....	29
3.7. Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	31
3.8. Sistema Purinérgico.....	33
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>5. ARTIGO I.....</b>	<b>46</b>
<b>6. ARTIGO II.....</b>	<b>59</b>
<b>7. ARTIGO III.....</b>	<b>75</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A alta demanda de pescado, principalmente para a alimentação pressiona os setores produtivos a intensificar a produção e aumentar a disponibilidade de peixes para consumo no mercado, além da preocupação constante em relação ao meio ambiente, o que torna a produção ainda mais desafiadora.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), peixe amazônico, é segunda espécie mais produzida no país (PeixeBR, 2023), devido sua rusticidade, resistência a baixas concentrações de oxigênio, boa aceitação de mercado e grande adaptabilidade ao sistema de cultivo (Morais e O'Sullivan, 2017). Por ser uma espécie que demanda água com temperaturas entre 25 e 32°C (Amanjás e Val, 2023), sua produção se concentra nas regiões mais quentes do país. Entretanto, seu cultivo em sistema de recirculação de água (RAS) pode ser uma maneira eficiente de ampliar sua produção em regiões mais frias, além de auxiliar na manutenção do ambiente de cultivo demandado pela espécie.

A pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) é uma espécie também amazônica, terceira maior espécie da região (Kubitza, 2004). Possui importância comercial não só no Brasil, mas também em outros países da América do Sul (Escobar et al., 2019), inclusive países asiáticos como Índia (Kumar et al., 2018) e Tailândia (Xiong et al., 2015). Sua produção em RAS, assim como o tambaqui (*C. macropomum*) tem a possibilidade de impulsionar seu cultivo e ampliar a produção para regiões de clima ameno.

A densidade de estocagem já é amplamente discutida na aquicultura, a fim de alcançar maior produtividade em menor área, aumentando a lucratividade da produção, entretanto para a produção de peixes nativos esses estudos ainda são escassos.

O sistema de recirculação de água, ou também chamado de RAS (*Recirculating Aquaculture System*), trata-se de uma tecnologia superintensiva que se fundamenta no uso mínimo de recursos hídricos e espaço (Silva et al., 2020). As vantagens do sistema também englobam a manutenção da qualidade de água propícia para o cultivo, através dos filtros de retenção de matéria orgânica (mecânico) e reciclagem de resíduos (biológico). Entretanto, a adoção dessa tecnologia exige alto investimento para sua implementação e também operação (Íon et al., 2022). Os custos elevados são compensados com a intensificação sua produção, por meio da densidade de estocagem elevada.

Baixas densidades podem ter interferência no comportamento dos peixes, onde o desenvolvimento de comportamento hierárquico influencia no consumo e ração, desempenho zootécnico e no bem-estar dos animais (Carvalho et al., 2018). De maneira

semelhante, altas densidades também podem interferir negativamente no cultivo. Muitos animais adensados em um pequeno espaço podem apresentar deficiência no crescimento, baixo consumo de ração e níveis de estresse prejudiciais a sua saúde (Sanchez et al., 2013).

O estresse está diretamente relacionado a capacidade do animal expressar seu potencial produtivo, principalmente quanto ao ganho de peso e reprodução. Felizmente, os níveis de estresse podem ser identificados e mensurados através da análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos (Urbinati et al., 2014).

Portanto, é necessário determinar as melhores taxas de adensamento que permitam que o tambaqui e a pirapitinga expressem seu rápido crescimento característico sem que haja interferência em seu bem-estar, além de desenvolver técnicas de produção que permitam que o cultivo dessas espécies seja expandido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar os cultivos das espécies de peixes redondos *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* em diferentes fases de crescimento no sistema de recirculação de água em diferentes densidades de estocagem.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico das espécies *C. macropomum* e *P. brachypomus* em diferentes densidades de estocagem em RAS.
- Analisar os parâmetros hematológicos das espécies *C. macropomum* e *P. brachypomus* em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos sanguíneos, nas espécies *C. macropomum* e *P. brachypomus* em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Verificar os índices somáticos das espécies *C. macropomum* e *P. brachypomus* em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Avaliar os parâmetros morfométricos e rendimento de carcaça e filé de juvenis de *P. brachypomus* produzidos em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Identificar e avaliar a atividade enzimática do sistema de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo de juvenis de *P. brachypomus* produzidos em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Identificar a sinalização purinérgica de juvenis de *P. brachypomus* produzidos em diferentes densidades de estocagem em RAS;
- Realizar e avaliar as medidas morfométricas branquiais de juvenis de *P. brachypomus* em diferentes densidades de estocagem em RAS.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Espécies Nativas

Com 2716 espécies registradas, sendo 1696 originárias da bacia Amazônica, essa região abriga a maior diversidade de peixes do mundo (Dagosta e Pinna 2019) e é distribuída em 18 ordens, com destaque para os Siluriformes e Characiformes como as mais representativas na região (Dagosta e Pinna, 2019). Alguns peixes characiformes são chamados de peixes redondos (Silva-Neta et al., 2023), ganhando destaque na produção piscícola no Brasil e outros países sul-americanos (Fernandes et al., 2018).

Tambaquis (*Colossoma macropomum*), pacus (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitingas (*Piaractus brachypomus*) juntamente com seus híbridos tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*), tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*) e patinga (*P. mesopotamicus* x *P. brachypomus*) são os peixes redondos de maior valor comercial no país (Neta et al., 2023). Essas espécies são reofilicas, percorrendo distâncias longas para realizar a reprodução com desova total durante a chamada piracema (Valladão et al., 2018). O cultivo dessas espécies é pelo seu rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, capacidade de adaptação e rusticidade aos ambientes de cultivo, esportividade durante a pesca e grande qualidade de carne (Kubitza, 2004).

#### 3.2. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), conhecido popularmente no país como tambaqui, originário dos rios Amazonas e Orinoco (Sato, 2015), pertence a ordem dos characiformes (Guimarães e Martins, 2015). É a segunda maior espécie de escama da bacia Amazônica, podendo alcançar peso médio de 30 kg e comprimento de 1 m (Ribeiro et al., 2014; Rodrigues, 2016).

No cenário da produção nacional, o tambaqui se destaca na segunda colocação de espécie mais produzida, ficando atrás apenas da tilápia (*Oreochromis niloticus*), sendo a principal entre as espécies nativas (Peixe BR, 2025). De acordo com os dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, em 2023 foram produzidas 113,644 mil toneladas de tambaqui no país (IBGE, 2024).

Esta produtividade está relacionada às suas características zootécnicas. A espécie apresenta rusticidade, como a alta resistência a baixas concentrações de oxigênio (Silva et al., 2023) e adaptação a diferentes sistemas, crescimento rápido e bom valor no mercado (Morais e O'Sullivan, 2017).

Quanto ao seu hábito alimentar no ambiente natural, as larvas de tambaqui se alimentam de zooplanktons, passando a preda pequenos invertebrados durante o estágio de juvenil, e sementes e frutas durante toda a sua vida, se caracterizando como onívoro (Pires et al., 2018).

Por ser uma espécie originária de águas quentes, com temperaturas entre 25 e 32°C (Amanjás e Val, 2023), sua produção se concentra na região norte, e centro-oeste do país. Com grande capacidade de adaptação aos diferentes sistemas de produção (Morais e O'Sullivan, 2017), sua produção em sistemas de recirculação de água (RAS) pode ser uma forma de ampliar seu cultivo em todo o país (Boaventura et al., 2021; Santos et al., 2021; Silva et al., 2021). Através desse sistema, a temperatura e outros fatores importantes para a qualidade da água de cultivo podem ser controlados dentro dos valores recomendados para a espécie (Assis et al., 2020).

A boa adaptação do tambaqui no RAS permite que a espécie seja produzida em altas densidades de estocagem (Santos et al., 2020; Santos et al., 2021) mesmo que apresente uma heterogeneidade de tamanho sem explicação conhecida (Santos et al., 2021).

### **3.3. Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)**

A *Piaractus brachypomus*, chamada popularmente de pirapitinga no Brasil, também conhecida como paco, cachama blanca, morocoto, caranha e pacu de barriga vermelha, é uma espécie characiforme, nativa dos países sul-americanos. Pode ser encontrada facilmente nas bacias dos rios Amazonas, Tocantins, Araguaia (Boscolo et al., 2011) e Orinoco (Woynarovich, 1988). A terceira maior espécie de peixe de escama amazônico, a pirapitinga pode atingir até 88 cm e pesar 20 kg (Kubitza, 2004), sendo a única espécie do gênero *Piaractus* encontrada na bacia Amazônica (Ribeiro et al., 2016). Possui importância comercial nacional e em outros países sul-americanos como Colômbia, Venezuela e Peru (Vásquez-Torres, 2002), além de sua exportação para cultivo em países asiáticos como Índia (Kumar et al., 2018), e Tailândia (Xiong et al., 2015).

Trata-se de uma espécie com hábito alimentar herbívoro com tendência a frugívoro (Vásquez-Torres, 2005; Boscolo et al., 2011). Possui características interessantes para a produção comercial como rápido crescimento, rusticidade, adaptação a altas temperaturas, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, resistência a manejos e doenças (Chagas et al., 2005). Características essas que proporcionaram a produções de 1693,09 toneladas de pirapitinga no país em 2023 (IBGE, 2024). Possui características que facilitam sua comercialização, como a facilidade para descamar, possui dimensões de cabeça menores do que a tilápia e o tambaqui, o que facilita o processamento dos filés e aumenta o rendimento, além da coloração avermelhada na região opercular e peitoral chamam a atenção do consumidor (Ribeiro et al., 2016).

Quanto à reprodução, a pirapitinga atinge sua maturidade sexual entre 3 e 4 anos de idade pesando de 3 a 4 kg de peso vivo, além de ser um peixe migrador, que depende das épocas de cheias, para desova (Baldisseroto e Gomes, 2005). Já são encontrados trabalhos que mostram a capacidade de adaptação da pirapitinga ao RAS (Favero et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Favero et al., 2022; Ferreira et al., 2023; Porto et al., 2023). Poleo et al. (2011), observaram resultados positivos do cultivo da espécie em sistemas fechados em altas densidades de estocagem. Entretanto, ainda são necessários mais estudos que comprovem a eficiência da produção da *P. brachypomys* em altas densidades de estocagem no RAS.

### **3.4. Densidade de estocagem**

A determinação de densidades ótimas de estocagem é referida como quantidade ou biomassa de peixes que podem ser produzidos de forma eficiente em um espaço (Sousa et al., 2020). O ajuste adequado da densidade de estocagem pode levar a eficiência econômica e sua viabilidade no desenvolvimento da produção comercial. A densidade de estocagem é um fator crítico nas propriedades do setor aquícola (Refaey et al., 2022), pois afeta o desempenho dos peixes e o consumo de ração (Refaey et al., 2018; Wang et al., 2019), é capaz de desencadear respostas imunes e fisiológicas (Santos et al., 2021; Refaey et al., 2018) e influencia a uniformidade dos animais, além da viabilidade econômica do cultivo (Biswas et al., 2013; Santos et al., 2022).

Alguns fatores são peça chave para a determinação da taxa ótima de densidade de estocagem, como: espécie escolhida para cultivo (Magouz et al., 2019), sistema de produção implementado, idade ou tamanho dos peixes (North et al., 2006) e o foco da

produção. Por exemplo, para a produção de juvenis, onde a fase de cultivo é rápida e é possível fazer a classificação dos animais de maneira mais eficiente, a alta densidade de estocagem pode ser uma excelente forma de aumentar a lucratividade da produção. Um estudo realizado por Santos et al. (2022) demonstrou maior desempenho, sobrevivência e viabilidade econômica na larvicultura de tambaqui em alta densidade (180 larvas L<sup>-1</sup>) quando comparadas a densidades mais baixas (60 e 120 larvas L<sup>-1</sup>).

Problemas comportamentais, principalmente nas interações sociais são desencadeados quando a densidade de estocagem não é adequada, pois podem ser observadas relações de hierarquia, dominância e territorialismo (Carvalho et al., 2018). Esses comportamentos estão diretamente ligados a heterogeneidade de tamanho dos animais. A prevalência do comportamento de dominância desencadeia situações estressoras, da forma que os animais subordinados apresentam maiores índices de estresse do que os peixes dominantes (Fernandes e Volpato, 1993). Em contrapartida, Ribeiro et al. (2010) afirmaram que menores densidades de estocagem permitem maiores taxas de crescimento e sobrevivência, após observar diferentes densidades de estocagem de acaras-bandeira (*Pterophyllum scalare*) mantidos em policultivo com camarões da Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*).

Dessa forma as alterações nos processos fisiológicos e comportamentais devido ao espaço insuficiente disponível (Costa et al., 2019) resulta em maiores exigências de energia para sobrevivência e crescimento (Ghozlan et al., 2018). Como resultado, a energia para crescimento dos peixes é desviada para combater o estresse, resultando em piora na conversão alimentar (Lupatsch et al., 2010).

Em contraste, alguns autores relataram que o aumento das densidades de estocagem leva a melhores taxas de conversão alimentar, menor heterogeneidade de peixes e maior biomassa total (Salaro et al., 2003; Ayroza et al., 2011); portanto, determinam um maior retorno do investimento em estruturas e equipamentos (Abaho et al., 2020).

### **3.5. Cultivo em sistema de recirculação de água (RAS)**

A fundamentação do RAS trata-se de uma tecnologia aquícola que faz uso da reutilização da água de cultivo de organismos aquáticos (Íon et al., 2022). O sistema fechado operacional funciona com o tratamento dos resíduos, reduzindo a poluição dos efluentes a praticamente zero em comparação com os viveiros de cultivo tradicionais e os

tanques-rede, já que a água é tratada e reutilizada (Lima et al., 2019), sendo necessária a entrada de água nova no sistema para compensação da evaporação e em trocas parciais para retirada de nitrato excedente.

Para que o sistema consiga reciclar os nutrientes, são necessários filtros mecânicos e biológicos. O primeiro responsável pela retenção e remoção da matéria orgânica e o segundo pela remoção dos resíduos dissolvidos (Bardiola et al., 2018).

O RAS, além de ser um sistema sustentavelmente vantajoso, possibilitando um maior controle sobre o manejo de resíduos através da reciclagem de nutrientes realizada dos filtros do sistema e maior estabilidade dos parâmetros físicos e químicos relacionados a qualidade da água (temperatura, amônia, nitrito, nitrato, oxigênio dissolvido e pH), permitindo maior controle sobre o ambiente de cultivo (Dalsgaard et al., 2013).

Entretanto, a contribuição do RAS para a produção nacional de pescado ainda é baixa devido ao alto investimento necessário, dependência de energia elétrica, mão de obra qualificada para sua implementação e operação (Íon et al., 2022). Portanto, para que o produtor alcance a lucratividade utilizando a recirculação, deve ser adotada uma elevada densidade de estocagem, a fim de que a produção final gere renda superior aos custos gerados pelos investimentos (Fairchild e Howell, 2001).

Densidades de estocagem muito superiores à capacidade do sistema, ou que comprometam o comportamento natural da espécie, podem prejudicar o bem-estar dos organismos cultivados, elevando os níveis de estresse (Costa et al., 2019). Contudo, o controle sobre a qualidade de água, permitido pelo sistema de recirculação, atua como um ponto positivo (Íon et al., 2022) e este pode ser considerado uma ferramenta para manter o bem-estar dos peixes.

### **3.6. Cadeia Fisiológica do Estresse**

Uma das formas de definir o estresse é colocá-lo como um conjunto de reações a estímulos capazes de alterar o equilíbrio fisiológico ou homeostase (Urbinati et al., 2014; Urbinati et al., 2015). Essas respostas são desencadeadas como uma forma de adaptar e manter o organismo do animal pronto para situações de defesa e sobrevivência ao ambiente criado pelo estressor (Jerez-Cepa e Jarabo, 2021).

As respostas são classificadas em três níveis, primária também chamada de reação de alarme, resposta secundária e as respostas terciárias (Urbinati et al., 2014). De acordo com os autores Barton e Iwama (1991), as respostas primárias se iniciam na percepção do estresse pelo hipotálamo, até a liberação de catecolaminas e glicocorticoides por

células específicas das porções anteriores ou cefálicas dos rins; as reações secundárias são os mecanismos de ajuste fisiológico ativados pela liberação das catecolaminas e glicocorticoides, com o objetivo de retorno à homeostase; as terciárias são desencadeadas quando os mecanismos citados perdem a capacidade de adaptação e o organismo entra em exaustão. Essa última é percebida pela queda do crescimento, imunidade e reprodução, predispondo os animais à doenças e mortalidade.

A resposta ao estímulo estressor indica o nível de alteração, dependendo da intensidade e duração do estresse (Wendellar Bonga, 1997; Tort, 2011). Os dois primeiros tipos de respostas são desencadeados pelo estresse agudo, um estressor de curta duração, como um manejo rápido, ou uma situação de fuga, por exemplo, enquanto a partir do momento em que o organismo entra em exaustão, são enquadrados como causadores agentes estressores crônicos (Urbinati et al., 2014), como uma densidade de estocagem mal dimensionada.

Uma forma de mensurar o estresse nos peixes antes que eles cheguem a apresentar as respostas terciárias, é analisar e avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos que são alterados durante os mecanismos de adaptação das respostas secundárias.

As catecolaminas regulam as funções cardiorrespiratórias a fim de aumentar a disponibilidade energética celular, através do aumento da permeabilidade branquial e do fluxo sanguíneo, dessa forma, o número de eritrócitos são aumentos (Urbinati et al., 2014; Urbinati et al., 2015). A glicose plasmática também sofre influência da liberação aumentada de catecolaminas na corrente sanguínea e maior quebra do glicogênio hepático. Seus níveis altos são mantidos pelo cortisol, um glicocorticoide, sendo esse também um parâmetro que também pode ser analisado (Wenderlaar Bonga, 2011; Urbinati et al., 2014).

A secreção de hormônios tireoidianos também é afetada pelo estresse ocasionada pela alta densidade (Fátima et al., 2018), assim como o metabolismo lipídico e proteico para suprir a alta demanda energética derivada das respostas secundárias (Costas et al., 2008).

Em estudo com alevinos de bagres do canal (*Ictalurus punctatus*), com peso inicial médio de 40,6 g, produzidos em sistema de recirculação em três diferentes densidades (2, 6 e 12 kg m<sup>-3</sup>) apresentaram diferenças no desempenho zootécnico e fisiológicos (Reafey et al., 2018). A alta densidade em questão elevou os níveis de glicose, colesterol, triglicerídeos e HDL, além de suprimir a secreção de hormônios tireoidianos dos bagres. Desta forma, os autores enfatizaram sobre o efeito estressor da alta densidade de

estocagem nestes animais. Densidades de estocagem de 7, 12 e 24 kg m<sup>-2</sup> não alteraram os níveis de cortisol, leucócitos, glicose, triglicerídeos, proteína plasmática total e hematócrito em exemplares de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*), mantidos em RAS, da mesma forma que o desempenho zootécnico também não foi alterado (Andrade et al., 2015), com resultados contrários aos resultados apresentados anteriormente. Logo, as diferenças entre os resultados dos dois estudos corroboram com Magouz et al. (2019), em que a espécie demonstra ser um fator que exige uma análise crítica para estabelecer a densidade de estocagem ideal.

O bem-estar de tambaquis, produzidos em RAS também foi afetado conforme a densidade de estocagem era aumentada (25, 125, 225 e 325 peixes L<sup>-1</sup>) ocorrendo alterações no perfil leucocitário (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos) a partir da densidade de 225 peixe L<sup>-1</sup>, mesmo que os parâmetros de crescimento dos juvenis tenham sido semelhantes (Costa et al., 2019). Esses resultados podem inferir que as respostas fisiológicas ao estresse acontecem de maneira independente umas das outras. Nesse mesmo trabalho, a qualidade de água foi afetada com o aumento da densidade de estocagem, principalmente em relação a amônia, pH, oxigênio dissolvido e condutividade. Tal resultado demonstra que os filtros do RAS não foram suficientes para reciclar todos os resíduos liberados na água. Dessa forma, podemos inferir que sistemas altamente adensados necessitam de filtros bem dimensionados, para que sejam capazes de reciclar os nutrientes contidos no ambiente e manter a vantagem do uso do sistema de recirculação.

Parâmetros hematológicos alterados do tambaqui (*C. macropomum*) também foram observados por Santos et al. (2021), após cultivo em diferentes densidades de estocagem (0,5; 1,0 e 1,6 kg m<sup>-3</sup>). Segundo os autores, as densidades mais altas elevaram os níveis de hematócrito e hemoglobina. Em um segundo momento do mesmo experimento, com densidades iniciais ainda mais altas (1,5, 3 e 4,5 kg m<sup>-3</sup>), além dos parâmetros hematológicos, a bioquímica sanguínea também foi afetada com níveis elevados de glicose e triglicerídeos nas duas maiores densidades.

### **3.7. Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo**

O sistema antioxidante é de suma importância para manter o equilíbrio aeróbico dos organismos. Responsável por inibir ou reduzir os prejuízos causados pela produção de radicais livres, são ativados mecanismos de prevenção, varredura, e reparo, que

possuem as funções de impedir a formação de radicais livres, inibir a ação desses radicais ou reparar os tecidos danificados (Birben et al., 2012).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo natural da respiração aeróbica. EROs são moléculas derivadas do oxigênio que podem ter atividades oxidantes, perdendo elétrons, ou redutoras, ganhando elétrons (Barbosa et al., 2010). EROs são divididos em compostos não radicais e radicais livres, essas são moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, que facilita a transferência do elétron; já os primeiros não apresentam elétrons livres nos orbitais externos, entretanto ainda podem reagir com outras moléculas, além de apresentarem menos estabilidade que os radicais livres (Martelli e Nunes, 2014).

O sistema de defesa antioxidante é dividido em dois grupos: não enzimáticos e enzimáticos. As enzimas antioxidantes de maior destaque para os peixes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST) e os não enzimáticos de destaque são a glutathione reduzida (GSH) e as vitaminas C e E (Abhijith et al., 2016).

Quando ocorre o comprometimento do sistema antioxidante pode gerar desequilíbrio pró-oxidante nas células entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a sua neutralização pelos mecanismos do sistema de defesa antioxidante (Barbosa et al., 2010), aumentando o risco de dano no DNA (Marnett, 1999), nas proteínas celulares (Halliwell e Chirico, 1993) e até nos lipídeos (Esterbauer e Cheeseman, 1990). Esse desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo.

A SOD tem como atividade catalisar a transformação do radical superóxido  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , sendo esse degradado pela CAT ou GPx (Ribeiro et al., 2005).

As enzimas CAT e GPx evitam a formação do radical hidroxil, através da conversão e remoção do peróxido de hidrogênio e superóxido (Yu, 1994). A CAT converte  $H_2O_2$  em oxigênio e água, entretanto sua eficiência é maior quando  $H_2O_2$  se encontra em grandes quantidades no meio intracelular, caso contrário a GPx apresenta maior eficiência (Hermes-Lima, 2004). A formação de água e remoção do  $H_2O_2$  pela GPx ocorre através da conversão da GSH em glutathione oxidada (GSSH) (Yu, 1994).

A segunda fase do mecanismo de defesa antioxidante tem como principal enzima a GST, que tem função de desintoxicação através de reações de conjugação na presença de GSH (Hermes-Lima, 2004; Limón- Pacheco e Gonsebatt, 2009). A GSH se envolve na limpeza de toxinas, transporte de aminoácidos, degradação de peróxidos endógenos e

produção de moléculas bioativas (Stamler e Slivka, 1996). A GSH é transformada em nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) pela glutatona redutase (GR) (Bouraoui, 2008).

A ativação do mecanismo de defesa antioxidante pode ser ilustrada pela Figura 1:

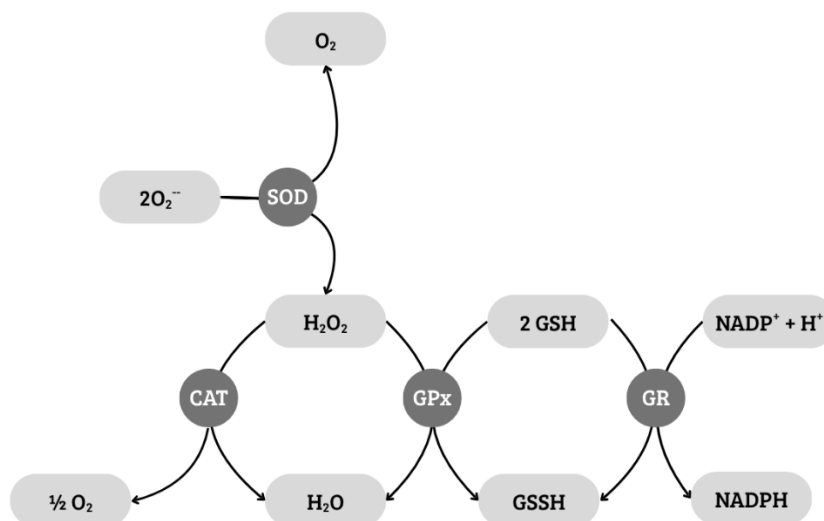


Figura 2. Mecanismo de defesa antioxidante. Adaptado de Hsueh et al., 2022

Vários fatores podem desencadear o estresse oxidativo como hipóxia, mudanças na temperatura e salinidade (Chowdhury e Saikia, 2020), a presença de metais pesados, liberação de pesticidas e produtos petrolíferos na água (Lushchak, 2011), além do manejo, transporte, densidade de estocagem e desnutrição (Harper e Wolf, 2009).

### 3.8. Sistema Purinérgico

O ATP, trifosfato de adenosina foi identificado a princípio como um substrato energético para o metabolismo, entretanto a molécula também apresenta funções de sinalização de condições fisiológicas anormais ou patológicas (Burnstock, 2006; Sávio et al., 2018). Essa função foi descrita em 1972 por Burnstock (1972) e a partir desse momento, iniciaram-se os trabalhos que relatam a neurotransmissão e neuromodulação do sistema purinérgico (Burnstock, 1978; Fredholm et al., 2001; Burnstock, 2008).

Em condições fisiológicas normais, a presença do ATP no meio extracelular é mínima, até insignificante (Burnstock e Knight, 2018). A sinalização purinérgica se inicia com a liberação do ATP e ADP fora da célula, com atividades pró ou anti-inflamatórias (Zimmerman, 2000; Sévigni et al., 2015; Sávio et al., 2018; Li et al., 2020). A

sinalização tem o objetivo de reduzir o risco de danos irreversíveis a tecidos saudáveis (Di-Virgilio et al., 2020) em situações patológicas ou em adversidades fisiológicas (Sávio et al., 2018). Após sua liberação extracelular, o ATP, sobre ação das ectonucleotidases que fazem sua degradação em difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (Ado) (Bonan et al., 2000; Robson et al., 2006; Baldissera et al., 2018).

A adenosina atua como um neuromodulador na regulação de mecanismos importantes do sistema nervoso central (Maximino et al., 2011; Sperlagh et al., 2012), mas diferente do ATP não é armazenado em vesículas ou liberada por exocitose (Shen e Chen, 2009).

Os mecanismos de sinalização se iniciam com a hidrólise do ATP e ADP feita pela nucleosídeo trifosfato-hidrolase (NTPDase) em ADP e AMP na presença de íons de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  (Bigonnesse et al., 2004; Rosemberg et al., 2010). O AMP passa pela 5'nucleotidase que o hidrolisa em Ado, enzima também responsável pela regulação dos níveis de adenosina extracelular (Bonan, 2012). A enzima adenosina desaminase (ADA) entra em ação na presença de altos níveis de Ado fazendo sua desaminação em inosina (Zimmerman, 2000; Maier et al., 2005).

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABAHO, I.; ZAABWE, T.; IZAARA, A.; KASIGWA, H. N.; MUSADE, N.; BYENKYA, S.; NKAMBO, M.; BAGUMA, S. D.; HAFASHIMANA, D. L. N.; EFITRE, J. Effect of Stocking Density on Growth and Survival of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) under Cage Culture in Lake Albert, Uganda. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, v. 12, p. 26-35, 2020. DOI: 10.5897/IJFA2018.0671.
- ABHIJITH, B. D.; RAMESH, M.; POOPAL, R. K. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, v. 77, p. 31-40, 1 out. 2016.
- ANDRADE, T.; AFONSO, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; OLIVA-TELES, A.; DE LAS HERAS, V.; MANCERA, J. M.; SERRADEIRO, R.; COSTAS, B. Evaluation of Different Stocking Densities in a Senegalese Sole (*Solea senegalensis*) Farm: Implications for Growth, Humoral Immune Parameters and Oxidative Status. *Aquaculture*, v. 438, p. 6-11, 2015. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.034.
- ASSIS, Y. P. A. S.; DE ASSIS PORTO, L.; DE MELO, N. F. A. C.; PALHETA, G. D. A.; LUZ, R. K.; FAVERO, G. C. Feed Restriction as a Feeding Management Strategy in *Colossoma macropomum* Juveniles under Recirculating Aquaculture System (RAS). *Aquaculture*, v. 529, p. 735689, 2020. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735689.
- AYROZA, L. M. da S.; ROMAGOSA, E.; AYROZA, D. M. M. de R.; SCORVO FILHO, J. D.; SALLES, F. A. Costs and Profitability of Juvenile Nile Tilapia Breeding Using Different Stocking Densities in Net Cages. *Journal of Animal Science*, v. 40, p. 231-239, 2011. DOI: 10.1590/S1516-35982011000200001.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DESCOVI, S. N.; et al. Purinergic signalling as a potential pathway for trichlorfon induced-inflammation and impairment of the immune response using freshwater silver catfish. *Aquaculture*, v. 497, p. 91–96, 2018.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005. 470 p.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. de; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARDIOLA, M.; BASURKO, O. C.; PIEDRAHITA, R.; HUNDLEY, P.; MENDIOLA, D. Energy use in recirculating aquaculture systems (RAS): a review. *Aquacultural Engineering*, v. 81, p. 57–70, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2018.03.003.

- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 1, p. 3–26, 1991. DOI: 10.1016/0959-8030(91)90019-G.
- BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S. A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S. C.; FERNANDES, M. J. G.; et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry*, v. 43, p. 5511–5519, 2004.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.
- BISWAS, G.; GHOSHAL, T. K.; NATARAJAN, M.; THIRUNAVUKKARASU, A. R.; SUNDARAY, J. K.; KAILASAM, M.; DE, D.; SUKUMARAN, K.; KUMAR, P.; PONNIAH, A. G. Effects of stocking density and presence or absence of soil base on growth, weight variation, survival and body composition of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch) fingerlings. *Aquaculture Research*, v. 44, p. 1266–1276, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03132.x.
- BOAVENTURA, T. P.; CORTEZZI, P. P.; SANTOS, F. A. C.; FERREIRA, A. L.; FAVERO, G. C.; PALHETA, G. D. A.; DE MELO, N. F. A. C.; LUZ, R. K. Cultivation of juvenile *Colossoma macropomum* in different colored tanks in recirculating aquaculture system (RAS): effects on performance, metabolism and skin pigmentation. *Aquaculture*, v. 532, p. 736079, 2021. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.736079.
- BONAN, C. D. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 11, p. 739–750, 2012.
- BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A.; FREITAS, J. M. A.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A. Nutrição de peixes nativos. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 40, p. 145–154, 2011.
- BOURAOUI, Z. Acute effects of cadmium on liver phase I and phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 2008.
- BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: STRAUB, R. W.; BOLIS, L. (Ed.). *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. New York: Raven Press, 1978. p. 107–118.
- BURNSTOCK, G. Histological review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 27, p. 166–176, 2006.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, v. 24, p. 509–581, 1972.

- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 7, p. 575–590, 2008.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumor progression. *Purinergic Signalling*, v. 14, p. 1–18, 2018.
- CARVALHO, T. B.; SOUZA, E. C. M.; DA SILVA, J. P.; VILLACORT CORREA, M. A. Effect of body size heterogeneity on the aggressive behavior of larvae of matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characiformes, Bryconidae). *Acta Amazonica*, v. 48, p. 304–310, 2018. DOI: 10.1590/1809-4392201800541.
- CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; JÚNIOR, H. M.; ROUBACH, R.; LOURENÇO, J. N. P. Desempenho de tambaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 40, n. 8, p. 833–835, 2005.
- CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Oxidative stress in fish: a review. *Journal of Scientific Research*, v. 12, n. 1, p. 145–160, 2020.
- COSTA, O. T. F.; DIAS, L. C.; MALMANN, C. S. Y.; FERREIRA, C. A. de L.; DO CARMO, I. B.; WISCHNESKI, A. G.; SOUSA, R. L.; CAVERO, B. A. S.; LAMEIRAS, J. L. V.; DOS SANTOS, M. C. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture*, v. 499, p. 260–268, 2019. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.040.
- COSTAS, B.; ARAGÃO, C.; MANCERA, J. M.; DINIS, M. T.; CONCEIÇÃO, L. E. C. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles: crowding stress and amino acid metabolism in Senegalese sole. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 1–9, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01845.x.
- DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. C. C. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. New York: Scientific Publications of the American Museum of Natural History, 2019. 163 p. (n. 431).
- DALSGAARD, J.; LUND, I.; THORARINSDOTTIR, R.; DRENGSTIG, A.; ARVONEN, K.; PEDERSEN, P. B. Farming different species in RAS in Nordic countries: current status and future perspectives. *Aquacultural Engineering*, v. 53, p. 2–13, 2013. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2012.11.008.

DI VIRGILIO, F.; SARTI, A. C.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, v. 318, n. 5, p. C832–C835, 2020.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, New York, v. 186, p. 407–421, 1990.

Fairchild, E. A.; Hunting-Howell, W. Optimal Stocking Density for Juvenile Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 32, n. 3, p. 300-308. 2007. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2001.tb00453.x

FATIMA, S.; IZHAR, S.; USMAN, Z.; RASHID, F.; KANWAL, Z.; JABEEN, G.; LATIF, A. A. Effects of high stocking density on condition factor and profile of free thyroxine and cortisol in *Catla catla* (Hamilton, 1822) and *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 18, 2018. DOI: 10.4194/1303-2712-v18\_1\_25.

FAVERO, G. C.; DOS SANTOS, F. A. C.; DA COSTA JÚLIO, G. S.; FERREIRA, A. L.; BONIFÁCIO, C. T.; PALHETA, G. D. de A.; LUZ, R. K. Effects of short feed restriction cycles in *Piaractus brachypomus* juveniles. *Aquaculture*, v. 536, p. 736465, 2021.

FAVERO, G. C.; DOS SANTOS, F. A. C.; DA COSTA JÚLIO, G. S.; FERREIRA, A. L.; BONIFÁCIO, C. T.; PALHETA, G. D. de A.; LUZ, R. K. Effects of water temperature and feeding time on growth performance and physiological parameters of *Piaractus brachypomus* juveniles. *Aquaculture*, v. 548, p. 737716, 2022.

FERNANDES, E. M.; DE ALMEIDA, L. C. F.; HASHIMOTO, D. T.; LATTANZI, G. R.; GERVAZ, W. R.; LEONARDO, A. F.; NETO, R. V. R. Survival of purebred and hybrid Serrasalminidae under low water temperature conditions. *Aquaculture*, v. 497, p. 97-102, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.030

FERNANDES, M. D. O.; VOLPATO, G. L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. *Physiology & Behavior*, v. 54, p. 319–323, 1993. DOI: 10.1016/0031-9384(93)90117-X.

FERREIRA, A. L.; BONIFÁCIO, C. T.; DE SOUZA E SILVA, W.; DOS SANTOS, F. A. C.; DA COSTA JÚLIO, G. S.; FAVERO, G. C.; LUZ, R. K. Anesthesia with eugenol and menthol for *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): induction and recovery times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. *Aquaculture*, v. 544, p. 737076, 2021.

- FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, F. A. C.; BONIFÁCIO, C. T.; DA COSTA J., G. S.; DE SOUZA E SILVA, W.; FAVERO, G. C.; LUZ, R. K. Effects of live prey concentration, salinity, and weaning age on larviculture of *Piaractus brachypomus* reared in a recirculating aquaculture system. *Tropical Animal Health and Production*, v. 55, n. 2, p. 99, 2023.
- GHOZLAN, A.; ZAKI, M. A.; ESSA, M. A.; GABER, M. M.; EBIARY, E. H.; NOUR, A. Effect of stocking density on growth performance, production trait, food utilization and body composition, of meagre (*Argyrosomus regius*). *World Journal of Engineering and Technology*, v. 6, p. 37–47, 2018. DOI: 10.4236/wjet.2018.63B005.
- GUIMARÃES, I. G.; MARTINS, G. P. Nutritional requirement of two Amazonian aquacultured fish species, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): a mini review. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 31, p. 57–66, 2015. DOI: 10.1111/jai.12976.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 57, p. 715–725, 1993.
- HARPER, C.; WOLF, J. C. Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR Journal*, v. 50, n. 4, p. 387–396, 2009.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (ed.). *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 319–368.
- HSUEH, Y.J.; CHEN, Y.N.; TSAO, T.T.; CHENG, C.M.; WU, W.C; CHEN, H.C. The Pathomechanism Antioxidant Biomarkers, and Treatment of Oxidative Stress-Related Eye Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, e1255, 2022. DOI: 10.3390/ijms23031255.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Produção da Pecuária Municipal 2023*. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/16459>. Acesso em: 5 abr. 2025.
- ION, I. V.; POPESCU, F.; COMAN, G.; FRĂȚIȚA, M. Heat requirement in an indoor recirculating aquaculture system. *Energy Reports*, v. 8, p. 11707–11714, 2022. DOI: 10.1016/j.egy.2022.08.245.
- JEREZ-CEPA, I.; RUIZ-JARABO, I. Physiology: An Important Tool to Assess the Welfare of Aquatic Animals. *Biology*, v. 10, e61. 2021. DOI: 10.3390/biology10010061

- KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu, e de outros peixes redondos. Laranjeiras: Panorama da Aquicultura, 2004. v. 82, n. 14, p. 27–39.
- LI, Shuo; CHEN, Xiaoli; LI, Jiafang; WANG, Linna; DONG, Chengdong; QIAO, Yongming; ZHANG, Huijuan; XU, Qi; ZHANG, Ying; ZHANG, Yisheng. Extracellular ATP is a potent signaling molecule in the activation of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) innate immune responses. *Innate Immunity*, v. 26, n. 5, p. 413–423, 2020.
- LIMA, J. de F.; MONTAGNER, D.; DUARTE, S. S.; YOSHIOKA, E. T. O.; DIAS, M. K. R.; TAVARES-DIAS, M. Recirculating system using biological aerated filters on tambaqui fingerling farming. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, e00294, 2019. DOI: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.00294.
- LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, v. 674, p. 137–147, 2009.
- LUPATSCH, I.; SANTOS, G. A.; SCHRAMA, J. W.; VERRETH, J. A. J. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v. 298, p. 245–250, 2010. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.007.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan. 2011.
- MAGOUZ, F.; KHALAFALLA, M.; MOUSTAFA, E.; SADEK, A. The impact of different stocking densities and dietary protein levels on the performance of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. *Scientific Veterinary Research*, v. 56, 2019. DOI: 10.26873/SVR-761-2019.
- MAIER, S. A.; GALELLIS, J. R.; McDERMID, H. E. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *Journal of Molecular Evolution*, v. 61, p. 776–794, 2005.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, v. 424, p. 83–95, 1999.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, v. 66, n. 3, p. 54–57, set. 2014.
- MAXIMINO, C.; LIMA, M. G.; OLIVERA, K. R.; PICANÇO-DINIZ, D. L.; HERCULANO, A. M. Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety

- and arousal in zebrafish. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 109, p. 203–207, 2011.
- MORAIS, I. de S.; O’SULLIVAN, F. L. de A. *Biologia, habitat e cultivo do tambaqui Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). *Scientia Amazonia*, v. 6, p. 81–93, 2017.
- NORTH, B. P.; TURNBULL, J. F.; ELLIS, T.; PORTER, M. J.; MIGAUD, H.; BRON, J.; BROMAGE, N. R. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 255, p. 466–479, 2006. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.01.004.
- PEIXE, B. R. *Anuário Brasileiro da Piscicultura. Associação Brasileira da Piscicultura: Brasil*, 2023.
- PIRES, L. B.; CORRÊA FILHO, R. A. C.; SANCHES, E. A.; ROMAGOSA, E.; SILVA, T. G. D.; RECH, S.; STREIT, D. P.; POVH, J. A. *Colossoma macropomum* females can reproduce more than once in the same reproductive period. *Animal Reproduction Science*, v. 196, p. 138–142, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.07.006.
- POLEO, Germán; ARANBARRIO, José Vicente; MENDOZA, Lismen; RAMOS, Jorge; REY, Marcial. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 4, p. 429–437, 2011.
- PORTO, L. de A.; ASSIS, Y. P. A. S.; AMORIM, M. P. S.; MARTINS, D. de J.; FREITAS, M. L.; MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M. Physiological responses to long fasting followed by refeeding in juveniles of pirapitinga, *Piaractus brachyomus*. *Acta Amazonica*, v. 53, n. 3, p. 187–195, 2023.
- REFAEY, M. M.; LI, D.; TIAN, X.; ONXAYVIENG, K.; TANG, R. Physiological responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) reared at different stocking densities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, v. 557, p. 738329, 2022. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738329.
- REFAEY, M. M.; LI, D.; TIAN, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, X.; LI, L.; TANG, R. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, v. 492, p. 73–81, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.003.
- RIBEIRO, F. de A. S.; JORGE, P. H.; FERNANDES, J. B. K.; SAKOMURA, N. K. Densidade de estocagem para produção de acará-bandeira em viveiros escavados em policultivo com camarão-da-Amazônia. *Revista Caatinga*, v. 23, p. 129–134, 2010.
- RIBEIRO, F. M.; FREITAS, P. V. D. X.; SANTOS, E. O.; SOUSA, R. M.; CARVALHO, T. A.; ALMEIDA, E. M.; SANTOS, T. O.; COSTA, A. C. Alimentação e nutrição de

pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*): revisão. Pubvet, v. 10, p. 873–882, 2016.

RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; FELDBERG, E. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalminidae species (Characiformes). Genetics and Molecular Biology, v. 37, p. 46–53, 2014. DOI: 10.1590/S1415-47572014000100009.

RIBEIRO, S. M. R.; et al. The formation and effects of reactive oxygen species in the biological environment. Bioscience Journal, v. 21, p. 133–149, 2005.

ROBSON, S. C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function relationships and pathophysiological significance. Purinergic Signalling, v. 2, p. 409–430, 2006.

RODRIGUES, A. P. O. Nutrition and feeding of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 40, p. 135–145, 2014.

ROSEMBERG, D. B.; LANGONE, A. S.; SPINELLI, J. T.; PEREIRA, T. C.; DIAS, R. D.; DIAS, R. D.; SOUZA, D. O.; BONAN, C. D.; BOGO, M. R. NTPDase family in zebrafish: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. Comparative Biochemistry and Physiology B, v. 155, p. 230–240.

SALARO, A. L.; LUZ, R. K.; NOGUEIRA, C. C. C. de B.; REIS, A.; SAKABE, R.; LAMBERTUCCI, D. M. Effect of two stocking rates on the trairão (*Hoplias cf. lacerdae*) fingerlings performance. Journal of Animal Science, v. 32, p. 1033–1036, 2003. DOI: 10.1590/S1516-35982011000200001.

SÁNCHEZ, P.; AMBROSIO, P. P.; FLOS, R. Stocking density affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) growth independently of size dispersion, evaluated using an individual photo-identification technique. Aquaculture Research, v. 44, p. 231–241, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.03026.x.

SANTOS, F. A. C. dos; BOAVENTURA, T. P.; JULIO, G. S. da C.; CORTEZZI, P. P.; FIGUEIREDO, L. G.; FAVERO, G. C.; PALHETA, G. D. de A.; DE MELO, N. F. A. C.; LUZ, R. K. Growth performance and physiological parameters of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system (RAS): Importance of stocking density and classification. Aquaculture, v. 534, p. 736274, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736274>.

SANTOS, F. A. C. dos; JULIO, G. S. da C.; BATISTA, F. S.; MIRANDA, L. N. L.; PEDRAS, P. P. da C.; LUZ, R. K. High stocking densities in the larviculture of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system: Performance, survival

and economic viability. *Aquaculture*, v. 552, p. 738016, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738016>.

SATO, L. S. Indução à triploidia no tambaqui *Colossoma macropomum*, pacu *Piaractus mesopotamicus* e o respectivo híbrido tambacu. 2015. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2015.

SAVIO, L. E. B.; DE ANDRADE MELLO, P.; DA SILVA, C. G.; CORREA, G.; DE FREITAS FERNANDES, M.; SILVA, C. L.; OLIVEIRA, D. L.; SILVA, C. L.; SILVA, C. L.; KROSTINA, M. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: Angel or demon? *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, p. 52, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>.

SÉVIGNY, J.; MARTÍN-SATUÉ, M.; PINTOR, J. Purinergic signalling in immune system regulation in health and disease. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, n. 1, p. 106863, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/106863>.

SHEN, H.Y.; CHEN, J.F. Adenosine A(2A) receptors in psychopharmacology: Modulators of behavior, mood and cognition. *Current Neuropharmacology*, v. 7, p. 195–206, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2174/157015909789152164>.

SILVA, S. dos S.; NEVES, L. do C.; FAVERO, G. C.; DA SILVA, H. N. P.; BALDISSEROTTO, B.; PALHETA, G. D. de A.; DE MELO, N. F. A. C.; LUZ, R. K. Oxidative stress in juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*) after different periods of air exposure. *Aquaculture*, v. 575, p. 739740, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739740>.

SILVA, T. B. F.; SILVA, R. R. da S.; PINTO, F. E. D. N.; SILVA-MATOS, R. R. S. de; CORDEIRO, K. V.; PEREIRA, A. M.; FREITAS, J. R. B.; LOPES, J. M. Criação de tambaqui associado à hidroponia em sistema de recirculação de água. *Research, Society and Development*, v. 9, p. e543997543, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7543>.

SILVA, W. de S; FERREIRA, A. L.; NEVES, L. do C.; FERREIRA, N. S.; PALHETA, G. D. de A.; TAKATA, R.; LUZ, R. K. Effects of stocking density on survival, growth and stress resistance of juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in a recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture International*, v. 29, p. 609–621, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00647-z>. Idioma:

SILVA-NETA, M. G.; LIMA, M. S.; BATISTA, V. F.; SOUSA, G. S.; BASTOS, M. V. S.; Sousa, V. C.; VEIGA, M. S.; SILVA, M. F.; BOMFIM, M. A. D.; RIBEIRO, F. B.;

- MELO, J. F. B.; MARCHÃO, R. S. Exigências de aminoácidos essenciais para peixes redondos. *Ciências Veterinárias: Patologias, saúde e produção animal*, v. 2, p. 1-15.
- SOUSA, R. M.; SILVA, R. R. dos S.; DOS SANTOS, A. S.; MAGALHÃES, J. A.; FOGAÇA, F. H. dos S.; LOPES, J. M. Tambatinga juveniles performance in a recirculation aquaculture system with different stocking densities. *Research, Society and Development*, v. 9, p. e178953317, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3317>.
- SPERLAGH, B.; CSOLLE, C.; ANDO, R. D.; HASSANIAN, S.; HULEATT, P.; SZUCS, D.; VIZLER, C.; HASKO, G. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacologia Hungarica*, v. 14, n. 4, p. 231–238, 2012.
- STAMLER, J. S.; SLIKVA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, v. 54, p. 1–30, 1996.
- TORT, L. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 35, p. 1366–1375, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.
- URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; BILLER-TALAHASHI, J. D. Estresse e sistema imune em peixes. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.(orgs.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p. 87–105.
- URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; SERRA, M.; WOLKERS, C. P. B.; SABIONI, R. E. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. In: TAVARES-DIAS, Marcos; MARIANO, Wagner S. (orgs.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. 2. ed. São Carlos: Editora Pedro & João, 2015. p. 1–35.
- VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12164>.
- VÁSQUEZ-TORRES, W. A pirapitinga: reprodução e cultivo. In: BALDISSEROTTO, Bernardo; GOMES, Luiz Carlos (orgs.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 203–224.
- VÁSQUEZ-TORRES, W.; PEREIRA, M.; ARIAS-CASTELLANOS, V. Estudos para composição de uma dieta referência semipurificada para avaliação de exigências nutricionais em juvenis de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 1, p. 283–292, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000100037>.
- WANG, Y.; CHI, L.; LIU, Q.; XIAO, Y.; MA, D.; XIAO, Z.; XU, S.; LI, J. Effects of stocking density on the growth and immunity of Atlantic salmon *Salmo salar* reared in

recirculating aquaculture system (RAS). *Journal of Oceanology and Limnology*, v. 37, p. 350–360, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00343-019-7350-7>.

WENDELAAR BONGA, S. E. Hormone response to stress. In: FARREL, Anthony P. et al. (eds.). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. London: Elsevier Academic Press Inc., 2011. p. 1515–1523.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v. 77, p. 591–625, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>. Idioma: Inglês.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos. Brasília: Ministério da Irrigação e CODEVASF, 1988. 68 p.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, v. 74, p. 139–162, 1994.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 362, p. 299–309, 2000






## **5. ARTIGO I**

Artigo publicado em 30 de dezembro de 2024 pela revista FISHES

DOI: [10.3390/fishes9010019](https://doi.org/10.3390/fishes9010019)

## Article

# Tambaqui Production at Different Stocking Densities in RAS: Growth and Physiology

Imaculada de Moraes Carvalho Ananias , Sidney dos Santos Silva , Fábio Aremil Costa dos Santos , André de Sena Souza, Thamar Bentivole Magalhães, Pedro Alves Ribeiro Reis, Gisele Cristina Favero and  Ronald Kennedy Luz \* 

Laboratório de Aquicultura, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; imaculada\_carvalho@hotmail.com (I.d.M.C.A.); sidneysantos2509@gmail.com (S.d.S.S.); fabioaremil@gmail.com (F.A.C.d.S.); and-senas@hotmail.com (A.d.S.S.); thamarabentivole@gmail.com (T.B.M.); pedrocool17@gmail.com (P.A.R.R.); giselefav82@yahoo.com.br (G.C.F.)

\* Correspondence: luzrk@vet.ufmg.br

**Abstract:** Stocking densities were evaluated for the rearing tambaqui in an RAS system. Experiment 1 used juveniles weighing 0.54 g at the following densities for 15 days:  $D_{0.3}$ —0.3;  $D_{0.6}$ —0.6; and  $D_{0.9}$ —0.9  $\text{kg m}^{-3}$ . Experiment 2 used juveniles weighing 8.22 g at the following densities for 75 days:  $D_{0.8}$ —0.8;  $D_{1.2}$ —1.2; and  $D_{1.6}$ —1.6  $\text{kg m}^{-3}$ . Experiment 3 used juveniles weighing 142.18 g at the following densities for 75 days:  $D_2$ —2;  $D_4$ —4 and  $D_6$ —6  $\text{kg m}^{-3}$ . In Experiment 1, density did not influence performance ( $p > 0.05$ ), with the exception of biomass, which was greatest in  $D_{0.9}$  ( $p < 0.05$ ). In Experiment 2, final weight, weight gain and daily weight gain were highest for  $D_{0.8}$  ( $p < 0.05$ ), as was triglycerides ( $p < 0.05$ ), whereas biomass increased with increasing density ( $p < 0.05$ ). In Experiment 3, weight, weight gain and daily weight gain were greater for  $D_2$  and  $D_4$  ( $p < 0.05$ ), while final biomass was lowest for  $D_2$  ( $p < 0.05$ ). Hemoglobin was lower for  $D_4$  and  $D_6$  ( $p < 0.05$ ), while cholesterol and glucose levels were higher for  $D_2$  and  $D_6$  ( $p < 0.05$ ). *Colossoma macropomum* demonstrated adaptive capacity for reared in RAS at high stocking densities.

**Keywords:** biomass; stress; hematology; somatic indices

**Key Contribution:** *Colossoma macropomum* showed satisfactory performance when reared in RAS at different densities, indicating the species can be reared with at high stocking densities with minimal influences on physiological parameters and the maintenance of well-being and productivity.



**Citation:** Ananias, I.d.M.C.; Silva, S.d.S.; Santos, F.A.C.d.; Souza, A.d.S.; Magalhães, T.B.; Reis, P.A.R.; Favero, G.C.; Luz, R.K. Tambaqui Production at Different Stocking Densities in RAS: Growth and Physiology. *Fishes* **2024**, *9*, 19.

<https://doi.org/10.3390/fishes9010019>

Academic Editor: Amit Kumar Sinha

Received: 25 November 2023

Revised: 24 December 2023

Accepted: 28 December 2023

Published: 30 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The determination of stocking densities refers to the quantity or biomass of fish that can be efficiently produced in a given space [1]. It is important to evaluate the optimal density for optimizing the rearing of any species [2], since profitability and productivity are directly related to this aspect of management [2,3]. Fish behavior can also benefit from appropriate stocking density, such as for species that live in schools [4] and to avoid aggressiveness and the formation of individual territories [5]. Therefore, appropriate stocking density can promote aquaculture development [6].

However, stocking density is still a critical factor in properties of the aquaculture sector [7], as it can affect fish performance and feed consumption [8,9], immune and physiological responses [8,10] and animal uniformity, in addition to the economic viability of rearing [11,12]. The use of inadequate densities can trigger behavioral problems [13] and physiological changes due to stress [14,15]. As a result, energy for fish growth is diverted to stress reduction, resulting in a worsening of feed conversion [14]. In contrast, some authors have reported that increased stocking densities lead to better feed conversion rates, lower fish heterogeneity and higher total biomass [16,17], thus determining greater returns on investments in structure and equipment. Studies of some species, such as the Asian seabass (*Lates calcarifer*) [18] and the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [9], have shown that low densities provide better growth rates. Thus, there is an evident need for studies on stocking densities for different species.

Another obstacle to the use of high densities is the worsening of water quality for rearing, which increases mortality and reduces growth [19]. However, this worsening of water quality can be minimized in a recirculating aquaculture system (RAS), since one of its

greatest advantages is water quality control and waste recycling [20].

*Colossoma macropomum*, a native species of the Amazon Basin [21], is the second most produced fish species in Brazil [22] due to its favorable rearing characteristics [23]. Recent studies have shown that the species offers adaptability to RAS in different growth phases [10,12,24–26], allowing the expansion of its rearing to non-endemic territories and the intensification of its production in regions where the climate is not entirely favorable. However, there is still a lack of information for some weight ranges to close the production cycle of this species in an RAS and possibly further intensify production in relation to the existing literature.

Therefore, the objective of the study was to evaluate the effects of stocking densities in three phases of tambaqui rearing in an RAS on growth and physiology.

## 2. Material and Methods

Three studies were conducted at the Laboratório de Aquicultura of the Universidade Federal de Minas Gerais (Brazil), with all procedures previously authorized by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG-nº 137/2023).

### 2.1. Experiment 1

This experiment used 7200 *C. macropomum* juveniles 45 days post hatching, with an average weight of  $0.54 \pm 0.19$  g and an average length of  $3.28 \pm 0.42$  cm, distributed in nine tanks in an individual RAS. To assemble the RAS, nine blue circular tanks ( $115 \times 115 \times 76$  cm) made of polyethylene were used, with a total volume of  $1 \text{ m}^3$  and  $0.8 \text{ m}^3$  of useful volume. Each tank was equipped with an “air-lift” system connected to a blower (2 CV), an 80 L biological filter, where crushed stone was used as substrate, and a mechanical filter containing acrylic wool, which was cleaned weekly. The “air-lift” provided an average flow of  $0.89 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , filtering the volume approximately 27 times a day, with the water outlet positioned in the lower part of the tank and water inlet through piping positioned in the upper part. Each system also had water heating (200-watt heater) and supplementary aeration. The photoperiod was 12 h of light (Key West DNI group, digital timer). Three stocking densities were tested, with three replicates each:  $D_{0.3}$ — $0.3 \text{ kg m}^{-3}$  ( $400\text{-fish tank}^{-1}$ );  $D_{0.6}$ — $0.6 \text{ kg m}^{-3}$  ( $800\text{-fish tank}^{-1}$ ); and  $D_{0.9}$ — $0.9 \text{ kg m}^{-3}$  ( $1200\text{-fish tank}^{-1}$ ). This experiment lasted 15 days. During the entire experimental period, no water changes were made in the tanks. Due to the accelerated growth of the animals, the RAS filters were not efficient in cycling ammonia, making it necessary to reduce the storage density of the tanks, ending the first phase of the experiment.

The animals were fed an extruded commercial feed (1.3–1.5 mm in diameter) from the Wean Prime line (Total Rações®, Três Corações, Brazil), with 45% crude protein, 12% moisture, 5% ether extract, 15% mineral matter (max.) and 4% crude fiber (max.) (manufacturer data). Feed was offered twice a day (09:00 and 15:00) until apparent satiety. Leftover feed was collected and dried to calculate feed consumption and conversion.

### 2.2. Experiment 2

This experiment used 1080 60-day-old *C. macropomum* juveniles with an average weight of  $8.22 \pm 3.37$  g and an average length of  $7.72 \pm 0.90$  cm. The animals were distributed in the same tanks described in experiment 1 but at three different stocking densities, with three replicates each:  $D_{0.8}$ — $0.8 \text{ kg m}^{-3}$  ( $80\text{-fish tank}^{-1}$ );  $D_{1.2}$ — $1.2 \text{ kg m}^{-3}$  ( $120\text{-fish tank}^{-1}$ ); and  $D_{1.6}$ — $1.6 \text{ kg m}^{-3}$  ( $160\text{-fish tank}^{-1}$ ). This experiment lasted 75 days. During the second experiment, no water changes were made in the first 21 days; between days 22 and 28 of the experiment, 10% of the volume of each tank was changed once a week. Between days 29 and 56, 10% of each tank was changed twice a week and from day 57 until the end of the experiment, and 10% of the volume was changed three times a day.

During the first 15 days, the animals were fed an extruded commercial feed (2–3 mm in diameter) from the Aquos Alevinos 45 line (Total Rações®), with 45% crude protein, 12% moisture, 8% ether extract, 15% mineral matter and 4% crude fiber (manufacturer’s data). Between days 16 and 30, the animals were fed an extruded commercial feed (2–3 mm) from the Pirá Evolution Juvenil line (Guabi®), with 40% crude protein, 10% moisture, 8% ether extract, 15% mineral matter and 5% crude fiber (manufacturer data). Between days 31 and 45, the animals were fed an extruded commercial feed (3–4 mm) from the Aquos Starter line (Total Rações®), with 36% crude protein, 12% moisture, 7% ether extract, 14% mineral matter and 5% crude fiber (manufacturer data). Finally, from day 46 until the end of the experiment, the animals were fed an extruded commercial feed (4–6 mm) also from the Aquos Starter line (Total Rações®), with the same formulation as that of the previously described feed. Food was fed until apparent satiety at two

times per day. Leftover feed was collected and dried to calculate feed consumption and conversion.

### 2.3. Experiment 3

This experiment used 270 135-day-old *C. macropomum* juveniles with an average weight of  $142.18 \pm 5.94$  g and an average length of  $19.40 \pm 1.04$  cm. The same system as in experiments 1 and 2 was used. Three different stocking densities were tested, with three replicates each: D<sub>2</sub>—2 kg m<sup>-3</sup> (15-fish tank<sup>-1</sup>); D<sub>4</sub>—4 kg m<sup>-3</sup> (30-fish tank<sup>-1</sup>); and D<sub>6</sub>—6 kg m<sup>-3</sup> (45-fish tank<sup>-1</sup>). This experiment lasted 75 days. During the first 30 days of experiment 3, no water changes were made; between days 31 and 45, 10% of the volume was changed once a week; between days 46 and 60, 10% of the volume was changed twice a week; and from day 61 until the end of experiment 3, 10% of the volume was changed three times a week.

During the first 30 days, the animals were fed an extruded commercial feed (4–6 mm in diameter) from the Aquos Starter line (Total Rações<sup>®</sup>), with the same formulations described in experiment 2. From day 31 until the end of the experiment, the animals were fed an extruded commercial feed (6–8 mm) from the Aquos Starter line (Total Rações<sup>®</sup>), with 32% crude protein, 12% moisture, 6% ether extract, 12% of mineral matter and 5.5% crude fiber (manufacturer's data). Food was fed until apparent satiety at two times per day. Leftover feed was collected and dried to calculate feed consumption and conversion.

### 2.4. Water Quality Analysis and Management

Water temperature (Hanna Instruments HI98130 multiparametric probe, Hanna<sup>®</sup>, Barueri, SP, Brazil), total ammonia (LabconTest Alcon<sup>®</sup> colorimetric kit, Camburiú, SC, Brazil) and dissolved oxygen (DO; YSI multiparametric probe, EcoSense<sup>®</sup> DO200A, Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, OH, USA) were measured three times a week in each experiment, while pH (Hanna Instruments HI98130 multiparametric probe) was measured once a week.

Excess organic matter was cleaned from each tank once a week by siphoning and renewing 20% of the total water volume.

Experiments 2 and 3 were carried out during the autumn and winter seasons when, even with controlled use of heaters inside the laboratory, it was not possible to maintain the temperature above 29°C, as for Experiment 1.

### 2.5. Growth and Survival

The biometric management of all fish and the counting of individuals were carried out at the end of each experiment. Weight was determined for previously anesthetized (20 mg L<sup>-1</sup> eugenol; [27]) juveniles using a Wellmix (82.674/wx502) 10 kg digital scale, while total length was determined using an ichthyometer (0.1 cm accuracy). The obtained data were used to determine the following:

- Final weight (g) (FW);
- Final length (cm) (FL);
- Weight gain (g) (WG) = FW – IW;
- Daily weight gain (g) (DWG) = (FW – IW)/ΔT;
- Daily specific growth rate (% day<sup>-1</sup>) (SGR) = 100 (lnFW – lnIW)/ΔT.

In the formula, ΔT represents the duration of the experiment. FW is the final weight and IW is the initial weight.

- Final biomass (FB) (kg);
- Fulton Condition Factor (Fk) = WG FL<sup>-3</sup>;
- Food consumption (kg) = (offered food (g) – dry leftover food (g))/100;
- Apparent food conversion (FCR) = consumption/(final biomass – initial biomass);
- Survival (%) = (number of fish alive at the end of the experiment × 100)/initial number of fish.

### 2.6. Hematological and Biochemical Analyses

At the end of experiments 2 and 3, the animals remained fasting for 24 h. A total of 5 fish per tank (*n* = 15 fish per treatment) were anesthetized with 50 mg L<sup>-1</sup> of eugenol [28], wrapped in a wet cloth and subjected to blood collection by caudal venipuncture with previously heparinized 3 mL syringes. Blood samples were subsequently dispensed into

microtubes containing sodium heparin anticoagulant (10%) to determine hemoglobin using a commercial colorimetric kit (Quibasa-Biocrin, Belo Horizonte, MG, Brazil) and hematocrit using the microhematocrit method [29]. Total plasma protein was determined after breaking the microhematocrit tube, where the plasma was placed in an analog refractometer (0 to 90% Brix-RHB0-90) for quantification. The erythrocyte (RBC) number was determined by diluting 10  $\mu\text{L}$  of whole blood in 2 mL of formaldehyde citrate and then by counting in a Neubauer Chamber.

The remainder of the blood was centrifuged (4000 RPM for 10 min) and the plasma was used to determine glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). During the analyses, we used a colorimetric method and commercial kits (Quibasa-Biocrin, Belo Horizonte, MG, Brazil), with readings taken on a spectrophotometer (Biochrom Libra S22 UV-VIS spectrophotometer, Biochrom Instruments, Cambridge, UK).

The following hematimetric indices were calculated: the mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) [30].

### 2.7. Viscerosomatic, Hepatosomatic and Visceral Fat Indices

At the end of Experiments 2 and 3, the same 15 animals from each treatment used in the previous blood analyzes were euthanized using 285 mg  $\text{L}^{-1}$  of eugenol [31]. The total viscera, liver and visceral fat of each fish were collected for weighing and the subsequent calculations of the following indices:

- Viscerosomatic index (VIS) = (total viscera (g)/live weight (g))  $\times$  100;
- Visceral fat index (VFI) = (intrapерitoneal fat (g)/body weight (g))  $\times$  100;
- Hepatosomatic index (HSI) = (liver (g)/live weight (g))  $\times$  100.

### 2.8. Statistical Analysis

Data from the three experiments were tested for normality (Shapiro–Wilk) of errors and homoscedasticity (Levene’s). After the assumption tests, a one-way ANOVA was performed and the means were compared using the Tukey 5% significance test.

## 3. Results

In experiment 1, only dissolved oxygen was affected by density, being significantly lower for  $D_{0.9}$  ( $p < 0.05$ ) (Table 1). In experiment 2, ammonia was affected, being significantly higher for  $D_{1.6}$  ( $p < 0.05$ ). The other parameters were not affected by the densities tested in the different experiments.

**Table 1.** Physicochemical variables of water (mean  $\pm$  standard deviation) for the three experiments testing different stocking densities in the rearing tambaqui (*C. macropomum*) in RAS.

Stocking Densities ( $\text{kg m}^{-3}$ )	$\text{NH}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	Dissolved Oxygen ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
Experiment 1				
$D_{0.3}$	$0.007 \pm 0.0006$	$7.57 \pm 0.06$	$4.49 \pm 0.20^a$	$29.32 \pm 0.30$
$D_{0.6}$	$0.041 \pm 0.0293$	$7.57 \pm 0.06$	$4.23 \pm 0.18^{ab}$	$29.31 \pm 0.09$
$D_{0.9}$	$0.041 \pm 0.0249$	$7.55 \pm 0.05$	$3.82 \pm 0.22^b$	$29.49 \pm 0.24$
<i>p</i> -value	0.1778	0.4908	0.0164	0.5714
Experiment 2				
$D_{0.8}$	$0.010 \pm 0.0047^b$	$7.57 \pm 0.09$	$4.17 \pm 0.62$	$26.55 \pm 0.08$
$D_{1.2}$	$0.015 \pm 0.0022^b$	$7.53 \pm 0.09$	$4.56 \pm 0.11$	$26.25 \pm 0.20$
$D_{1.6}$	$0.042 \pm 0.0046^a$	$7.53 \pm 0.06$	$3.70 \pm 0.39$	$26.56 \pm 0.07$
<i>p</i> -value	<0.0001	0.8424	0.0945	0.0547
Experiment 3				
$D_2$	$0.006 \pm 0.0037$	$7.30 \pm 0.03$	$6.30 \pm 0.69$	$26.01 \pm 0.32$
$D_4$	$0.007 \pm 0.0038$	$7.27 \pm 0.03$	$5.16 \pm 0.30$	$25.95 \pm 0.10$
$D_6$	$0.014 \pm 0.0071$	$7.26 \pm 0.04$	$4.67 \pm 0.88$	$26.14 \pm 0.21$
<i>p</i> -value	0.1929	0.3396	0.0597	0.5939

Means in the same column followed by different letters differed significantly when using Tukey’s test ( $p < 0.05$ ). The ammonia variable of experiment 2 was transformed using the logarithmic function ( $y = \log(x) + 1$ ).

### 3.1. Experiment 1

The performances of *C. macropomum* juveniles was not influenced by the stocking density used ( $p > 0.05$ ), except for the final biomass, which increased as the density increased ( $p < 0.05$ ) (Table 2).

**Table 2.** Growth parameters (mean  $\pm$  standard deviation) of tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 15 days in an RAS (experiment 1).

Parameters	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>0.3</sub>	D <sub>0.6</sub>	D <sub>0.9</sub>	
Final weight (g)	5.51 $\pm$ 0.23	5.23 $\pm$ 0.08	5.13 $\pm$ 0.34	0.6234
Final length (cm)	6.97 $\pm$ 0.20	6.66 $\pm$ 0.47	6.69 $\pm$ 0.15	0.4077
Weight gain (g)	4.96 $\pm$ 0.23	4.68 $\pm$ 0.85	4.58 $\pm$ 0.34	0.6234
DWG (g day <sup>-1</sup> )	0.33 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.02	0.6234
SGR (% day <sup>-1</sup> )	15.39 $\pm$ 0.29	15.00 $\pm$ 1.09	14.91 $\pm$ 0.45	0.619
Fulton conversion factor	1.16 $\pm$ 0.17	1.77 $\pm$ 0.09	1.71 $\pm$ 0.09	0.5568
Final biomass (kg m <sup>-3</sup> )	2.94 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	4.83 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	7.20 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	0.0009
Food consumption (kg)	2.12 $\pm$ 0.07	3.54 $\pm$ 1.33	3.65 $\pm$ 0.30	0.0599
Feed conversion rate	1.13 $\pm$ 0.58	0.90 $\pm$ 0.25	0.64 $\pm$ 0.11	0.3769
Survival (%)	99.50 $\pm$ 0.50	96.69 $\pm$ 2.56	95.78 $\pm$ 5.97	0.5365

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). DWG—daily weight gain; SGR—daily specific growth rate.

### 3.2. Experiment 2

The final length, Fulton condition factor, feed conversion and survival did not differ significantly between the densities tested ( $p > 0.05$ ) (Table 3). The final weight, weight gain and daily weight gain in D<sub>0.8</sub> were highest ( $p < 0.05$ ), while SGR was lowest in D<sub>1.6</sub> and highest in D<sub>0.8</sub> ( $p < 0.05$ ). The feed consumption was lowest for D<sub>0.8</sub> and highest for D<sub>1.6</sub> ( $p < 0.05$ ). The final biomass increased with increasing density ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Growth parameters (mean  $\pm$  standard deviation) of tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in RAS (experiment 2).

Parameters	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>0.8</sub>	D <sub>1.2</sub>	D <sub>1.6</sub>	
Final weight (g)	117.48 $\pm$ 7.80 <sup>a</sup>	100.66 $\pm$ 5.57 <sup>b</sup>	90.28 $\pm$ 3.05 <sup>b</sup>	0.0035
Final length (cm)	17.30 $\pm$ 0.83	17.01 $\pm$ 0.60	16.53 $\pm$ 0.69	0.4576
Weight gain (g)	109.25 $\pm$ 7.80 <sup>a</sup>	92.43 $\pm$ 5.57 <sup>b</sup>	82.05 $\pm$ 3.05 <sup>b</sup>	0.0035
DWG (g day <sup>-1</sup> )	1.45 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.09 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.0035
SGR (% day <sup>-1</sup> )	3.54 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	3.33 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	3.19 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.0029
Fulton conversion factor	2.27 $\pm$ 0.20	2.05 $\pm$ 0.20	2.01 $\pm$ 0.22	0.3353
Final biomass (kg m <sup>-3</sup> )	11.99 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>	14.95 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	17.62 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	0.0011
Food consumption (kg)	9.94 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	12.30 $\pm$ 1.59 <sup>ab</sup>	13.29 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	0.0138
Feed conversion rate	0.89 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.10	0.83 $\pm$ 0.09	0.6522
Survival (%)	98.75 $\pm$ 1.25	97.22 $\pm$ 2.67	95.83 $\pm$ 2.95	0.3926

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). DWG—daily weight gain; SGR—daily specific growth rate.

The VSI was reduced at D<sub>1.6</sub> and increased at D<sub>0.8</sub> ( $p < 0.05$ ) (Table 4), while the HSI was increased at D<sub>1.6</sub> ( $p < 0.05$ ). The VFI was not affected by stocking densities (Table 4) ( $p > 0.05$ ).

**Table 4.** Somatic indices (mean  $\pm$  standard deviation) for tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 2).

Indexes (%)	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>0.8</sub>	D <sub>1.2</sub>	D <sub>1.6</sub>	
VSI	4.42 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	4.12 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>	3.86 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>	0.0454
HSI	1.58 $\pm$ 0.43 <sup>ab</sup>	1.40 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.78 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	0.013
VFI	1.57 $\pm$ 0.75	1.08 $\pm$ 0.33	1.37 $\pm$ 0.41	0.0911

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). VSI—viscerosomatic index; HSI—hepatosomatic index; VFI—visceral fat index.

TG was highest for D<sub>0.8</sub> ( $p < 0.05$ ), while MCH was highest for D<sub>1.6</sub> ( $p < 0.05$ ) (Table 5).

The other parameters did not differ significantly among treatments ( $p > 0.05$ ).

**Table 5.** Physiological parameters (mean  $\pm$  standard deviation) for tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 2).

Parameters	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>0.8</sub>	D <sub>1.2</sub>	D <sub>1.6</sub>	
Hematocrit (%)	23.93 $\pm$ 2.40	25.27 $\pm$ 2.81	24.21 $\pm$ 2.69	0.3569
TPP (g dL <sup>-1</sup> )	5.43 $\pm$ 0.31	5.47 $\pm$ 0.28	5.46 $\pm$ 0.31	0.9328
Hemoglobin (g dL <sup>-1</sup> )	6.98 $\pm$ 1.81	7.81 $\pm$ 1.80	7.61 $\pm$ 1.93	0.3539
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	55.48 $\pm$ 8.68	60.64 $\pm$ 11.40	63.32 $\pm$ 11.40	0.1311
TC (mg dL <sup>-1</sup> )	112.39 $\pm$ 19.97	116.85 $\pm$ 15.22	121.79 $\pm$ 16.29	0.3386
TG (mg dL <sup>-1</sup> )	501.65 $\pm$ 91.62 <sup>a</sup>	401.24 $\pm$ 116.12 <sup>b</sup>	378.35 $\pm$ 74.22 <sup>b</sup>	0.0022
ALT (UI L <sup>-1</sup> )	9.22 $\pm$ 2.15	7.21 $\pm$ 2.35	8.28 $\pm$ 2.03	0.0558
AST (UI L <sup>-1</sup> )	21.11 $\pm$ 4.39	19.13 $\pm$ 22.29	19.25 $\pm$ 24.05	0.4726
RBC ( $\times 10^6$ $\mu$ L <sup>-1</sup> )	1.05 $\pm$ 0.18	1.07 $\pm$ 0.23	1.04 $\pm$ 0.20	0.9523
MCV (ftl)	236.12 $\pm$ 40.50	239.46 $\pm$ 60.02	239.53 $\pm$ 46.21	0.9811
MCH (pg)	52.88 $\pm$ 4.82 <sup>b</sup>	68.47 $\pm$ 19.01 <sup>ab</sup>	75.55 $\pm$ 24.95 <sup>a</sup>	0.0312
MCHC (g dL <sup>-1</sup> )	27.06 $\pm$ 4.58	29.66 $\pm$ 5.12	31.66 $\pm$ 6.83	0.1167

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The MCH variable was transformed using the inverse root function ( $Y = 1/\text{root}(x)$ ). TC—total cholesterol; TG—triglycerides; ALT—alanine aminotransferase; AST—aspartate aminotransferase; MCV—mean corpuscular volume; MCH—mean corpuscular hemoglobin; MCHC—mean corpuscular hemoglobin concentration; RBC—erythrocyte number.

### 3.3. Experiment 3

The variables of the final weight, weight gain, DWG and SGR were lower for D<sub>6</sub> ( $p < 0.05$ ) (Table 6). The final length was higher for D<sub>2</sub> and lower for D<sub>6</sub> ( $p < 0.05$ ), while the final biomass did not differ between D<sub>4</sub> and D<sub>6</sub> and was lower for D<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). The Fulton condition factor and food consumption, apparent feed conversion and survival were not affected by density ( $p > 0.05$ ).

**Table 6.** Growth parameters (mean  $\pm$  standard deviation) of tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3).

Parameters	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>6</sub>	
Final weight (g)	458.42 $\pm$ 84.25 <sup>a</sup>	405.88 $\pm$ 8.48 <sup>a</sup>	296.64 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup>	0.0019
Final length (cm)	27.62 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>	26.65 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>	24.57 $\pm$ 0.075 <sup>b</sup>	0.0205
Weight gain (g)	311.69 $\pm$ 84.47 <sup>a</sup>	265.37 $\pm$ 8.82 <sup>a</sup>	161.10 $\pm$ 2.79 <sup>b</sup>	0.0016
DWG (g day <sup>-1</sup> )	4.15 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	3.53 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.14 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>	0.0016
SGR (% day <sup>-1</sup> )	1.50 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.0027
Fulton conversion factor	2.15 $\pm$ 0.10	2.14 $\pm$ 0.05	2.00 $\pm$ 0.02	0.0498
Final biomass (kg m <sup>-3</sup> )	8.32 $\pm$ 1.69 <sup>b</sup>	14.71 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	16.91 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.0002
Food consumption (kg)	12.10 $\pm$ 1.63	10.78 $\pm$ 1.68	12.65 $\pm$ 1.83	0.7099
Feed conversion rate	2.36 $\pm$ 0.93	1.14 $\pm$ 0.14	1.36 $\pm$ 0.16	0.0745
Survival (%)	95.56 $\pm$ 3.84	94.44 $\pm$ 1.92	97.04 $\pm$ 3.39	0.6261

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The variables weight and specific growth rate were transformed using the inverse function  $Y = (1/(x^2))$ , while the variables weight gain and daily weight gain were transformed using the inverse function  $Y = (1/x)$ . DWG—daily weight gain; SGR—daily specific growth rate.

Different stocking densities did not influence the somatic indices ( $p > 0.05$ ) (Table 7).

**Table 7.** Somatic indices (mean  $\pm$  standard deviation) for tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3).

Indexes (%)	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>6</sub>	
VSI	8.10 $\pm$ 2.41	8.94 $\pm$ 1.48	8.42 $\pm$ 2.64	0.622
HSI	1.60 $\pm$ 0.53	1.55 $\pm$ 0.56	1.55 $\pm$ 0.50	0.9516
VFI	2.81 $\pm$ 0.97	3.01 $\pm$ 0.93	3.39 $\pm$ 0.34	0.3652

VSI—viscerosomatic index; HSI—hepatosomatic index; VFI—visceral fat index.

Hemoglobin was lower in D<sub>4</sub> and D<sub>6</sub> ( $p < 0.05$ ) (Table 8). Glucose and TC were increased in D<sub>2</sub> and D<sub>6</sub> ( $p < 0.05$ ). MCH was higher in D<sub>4</sub> ( $p < 0.05$ ), while MCHC was increased in D<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). The other parameters were not affected by density rates ( $p > 0.05$ ).

**Table 8.** Physiological parameters (mean  $\pm$  standard deviation) for tambaqui (*C. macropomum*) juveniles reared at different stocking densities for 75 days in the RAS (experiment 3).

Parameters	Stocking Densities (kg m <sup>-3</sup> )			p-value
	D <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>6</sub>	
Hematocrit (%)	23.67 $\pm$ 2.01	22.86 $\pm$ 2.41	24.75 $\pm$ 1.65	0.0816
TPP (g dL <sup>-1</sup> )	5.20 $\pm$ 0.35	5.16 $\pm$ 0.33	5.20 $\pm$ 0.25	0.878
Hemoglobin (g dL <sup>-1</sup> )	7.19 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	6.34 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	6.19 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	0.002
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	70.00 $\pm$ 16.58 <sup>a</sup>	56.79 $\pm$ 10.99 <sup>b</sup>	76.64 $\pm$ 14.93 <sup>a</sup>	0.004
TC (mg dL <sup>-1</sup> )	117.16 $\pm$ 19.57 <sup>a</sup>	89.96 $\pm$ 10.46 <sup>b</sup>	109.78 $\pm$ 20.97 <sup>a</sup>	0.0039
TG (mg dL <sup>-1</sup> )	321.23 $\pm$ 48.88	342.99 $\pm$ 60.74	330.85 $\pm$ 51.43	0.5955
ALT (UI L <sup>-1</sup> )	20.57 $\pm$ 5.61	19.92 $\pm$ 4.71	19.27 $\pm$ 4.54	0.7907
AST (UI L <sup>-1</sup> )	32.13 $\pm$ 10.49	35.80 $\pm$ 6.89	26.77 $\pm$ 10.86	0.0982
RBC ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	1.18 $\pm$ 0.30	1.04 $\pm$ 0.21	1.28 $\pm$ 0.35	0.1375
MCV (ftl)	218.38 $\pm$ 57.89	223.84 $\pm$ 37.41	202.93 $\pm$ 36.37	0.5612
MCH (pg)	59.50 $\pm$ 10.74 <sup>ab</sup>	62.43 $\pm$ 12.43 <sup>a</sup>	50.82 $\pm$ 11.74 <sup>b</sup>	0.0414
MCHC (g dL <sup>-1</sup> )	30.44 $\pm$ 3.70 <sup>a</sup>	26.74 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	24.17 $\pm$ 3.57 <sup>b</sup>	0.0001

Means in the same row followed by different letters differed significantly when using Tukey's test ( $p < 0.05$ ). TC—total cholesterol; TG—triglycerides; ALT—alanine aminotransferase; AST—aspartate aminotransferase; MCV—mean corpuscular volume; MCH—mean corpuscular hemoglobin; MCHC—mean corpuscular hemoglobin concentration; RBC—erythrocyte number.

#### 4. Discussion

The tambaqui (*C. macropomum*) demonstrated easy adaptation in the RAS, in accordance with previous studies [10,12,24–27]. The greater than 90% survival in the three experiments, the growth observed for all the tested stocking densities and the low interference with somatic, physiological and water quality parameters evidence the successful production of *C. macropomum* in the RAS.

The RAS used was efficient at maintaining the physical and chemical parameters of the water in the different experiments. In experiment 1, only dissolved oxygen was lower at the highest density (D<sub>0.9</sub>). Similar results were observed for *C. macropomum* subjected to four different stocking densities [32]. Dissolved oxygen was also reduced with an increasing density of African catfish, *Clarias gariepinus* [3]. *Colossoma macropomum* has anatomical adaptations on its lips that provide good resistance to dissolved oxygen levels between 3 and 1 mg L<sup>-1</sup> [33–36]. The lowest oxygen levels in the present study were above 3 mg L<sup>-1</sup> and the animals showed growth. In experiment 2, ammonia was highest for the highest density tested (D<sub>1.6</sub>). An increased ammonia concentration at higher densities was also recorded for *C. macropomum* larviculture in an RAS [12]. Nonetheless, the values recorded here are within the tolerance levels of the species [35,37,38]. Although temperature was lower in experiments 2 and 3 than in experiment 1, the animals still showed growth, with daily weight gain. There are records of the rearing of this species in waters with temperatures between 25 and 34 °C [39–41], reinforcing the possibility for *C. macropomum* rearing in regions where the winters are colder than in its region of origin, when kept in an RAS.

The different densities did not affect juvenile performance in experiment 1. In experiment 2, the final weight, weight gain and DWG were greater for the lowest density tested (D<sub>0.8</sub>), while the SGR and feed intake were increased for D<sub>0.8</sub> and reduced for D<sub>1.6</sub>. In experiment 3, the weight, weight gain, daily weight gain, SGR and length were highest for the lower densities (D<sub>2</sub> and D<sub>4</sub>). Available space is a determining factor for the development of fish, which may explain the worse performance observed at higher densities in experiment 2 (D<sub>1.2</sub> and D<sub>1.6</sub>) and experiment 3 (D<sub>6</sub>). High stocking densities can cause stressful situations, stagnating development [42], and the energy demand caused by competition for food due to high density also interferes with animal weight gain [10,43]. Similar results were previously observed for *C. macropomum* at different growth phases [10]. Other work with the European catfish, *Silurus glanis* [44], and the Asian sea bass, *Lates calcarifer* [45], also reported similar results. However, during the larviculture of *C. macropomum*, the variables of weight, length and SGR did not show differences between the densities tested

[12]. Likewise, juveniles (0.35 g) of *C. macropomum* did not demonstrate differences in the same parameters as juveniles after the first 15 days, compared to the different storage densities tested [26]. There is clearly a need to evaluate different densities during different growth phases.

Feed conversion ranged between 0.6 and 1.1 in experiment 1, averaged 0.8 in experiment 2 and ranged between 1.1 and 2.3 in experiment 3, but without significant differences among the tested densities. Feed conversion can be influenced by environmental parameters and by species, animal size and activity level [46]. Contrasting results are found in the literature regarding feed conversion for *C. macropomum*. The feed conversion by juvenile *C. macropomum* with an initial weight of 34.88 g was influenced by the three densities to which they were subjected (1.28, 1.15, and 1.14) during the first 30 days; however, this influence was not observed after 30 days [10]. Stocking densities indirectly influenced the food conversion (1.2 to 0.5) of *C. macropomum* juveniles, also kept in an RAS, up to the minimum point found of 3.20 fish L<sup>-1</sup>, increasing food conversion from then [26]. When

subjected to different stocking densities, the hybrid species tambatinga (*C. macropomum* × *Piaractus brachipomus*) did exhibit differences in feed conversion (1.08, 1.14, 1.16) [1], with values similar to those obtained in the present study for *C. macropomum*.

The biomass produced was greater for the highest density tested in all the experiments of the present study. Biomass can be used as a parameter to analyze productivity [47]. Even though fish growth was affected by density, the high survival justifies the production of *C. macropomum* at high stocking densities to improve productivity through the final biomass produced. As in the present study, *C. macropomum* in different growth phases raised in an RAS [10,26], the hybrid tambatinga (*C. macropomum* × *P. brachipomus*) [1], sole (*Paralichthys olivaceus*) [48], the European catfish *S. glanis* [49], and larvae of *Acipenser ruthenus* [50] also showed higher biomass at higher densities.

It is also worth highlighting the high survival rates of the present study, being above 94% for all three experiments and with no negative effects of the tested densities. Stocking density is directly related to animal survival. The high survival rate obtained for all the densities tested in the experiments highlights the favorable adaptation of *C. macropomum* to density. These results corroborate the high survival rates found in other studies with this species [10,26,27,32].

In experiment 2, the VSI was increased by the lowest density (D<sub>0.8</sub>) and reduced by D<sub>1.6</sub> ( $p < 0.05$ ), while the HSI was greater for D<sub>1.6</sub>. In experiment 3, the somatic indices were not influenced by the tested densities. Somatic indices are related to animal weight. The HSI is related to the fish nutritional level and growth rate [51], indicating an accumulation of glycogen in tissue as an energy reserve [52]. Increased VSI and HSI values may indicate an increase in fat deposits in the intestine and liver, respectively. However, the juvenile *C. macropomum* had their highest HSI levels at the lowest densities in the first two phases of the study, after the juveniles reached weights of 189.06 (Phase 1) and 521.67 g (Phase 2) and at the highest density during Phase 3 (729.44 g). Conversely, VFI values were highest at the highest densities of Phase 1 (149.24 g) and Phase 2 (426.67 g) and at the lowest density of Phase 3 (1129.13 g) [10], while the present study found no differences for this index.

The increase in TG at D<sub>0.8</sub> in experiment 2, and glucose and TC at D<sub>2</sub> and D<sub>6</sub> in experiment 3 ( $p < 0.05$ ), may be related to energy metabolism through glycolytic pathways [53], increasing the availability of energy to deal with stressful situations such as high population density. Triglycerides are important substrates under conditions of high stocking density [54]. A study of stocking density in different phases found no standard response, and also found that this varies depending on the tested density and the size of the animals [10]. The catfish *Ictalurus punctatus* also had increased triglycerides with high density [8].

Higher glucose levels were found at the highest densities tested for the catfish *I. punctatus* [8]. However, an increase in glucose was observed at D<sub>2</sub> and D<sub>6</sub>, reinforcing what was previously discussed about no response pattern for *C. macropomum* [10]. A reduction in glucose levels with increasing density was reported for *Anguilla marmorata* [55], similar to that found for juvenile sea bream, *Megalobrama amblycephala* [54].

No changes were found in the TC levels for *C. macropomum* in the first growth phases [10]. However, these authors found that denser fish with an average weight of 729.44 exhibited an increase in cholesterol. The same was found for the catfish *I. punctatus* [8]. The results recorded here for D<sub>6</sub> corroborate these findings.

Hematological indices are used to analyze the physiological state, health, stress levels and the development of possible diseases [56], and can indicate the nutritional status and adaptation capacity of fish to the rearing environment [57]. The increases in HCM for D<sub>1.6</sub> of experiment 2 and D<sub>4</sub> of experiment 3, as well as in hemoglobin and MCHC for D<sub>2</sub> of experiment 3, may indicate an increase in the need for oxygen caused by the increase in stocking density. Juveniles of *C. macropomum*, with an average weight of 108.94 g, suffered increases in hemoglobin at higher densities [10]. The results of the present study corroborate the increases in these same rates at high stocking densities recorded for the European catfish *S. glanis* [44]. These different results in hematology and blood biochemistry indicate no pattern of interference by stocking density. However, these changes need to be better evaluated as fish grow to establish reference values for each species in the different growth phases.

The Fulton condition factor can be used to evaluate the physiological well-being of fish, as well as the affinity of the species with the rearing environment [58]. When values are greater than 1, they indicate good general adaptation by fish [59]. The present study found no differences in the condition factor among the densities tested in the respective experiments, with this value ranging between 1.16 and 1.77 in experiment 1, 2.01 and 2.27 in experiment 2 and 2.00 and 2.15 in experiment 3. These results indicate that the animals adapted satisfactorily to the densities used.

## 5. Conclusions

*Colossoma macropomum* showed excellent adaptation to the RAS. Lower densities provided greater weight gain for the fish in experiment 2 and in experiment 3. However, higher densities were able to produce greater biomass in all experiments. The Fulton condition factor values observed for all the tested densities indicate that even with changes in some hematological parameters, the species positively supports production at high stocking densities.

**Author Contributions:** I.d.M.C.A.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation, investigation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, supervision. S.d.S.S.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, data curation, investigation, visualization. F.A.C.d.S.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, visualization. A.d.S.S.: conceptualization, methodology, investigation. T.B.M.: conceptualization, methodology, investigation. P.A.R.R.: conceptualization, methodology, validation, investigation. G.C.F.: conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, visualization. R.K.L.: project administration, supervision, resources, investigation, conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil-402952/2021-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil-APQ-01531-21), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil). R.K. Luz received research fellowships from CNPq (CNPq No. 308547/2018-7).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGM-nº 137/2023).

**Data Availability Statement:** The data supporting the results of this study are available from the author, Imaculada de Moraes Carvalho Ananias, upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Sousa, R.M.; dos Santos Silva, R.R.; dos Santos, A.S.; da Silva, C.V.; Magalhães, J.A.; dos Santos Fogaça, F.H.; Lopes, J.M. Tambatinga Juveniles Performance in a Recirculation Aquaculture System with Different Stocking Densities. *Res. Soc. Dev.* **2020**, *9*, e178953317. [[CrossRef](#)]

2. Karnatak, G.; Dass, B.K.; Mishal, P.; Tayung, T.; Kumari, S.; Sarkar, U.K.; Das, A.K.; Ali, Y. Impact of Stocking Density on Growth, Feed Utilization and Survival of Cage Reared Minor Carp, *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in Maithon Reservoir, India. *Aquaculture* **2021**, *532*, 736078. [[CrossRef](#)]
3. Oké, V.; Goosen, N.J. The Effect of Stocking Density on Profitability of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Culture in Extensive Pond Systems. *Aquaculture* **2019**, *507*, 385–392. [[CrossRef](#)]
4. Jatoba, A.; Silva, B.C. Stocking Density in the Juvenile Production of Two Characins Species in a Recirculating System. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2015**, *67*, 1469–1474. [[CrossRef](#)]
5. Piaia, R.; Baldisserotto, B. Stocking Density and Growth of *Rhamdia Quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) Fingerlings. *Cienc. Rural.* **2000**, *30*, 509–513. [[CrossRef](#)]
6. Abaho, I.; Zaabwe, T.; Izaara, A.; Kasigwa, H.N.; Mushade, N.; Byenkya, S.; Nkambo, M.; Baguma, S.D.; Hafashimana, D.L.N.; Efitre, J. Effect of Stocking Density on Growth and Survival of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*, Linnaeus 1758) under Cage Culture in Lake Albert, Uganda. *Int. J. Fish. Aquac.* **2020**, *12*, 26–35. [[CrossRef](#)]
7. Refaey, M.M.; Li, D.; Tian, X.; Onxayvieng, K.; Tang, R. Physiological Responses of Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) Reared at Different Stocking Densities in a Recirculating Aquaculture System. *Aquaculture* **2022**, *557*, 738329. [[CrossRef](#)]
8. Refaey, M.M.; Li, D.; Tian, X.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, L.; Tang, R. High Stocking Density Alters Growth Performance, Blood Biochemistry, Intestinal Histology, and Muscle Quality of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **2018**, *492*, 73–81. [[CrossRef](#)]
9. Wang, Y.; Chi, L.; Liu, Q.; Xiao, Y.; Ma, D.; Xiao, Z.; Xu, S.; Li, J. Effects of Stocking Density on the Growth and Immunity of Atlantic Salmon *Salmo salar* Reared in Recirculating Aquaculture System (RAS). *J. Oceanol. Limnol.* **2019**, *37*, 350–360. [[CrossRef](#)]
10. Santos, F.A.C.; Boaventura, T.P.; da Costa Julio, G.S.; Cortezzi, P.P.; Figueiredo, L.G.; Favero, G.C.; Palheta, G.D.A.; De Melo, N.F.A.C.; Luz, R.K. Growth Performance and Physiological Parameters of *Colossoma macropomum* in a Recirculating Aquaculture System (RAS): Importance of Stocking Density and Classification. *Aquaculture* **2021**, *534*, 736274. [[CrossRef](#)]
11. Biswas, G.; Ghoshal, T.K.; Natarajan, M.; Thirunavukkarasu, A.R.; Sundaray, J.K.; Kailasam, M.; De, D.; Sukumaran, K.; Kumar, P.; Ponniah, A.G. Effects of Stocking Density and Presence or Absence of Soil Base on Growth, Weight Variation, Survival and Body Composition of Pearlscale, *Etroplus suratensis* (Bloch) Fingerlings. *Aquac. Res.* **2013**, *44*, 1266–1276. [[CrossRef](#)]
12. Santos, F.A.C.; da Costa Julio, G.S.; Batista, F.S.; Miranda, L.N.L.; Pedras, P.P.C.; Luz, R.K. High Stocking Densities in the Larviculture of *Colossoma macropomum* in a Recirculating Aquaculture System: Performance, Survival and Economic Viability. *Aquaculture* **2022**, *552*, 738016. [[CrossRef](#)]
13. Carvalho, T.B.; Souza, E.C.M.; Da Silva, J.P.; Villacort Correa, M.A. Effect of Body Size Heterogeneity on the Aggressive Behavior of Larvae of Matrinxã, *Brycon amazonicus* (Characiformes, Bryconidae). *Acta Amaz.* **2018**, *48*, 304–310. [[CrossRef](#)]
14. Lupatsch, I.; Santos, G.A.; Schrama, J.W.; Verreth, J.A.J. Effect of Stocking Density and Feeding Level on Energy Expenditure and Stress Responsiveness in European Sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* **2010**, *298*, 245–250. [[CrossRef](#)]
15. Sanchez, P.; Ambrosio, P.P.; Flos, R. Stocking Density Affects Senegalese Sole (*Solea senegalensis*, Kaup) Growth Independently of Size Dispersion, Evaluated Using an Individual Photo-Identification Technique. *Aquac. Res.* **2013**, *44*, 231–241. [[CrossRef](#)]
16. Salaro, A.L.; Luz, R.K.; De Barros Nogueira, G.C.C.; Reis, A.; Sakabe, R.; Lambertucci, D.M. Effect of Two Stocking Rates on the Trairão (*Hoplias* Cf. *Lacercidae*) Fingerlings Performance. *J. Anim. Sci.* **2003**, *32*, 1033–1036. [[CrossRef](#)]
17. da Silva Ayroza, L.M.; Romagosa, E.; de Rezende Ayroza, D.M.M.; Scorvo Filho, J.D.; Salles, F.A. Costs and Profitability of Juvenile Nile Tilapia Breeding Using Different Stocking Densities in Net Cages. *J. Anim. Sci.* **2011**, *40*, 231–239. [[CrossRef](#)]
18. Ezhilmathi, S.; Ahilan, B.; Uma, A.; Felix, N.; Cheryl, A.; Lingam, R.S.S. Effect of Stocking Density on Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, Body Composition and Gene Expression of *Asian seabass* Reared in Recirculating Aquaculture System. *Aquac. Res.* **2022**, *53*, 1963–1972. [[CrossRef](#)]
19. Yarahmadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S.; Caipang, C.M.A. Increased Stocking Density Causes Changes in Expression of Selected Stress- and Immune-Related Genes, Humoral Innate Immune Parameters and Stress Responses of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *48*, 43–53. [[CrossRef](#)]
20. Bardiola, M.; Basurko, O.C.; Piedrahita, R.; Hundley, P.; Mendiola, D. Energy Use in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A Review. *Aquac. Eng.* **2018**, *81*, 57–70. [[CrossRef](#)]
21. Buckup, P.A.; Menezes, N.A.; Ghazzi, M.S. *Catálogo Das Espécies de Peixes de Água Doce Do Brasil*; Museu Nacional: Rio de Janeiro, Brazil, 2007; 291p.
22. Peixe, B.R. *Anuário Brasileiro Da Piscicultura*; Associação Brasileira da Piscicultura: Brazil, 2023.
23. Guimarães, I.G.; Miranda, E.C.; Araújo, J.G. Coefficients of Total Tract Apparent Digestibility of Some Feedstuffs for Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Anim. Feed Sci. Technol.* **2014**, *188*, 150–155. [[CrossRef](#)]
24. de Farias Lima, J.; Montagner, D.; Duarte, S.S.; Yoshioka, E.T.O.; Dias, M.K.R.; Tavares Dias, M. Recirculating System Using Biological Aerated Filters on Tambaqui Fingerling Farming. *Pesqui. Agropecuária Bras.* **2019**, *54*, e00294. [[CrossRef](#)]
25. Boaventura, T.P.; Cortezzi, P.P.; Santos, F.A.C.; Ferreira, A.L.; Favero, G.C.; Palheta, G.D.A.; De Melo, N.F.A.C.; Luz, R.K. Cultivation of Juvenile *Colossoma macropomum* in Different Colored Tanks in Recirculating Aquaculture System (RAS): Effects on Performance, Metabolism and Skin Pigmentation. *Aquaculture* **2021**, *532*, 736079. [[CrossRef](#)]
26. de Souza e Silva, W.; Ferreira, A.L.; do Carmo Neves, L.; Ferreira, N.S.; Palheta, G.D.A.; Takata, R.; Luz, R.K. Effects of Stocking Density on Survival, Growth and Stress Resistance of Juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Reared in a Recirculating Aquaculture System (RAS). *Aquac. Int.* **2021**, *29*, 609–621. [[CrossRef](#)]

27. Santos, F.A.; da Costa Julio, G.S.; Luz, R.K. Stocking Density in *Colossoma macropomum* Larviculture, a Freshwater Fish, in Recirculating Aquaculture System. *Aquac. Res.* **2020**, *52*, 1185–1191. [[CrossRef](#)]
28. Ferreira, A.L.; Bonifácio, C.T.; de Souza e Silva, W.; Takata, R.; Favero, G.C.; Luz, R.K. Anesthesia with Eugenol and Menthol for *Piaractus brachypterus* (Cuvier, 1818): Induction and Recovery Times, Ventilation Frequency and Hematological and Biochemical Responses. *Aquaculture* **2021**, *544*, 737076. [[CrossRef](#)]
29. Goldenfard, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility on the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* **1971**, *56*, 35–39. [[CrossRef](#)]
30. Winthrope, M.M. Variations in the Size and Hemoglobin Content of Erythrocytes in the Blood of Various Vertebrates. *Folia Haemat.* **1934**, *51*, 32–49.
31. Mattioli, C.C.; Takata, R.; de Oliveira Paes Leme, F.; Costa, D.C.; Melillo Filho, R.; de Souza e Silva, W.; Luz, R.K. The Effects of Acute and Chronic Exposure to Water Salinity on Juveniles of the Carnivorous Freshwater Catfish *Lophiosilurus alexandri*. *Aquaculture* **2017**, *481*, 255–266. [[CrossRef](#)]
32. Costa, O.T.F.; Dias, L.C.; Malmann, C.S.Y.; de Lima Ferreira, C.A.; Do Carmo, I.B.; Wischneski, A.G.; Sousa, R.L.; Cavero, B.A.S.; Lameiras, J.L.V.; Dos Santos, M.C. The Effects of Stocking Density on the Hematology, Plasma Protein Profile and Immunoglobulin Production of Juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Farmed in Brazil. *Aquaculture* **2019**, *499*, 260–268. [[CrossRef](#)]
33. Val, A.L. Oxygen Transfer in Fish: Morphological and Molecular Adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1995**, *28*, 1119–1127. [[PubMed](#)]
34. Val, A.L. Surviving Low Oxygen Levels: Lessons From Fishes of the Amazon. In *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*; Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J., Eds.; INPA: Manaus, Brazil, 1996; pp. 59–70.
35. De Moraes, I.S.; O’Sullivan, F.L.d.A. Biologia, Habitat e Cultivo Do Tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). *Sci. Amazon.* **2017**, *6*, 81–93.
36. dos Santos Silva, S.; do Carmo Neves, L.; Favero, G.C.; da Silva, H.N.; Baldisserotto, B.; Palheta, G.D.; de Melo, N.F.; Luz, R.K. Oxidative Stress in Juvenile Tambaqui (*Colossoma macropomum*) after Different Periods of Air Exposure. *Aquaculture* **2023**, *575*, 739740. [[CrossRef](#)]
37. Wood, C.M.; Gonzales, R.J.; Ferreira, M.S.; Braz Mota, S.; Val, A.L. The Physiology of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0. *J. Comp. Physiol.* **2018**, *188*, 393–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Gomes, L.C.; Simões, L.N.; Araujo-Lima, C.A.R.M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In *Espécies Nativas para Piscicultura No Brasil*, 3rd ed.; Baldisserotto, B., Ed.; Editora UFSM: Santa Maria, Brazil, 2020; pp. 147–162.
39. Araujo-Lima, C.A.R.M.; Gomes, L.C. Tambaqui *Colossoma macropomum*. In *Espécies Nativas para Piscicultura No Brasil*; Baldisserotto, B., Gomes, L.C., Eds.; Editora UFSM: Santa Maria, Brazil, 2005; pp. 175–202.
40. Dairiki, J.K.; Da Silva, T.B.A. *Revisão de Literatura: Exigências Nutricionais Do Tambaqui-Compilação de Trabalhos, Formulação de Ração Adequada e Desafios Futuros*; Embrapa Amazônica Ocidental: Manaus, Brazil, 2011; 44p.
41. Izel, A.C.U.; Crescencio, R.; O’Sullivan, F.L.d.A.; Chagas, E.C.; Bojink, C.d.L. *Cultivo Do Tambaqui No Amazonas; ABC da Agricultura Familiar*; Embrapa Amazônica Ocidental: Manaus, Brazil, 2014; 51p.
42. Shao, T.; Chen, X.; Zhai, D.; Wang, T.; Long, X.; Liu, Z. Evaluation of the Effects of Different Stocking Densities on Growth and Stress Responses of Juvenile Hybrid Grouper ♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂*Epinephelus lanceolatus* in Recirculating Aquaculture Systems. *J. Fish Biol.* **2019**, *95*, 1022–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Li, H.W.; Brocksen, R.W. Approaches to the Analysis of Energetic Costs of Intraspecific Competition for Space by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* **1977**, *11*, 329–341. [[CrossRef](#)]
44. Koprucu, K.; Yonar, S.M.; Koprucu, S.; Yonar, M.E. Effect of Different Stocking Densities on Growth, Oxidative Stress, Antioxidant Enzymes, and Hematological and Immunological Values of European Catfish (*Silurus glanis* L., 1758). *Aquac. Int.* **2023**. [[CrossRef](#)]
45. Khan, S.K.; Salin, K.R.; Yakupitiyage, A.; Tsusaka, T.W.; Shrestha, S.; Siddique, M.A.M. Effect of Stocking Density and Tank Colour on Nursery Growth Performance, Cannibalism and Survival of the Asian Seabass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) in a Recirculating Aquaculture System. *Aquac. Res.* **2022**, *53*, 2472–2483. [[CrossRef](#)]
46. Craig, S.R.; Helfrich, L.A.; Kuhn, M.H.; Schwarz, M.H. *Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding*; Virginia Cooperative Extension: Blacksburg, VA, USA, 2017; pp. 1–6.
47. Ali, M.; Iqbal, F.; Salam, A.; Sial, F.; Athar, M. Comparative Study of Body Composition of Four Fish Species in Relation to Pond Depth. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2006**, *2*, 359–364. [[CrossRef](#)]
48. Seo, S.; Park, J. Does stocking density affect growth performance and hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* in a recirculating aquaculture system? *Animals* **2023**, *13*, 44. [[CrossRef](#)]
49. Krasteva, V. Influence of Initial Stocking Density on Growth Performance and Survival of European Catfish (*Silurus glanis* L.) Larvae under Controlled Conditions. *Bulg. J. Agric. Sci.* **2020**, *26*, 248–253.
50. Fazekas, G.; Kaldy, J.; Kovacs, G.; Muller, T.; Ljubobratovic, U. The Effect of Stocking Density on Sterlet *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758) Larvae in the Recirculating Aquaculture System. *J. Appl. Ichthyol.* **2022**, *38*, 479–486. [[CrossRef](#)]
51. Luckenbach, A.J.; Murashige, R.; Daniels, H.V.; Godwin, J.; Borski, R.J. Temperature Affects Insulin-like Growth Factor I and Growth of Juvenile Southern Flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *146*, 95–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Janssens, P.A.; Waterman, J. Hormonal Regulation of Gluconeogenesis and Glycogenolysis in Carp (*Cyprinus carpio*) Liver Pieces

- Cultured in Vitro. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **1988**, *91*, 451–455. [[CrossRef](#)]
53. Barton, B.A.; Iwama, G.K. Physiological Changes in Fish from Stress in Aquaculture with Emphasis on the Response and Effects of Corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1991**, *1*, 3–26. [[CrossRef](#)]
  54. Qi, C.; Xie, C.; Tang, R.; Qin, X.; Wang, D.; Li, D. Effect of Stocking Density on Growth, Physiological Responses, and Body Composition of Juvenile Blunt Snout Bream, *Megalobrama amblycephala*. *J. World Aquac. Soc.* **2016**, *47*, 358–368. [[CrossRef](#)]
  55. Tan, C.; Sun, D.; Tan, H.; Liu, W.; Luo, G.; Wei, X. Effects of Stocking Density on Growth, Body Composition, Digestive Enzyme Levels and Blood Biochemical Parameters of *Anguilla marmorata* in a Recirculating Aquaculture System. *Turk. J. Fish. Aquat.* **2018**, *18*, 9–16. [[CrossRef](#)]
  56. Vazirzadeh, A.; Dehghan, F.; Kazemeini, R. Changes in Growth, Blood Immune Parameters and Expression of Immune Related Genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Response to Diet Supplemented with Ducrosia Anethifolia Essential Oil. *Fish Shellfish Immunol.* **2017**, *69*, 164–172. [[CrossRef](#)]
  57. Abdel Tawwab, M.; Adeshina, I.; Jenyo Oni, A.; Ajani, E.K.; Emikpe, B.O. Growth, Physiological, Antioxidants, and Immune Response of African Catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to Dietary Clove Basil, Ocimum Gratissimum, Leaf Extract and Its Susceptibility to *Listeria Monocytogenes* Infection. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *78*, 346–354. [[CrossRef](#)]
  58. Adebisi, F.A. Length-Frequency Distribution, Length-Weight Relationship and Condition Factor of Sompat Grunt *Pomadasy jubelini* (Cuvier, 1830) off Lagos Coast, Nigeria. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* **2013**, *36*, 337–344.
  59. Blackwell, B.G.; Brown, M.L.; Willis, D.W. Relative Weight (Wr) Status and Current Use in Fisheries Assessment and Management. *Rev. Fish. Sci.* **2000**, *8*, 1–44. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**6. ARTIGO II**

Capítulo formatado de acordo com as normas da revista FISHES

Artigo publicado em 11 de abril de 2025 pela revista FISHES

DOI: 10.3390/fishes10040171

## Article

# Effects of Stocking Densities on the Growth Performance and Physiology of Juvenile *Piaractus brachypomus* in Recirculating Aquaculture System

Imaculada de Morais Carvalho Ananias , Sidney dos Santos Silva , André de Sena Souza, Fábio Aremil Costa dos Santos , Thamara Bentivole Magalhães, Wagner Junio de Freitas Martins , Gisele Cristina Favero  and Ronald Kennedy Luz \* 

Laboratório de Aquicultura, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, nº6627, Belo Horizonte CEP 30161-970, Brazil; imaculada\_carvalho@hotmail.com (I.d.M.C.A.); sidneysantos2509@gmail.com (S.d.S.S.); andresenasss@gmail.com (A.d.S.S.); fabioaremil@gmail.com (F.A.C.d.S.); thamarabentivole@gmail.com (T.B.M.); wagjfm@gmail.com (W.J.d.F.M.); giselefav82@yahoo.com.br (G.C.F.)  
\* Correspondence: luzrk@yahoo.com or luzrk@vet.ufmg.br; Tel.: +55-3134092218A

**Abstract:** The effects of different stocking densities on the growth and physiology of juvenile *Piaractus brachypomus* were evaluated in two experiments. Experiment I used juveniles weighing  $1.5 \pm 0.4$  g at the following densities for 20 days:  $D_{0.68}$ —0.68 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{1.45}$ —1.45 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{4.41}$ —4.41 kg/m<sup>3</sup>; and  $D_{7.17}$ —7.17 kg/m<sup>3</sup>. Experiment II used juveniles weighing  $6.66 \pm 1.3$  g at the following densities for 20 days:  $D_{1.0}$ —1.00 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{1.95}$ —1.95 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{5.63}$ —5.63 kg/m<sup>3</sup>, and  $D_{7.90}$ —7.90 kg/m<sup>3</sup>. Both experiments showed a reduction in dissolved oxygen levels in the water, with Experiment II showing a plateau effect from 2.34 kg/m<sup>3</sup> ( $p < 0.05$ ). Final weight, final length, weight gain, daily weight gain, and specific growth rate were inversely proportional to density ( $p < 0.05$ ), while final biomass, feed intake, and feed conversion were directly related to density in both experiments ( $p < 0.05$ ). At the end of Experiment II, plasma triglycerides decreased as stocking density increased ( $p < 0.05$ ), and hemoglobin and mean corpuscular volume were higher at the lowest density ( $D_{1.0}$ ) ( $p < 0.05$ ). High stocking densities reduced dissolved oxygen, characterizing a hypoxic state in both experiments, affecting growth and some physiological parameters. Therefore, studies testing stocking densities for *P. brachypomus* in normoxic situations are still needed.



Academic Editor: Yuanzi Huo  
Received: 10 March 2025

Revised: 4 April 2025

Accepted: 10 April 2025

Published: 11 April 2025

**Citation:** de Morais Carvalho Ananias, I.; dos Santos Silva, S.; de Sena Souza, A.; dos Santos, F.A.C.; Magalhães, T.B.; de Freitas Martins, W.J.; Favero, G.C.; Luz, R.K. Effects of Stocking Densities on the Growth Performance and Physiology of Juvenile *Piaractus brachypomus* in Recirculating Aquaculture System. *Fishes* **2025**, *10*, 171. <https://doi.org/10.3390/fishes10040171>

**Keywords:** growth; hypoxia; intensive production; pirapitinga; water quality

**Key Contribution:** The present study is the first to address different stocking densities in the production of juvenile pirapitingas *Piaractus brachypomus* (initial average weight of 1.5 g), in RAS, and with excellent growth responses.

## 1. Introduction

Closed production systems allow for greater control over production since water quality parameters can be managed compared to traditional systems [1]. Recirculating aquaculture systems (RASs) have the advantage of reduced water use, as only a small amount is replaced with clean water [2], which limits the risk of environmental contamination [3]. In addition, the versatility of the RAS allows its implementation in different climates and environments [4], enabling production in locations closer to markets. However, the assembly and maintenance of these filters and blowers, along with the uninterrupted

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

monitor and maintain the equipment.

Therefore, to make a RAS rearing system viable, it is necessary to determine the fish stocking density that allows maximum animal production without compromising their performance. Defined as the biomass or quantity of animals produced per tank [5], stocking density is an aspect of management that is of the utmost importance to produce any species [6], whatever the production system used. In addition to the efficiency of the system and the bacterial community present in the RAS [7], stocking density can directly influence fish growth and health [8–11]. Animal growth is inversely linked to stocking density due to competition for food and space [12–14], with influence on fish stress levels [10,15].

The health and well-being of fish can be determined through physiological analyses performed by evaluating hematological and blood biochemical indices [16]. Poorly dimensioned stocking density is considered a chronic stressor capable of affecting the physiological parameters of fish [17,18]. The so-called physiological chain is the name given to a series of physiological mechanisms that seek the adaptation of the animal to stress conditions, classified into three levels of responses [19]. In stressful situations, studies carried out with *Puntius sarana* show the influence of stocking density on hematological variables, increasing hematocrit and hemoglobin values [20]. Biochemical values can also be altered, since secondary responses to stress are related to glycolytic pathways, through gluconeogenesis to obtain energy for escape and/or adaptation [21], as reported by the increase in glycemia and changes in cholesterol and triglyceride levels of *Ictalurus punctatus* [22] and increased cortisol, glucose, cholesterol, and triglycerides of *Megalobrama amblycephala* [23]. Linked to energy metabolism, thyroid hormones can also be influenced by stocking density [24], as seen in *I. punctatus* [22].

Pirapitinga, also known as cachama blanca or “pacu de barriga vermelha” (*Piaractus brachypomus*), is a native fish of the Amazon and Orinoco River basins, and is easily found in northern Brazil, Colombia, Peru, Venezuela, and Ecuador [25,26]. In addition to its countries of origin, the species has been of importance in Indian [27,28] and Thai [29,30] aquaculture. In Brazil, the species is used for both consumption and for producing the hybrid tambatinga (*Colossoma macropomum* x *P. brachypomus*). It is widely produced in excavated tanks [27], and results for *P. brachypomus* production in intensive systems such as the RAS remain limited [31–34]. Thus, there is a need to carry out further studies to demonstrate the efficiency of producing the species in the RAS, with the aim of establishing adequate stocking densities for the different cultivation phases.

The present study, therefore, aimed to evaluate the effects of different stocking densities on the growth performance and physiological parameters of juvenile *P. brachypomus*.

## 2. Materials and Methods

The experiment was carried out at the Laboratório de Aquicultura (LAQUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brazil), and was divided into two experiments with all procedures previously approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG—n 17/2023), in 05/08/2023.

### 2.1. Experiment I

Experiment I used 798 juvenile *P. brachypomus*, with an initial weight (IW) of  $1.5 \pm 0.4$  g (media  $\pm$  standard deviation) and measuring  $4.5 \pm 0.5$  cm (media  $\pm$  standard deviation) in total length. The animals were distributed in 16 tanks with 28 L of useful volume, maintained in a RAS with homemade mechanical filters, made of acrylic blankets changed weekly, and homemade biological filters that we use as a biofilter. The crushed stone is stored in submerged boxes that allow water to contact the surface of the stones. We used a heating system (thermostat with heater, Warner, 200 w, Ocean Tech Professional Aquarium®, Porto Alegre, Brazil) and water pumping systems (submersible pump, SB2000, 1950 L/h, 30 w, Salobetter®, São Caetano do Sul, Brazil), and supplementary aeration from a compressor (2 HP radial compressor, CR-5, Ibram Ltd.a, São Paulo, Brazil) and porous air stones connected by 4 mm silicone hoses as diffusers. The water flow was kept at  $0.59 \pm 0.98$  L/min (media  $\pm$  standard deviation) for all tanks, resulting in a total of 30.24

renewals of tank volume per day. The following four stocking densities were tested, with four replicates each:  $D_{0.68}$ —0.68 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{1.45}$ —1.45 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{4.41}$ —4.41 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{7.17}$ —7.17 kg/m<sup>3</sup>.

Experiment I lasted 20 days due to rapid growth and limited space in the 28 L tank. The photoperiod was 12 h of light (Key West DNI group, digital timer).

The animals were fed a commercial extruded diet (1.3–1.5 mm in diameter) from the Wean Prime line (Total Rações<sup>®</sup>, Três Corações, Brazil) with 45% crude protein, 5% ether extract, 15% mineral matter (max.), 40% crude fiber (max.), 0.2% calcium (min.), 0.3% calcium (max.), 0.04% vitamin E (min.), and 0.1% vitamin C (min.) (manufacturer's data). Feeding was carried out three times a day (8:00, 12:00, and 16:00), with a feeding rate of 10% of the daily biomass [35]. The amount was readjusted after the 10th day of production through partial biometrics performed to obtain the average biomass of each tank, ultimately calculating the adjustment. The remaining feed was collected, dried in a forced circulation oven at 105 °C (Nova Etica/Ethink<sup>®</sup>), and subsequently weighed to calculate consumption and apparent feed conversion.

## 2.2. Experiment II

Experiment II used 2850 juvenile *P. brachypomus* with an initial weight (IW) of  $6.6 \pm 1.3$  g (media  $\pm$  standard deviation) and measuring  $8.0 \pm 0.5$  cm (media  $\pm$  standard deviation) in total length. The animals were distributed in 12 tanks, each with a useful volume of 100 L, maintained in a RAS with homemade mechanical filters made of acrylic blanket, changed weekly, and homemade biological filters that we used as a biofilter. The crushed stone was stored in submerged boxes that allowed contact between the water and the surface of the stones. We used a heating system (thermostat with heater, Warner, 200 w, Ocean Tech Professional Aquarium<sup>®</sup>, Porto Alegre, Brazil) and water pumping systems (submersible pump, SB2000, 1950 L/h, 30 w, Salobetter<sup>®</sup>, São Caetano do Sul, Brazil), along with supplementary aeration with compressor (2 HP radial compressor, CR-5, Ibram Ltd.a, SP, Brazil) and porous air stones connected by 4 mm silicone hoses as diffusers. The water flow was kept at  $1.12 \pm 0.12$  L/min (media  $\pm$  standard deviation) for all tanks, totaling 16.12 renewals of tank volume per day. The following four different stocking densities were tested, with three replicates each:  $D_{1.0}$ —1.00 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{1.95}$ —1.95 kg/m<sup>3</sup>;  $D_{5.63}$ —5.63 kg/m<sup>3</sup>, and  $D_{7.90}$ —7.90 kg/m<sup>3</sup>. Experiment II lasted for another 20 days due to rapid growth and limited space in the 100 L tank.

Due to the larger size of the animals, they were fed a commercial extruded diet of 2–3 mm in diameter from the Aquos Alevinos 45 line (Total Rações<sup>®</sup>, Três Corações, Brazil), containing 45% crude protein, 12% moisture, 8% ether extract, 15% mineral matter, 4% crude fiber, 0.002% calcium (min.), 0.003% calcium (max.), 0.8% phosphorus, and 0.06% vitamin C (manufacturer's data). Feed was offered three times a day (8:00, 12:00, and 16:00), with a feeding rate of 10% of daily biomass [35]. The amount was readjusted after the 10th day of production through partial biometrics performed to obtain the average biomass of each tank and finally calculate the adjustment. The remaining feed was collected, dried in a forced circulation oven at 105 °C (Nova Etica/Ethink<sup>®</sup>), and subsequently weighed to calculate consumption and apparent feed conversion.

## 2.3. Water Quality Analysis

In both experiments, temperature was measured three times a week using a multiparametric probe (Hanna Instruments HI98130, Hanna<sup>®</sup>, Barueri, Brazil) together with total ammonia (LabconTest Alcon<sup>®</sup> colorimetric kit, Camburiú, Brazil). The toxic ammonia (NH<sub>3</sub>) was calculated according to the table found in the kit. Dissolved oxygen (DO) (YSI multiparametric probe, EcoSense<sup>®</sup> DO200A, Yellow Springs Instruments Co., Inc., Yellow Springs, OH, USA) and pH were measured once a week.

## 2.4. Growth and Survival

Biometrics were performed after 10 and 20 days in both experiments. Weight was measured using a Marte 5000 digital analytical scale (accuracy of 0.001 g), with juveniles previously anesthetized with 20 mg/L of eugenol [36], while total length was measured

using an ichthyometer (accuracy of 0.1 cm). The following data were obtained:

- Initial weight (g) (IW);
- Initial total length (cm) (IL);
- Final weight (g) (FW);
- Final total length (cm) (FL);
- Weight gain (g) (WG) = FW – IW;
- Daily weight gain (g) (DWG) = (FW – IW)/ $\Delta T$ , where  $\Delta T$  is the duration of the experiment in days;
- Specific growth rate (%/day) (SGR) = 100 (ln FW – ln IW)/ $\Delta T$ , where  $\Delta T$  is the duration of the experiment in days;
- Final biomass (FB) (kg/m<sup>3</sup>), where all the weights of all the fish were added together and the value found was converted to kg/m<sup>3</sup>;
- Feed consumption (FC) (kg) = (feed offered (g) – feed leftover (g))/100
- Feed conversion rate (FCR) = consumption/(FB – IB), where IB is the initial biomass.

Survival was also determined after 20 days in both experiments and was calculated considering the following formula: survival (%) = (number of live juveniles  $\times$  100)/(total number of juveniles per tank).

### 2.5. Hematological and Biochemical Analysis

At the end of Experiment II (after 20 days of rearing), the animals were fasted for 24 h. Four fish from each tank (n = 12 per treatment) were anesthetized with eugenol (50 mg/L) [33], restrained with a damp cloth, and subjected to blood collection by caudal venipuncture with previously heparinized 1 mL syringes, collecting a total of 300  $\mu$ L of whole blood per fish.

Blood samples (50  $\mu$ L) were dispensed into microtubes containing sodium heparin anti-coagulant (10%) for determination of hemoglobin (tHb) using a commercial colorimetric kit (Quibasa-Biocrin, Belo Horizonte, MG, Brazil) and hematocrit (Ht) by the microhematocrit method [37] using capillary tubes.

Total plasma protein (TPP) was determined with an analog refractometer (0 to 90% Brix)—RHB0-90 after rupture of the microhematocrit tube. The number of erythrocytes (RBCs) was determined by diluting 10  $\mu$ L of whole blood in 2 mL of citrate formalin and then counting them in a Neubauer chamber.

The remaining whole blood (250  $\mu$ L) was centrifuged at 4000 RPM for 10 min (microcentrifuge SL-5AM SPINLAB CO<sup>®</sup>, Shenzhen, China) to separate the plasma (125  $\mu$ L) and determine the following biochemical parameters: glucose (GLU), triglycerides (TG), cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST). All analyses were performed by colorimetric method using commercial kits (Quibasa-Biocrin, Belo Horizonte, MG, Brazil), with readings on a Biochrom Libra S22 UV-VIS spectrophotometer (Biochrom Instruments, Cambridge, UK).

The hematimetric indices (mean corpuscular volume—MCV, mean corpuscular hemoglobin—MCH, and mean corpuscular hemoglobin concentration—MCHC) were calculated according to the formulations established by [38]. These analyses were not performed at the end of Experiment I due to the small size of the juveniles for blood collection.

### 2.6. Viscerosomatic and Hepatosomatic Indexes

After blood collection, the same four animals from each tank (n = 12 per treatment) were euthanized with 285 mg/L eugenol solution [39], and their viscera (stomach, intestine, pyloric cecum, liver, gallbladder, and perivisceral fat) and liver were collected to determine the following indices:

- Viscerosomatic Index (VSI) (%) = 100  $\times$  ((weight of total viscera (g)/body weight (g)).
- Hepatosomatic Index (HSI) (%) = 100  $\times$  (weight of liver/body weight).

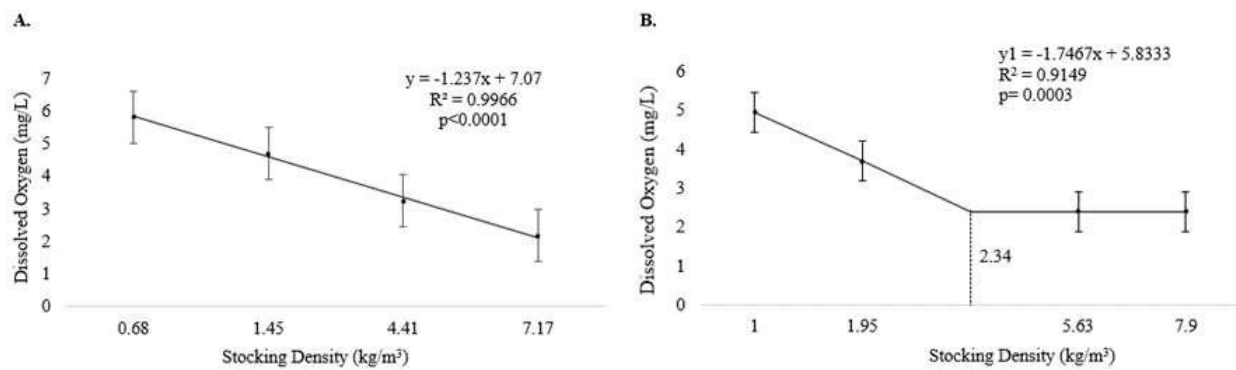
### 2.7. Statistical Analysis

The data from both experiments were tested for homoscedasticity and normality using Shapiro–Wilk and Levene’s tests, respectively. The data were then subjected to ANOVA

followed by regression tests. Variables that were not significant in regression tests were subjected to mean comparison using Tukey's test at 5% probability.

### 3. Results

During Experiment I, dissolved oxygen levels decreased linearly with increasing stocking density ( $p < 0.05$ ) (Figure 1A). Dissolved oxygen levels also decreased with increasing density during Experiment II, but only up to  $D_{1.95}$ , with constant values from  $2.34 \text{ kg/m}^3$  onwards, reflecting a plateau effect ( $p < 0.05$ ) (Figure 1B). The other water quality parameters were not influenced by stocking density ( $p > 0.05$ ) (Table 1).



**Figure 1.** Dissolved oxygen level (means and standard error) in culture tanks during the production of pirapitinga (*Piaractus brachyomus*) at different stocking densities. (A) Phase 1. (B) Phase 2.

Survival was not affected in either experiment, being  $94.05 \pm 12.13\%$  for Experiment I and  $99.28 \pm 1.19\%$  for Experiment II.

Final weight (Figure 2A), final length (Figure 2B), weight gain (Figure 2C), daily weight gain (Figure 2D), and SGR (Figure 2F) were inversely related to increasing stocking density ( $p < 0.05$ ) at the end of Experiment I. Final biomass (Figure 2E), feed consumption (Figure 2G), and feed conversion (Figure 2H) were directly related to increasing stocking density ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Water quality parameters (means  $\pm$  standard deviations) in culture tanks during the production of pirapitinga (*Piaractus brachyomus*) after 20 days of production in Experiment I and Experiment II at different stocking densities in RAS.

Stocking Densities	NH <sub>3</sub> (mg/L)	Temperature (°C)	pH
<b>Experiment I</b>			
D <sub>0.68</sub>	0.0153 $\pm$ 0.01	28.44 $\pm$ 0.45	6.53 $\pm$ 0.05
D <sub>1.45</sub>	0.0153 $\pm$ 0.01	28.34 $\pm$ 0.38	6.50 $\pm$ 0.08
D <sub>4.41</sub>	0.0153 $\pm$ 0.01	28.29 $\pm$ 0.27	6.48 $\pm$ 0.10
D <sub>7.17</sub>	0.0153 $\pm$ 0.00	28.19 $\pm$ 0.57	6.53 $\pm$ 0.10
<i>p</i> -value	0.7935	0.9928	0.8015
<b>Experiment II</b>			
D <sub>1</sub>	0.0256 $\pm$ 0.00	26.60 $\pm$ 2.63	7.07 $\pm$ 0.05
D <sub>1.95</sub>	0.0270 $\pm$ 0.00	25.75 $\pm$ 0.02	7.03 $\pm$ 0.05
D <sub>5.63</sub>	0.0265 $\pm$ 0.00	25.80 $\pm$ 0.09	7.03 $\pm$ 0.05
D <sub>7.9</sub>	0.0261 $\pm$ 0.00	25.77 $\pm$ 0.10;	7.03 $\pm$ 0.05
<i>p</i> -value	0.0770 $\pm$ 0.00	0.2527	0.8592

ANOVA and Tukey's test.

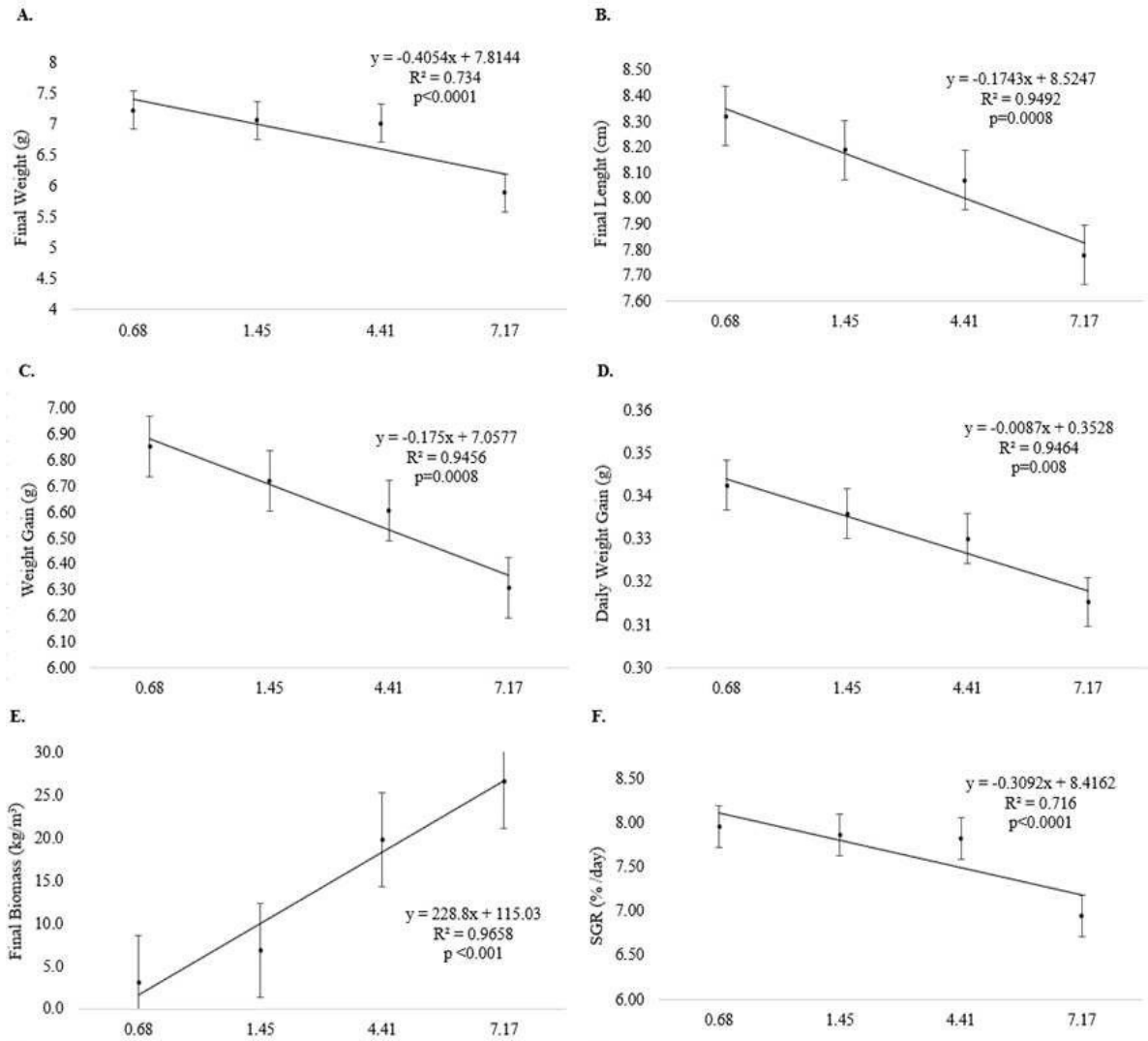
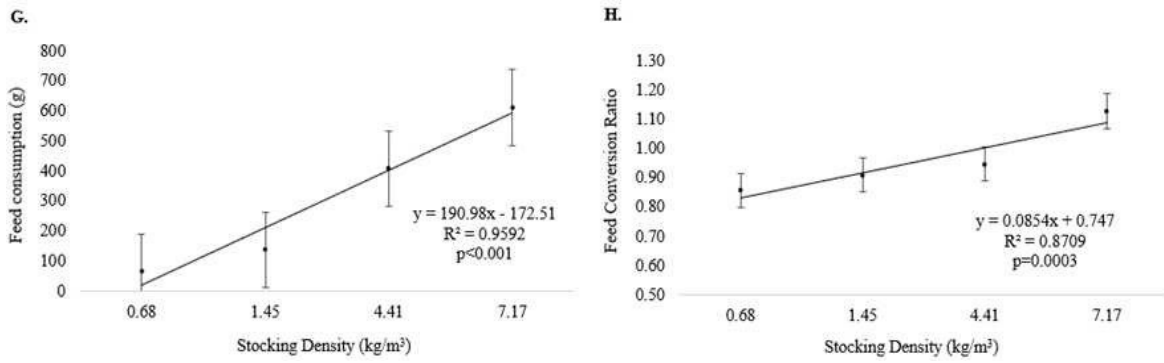
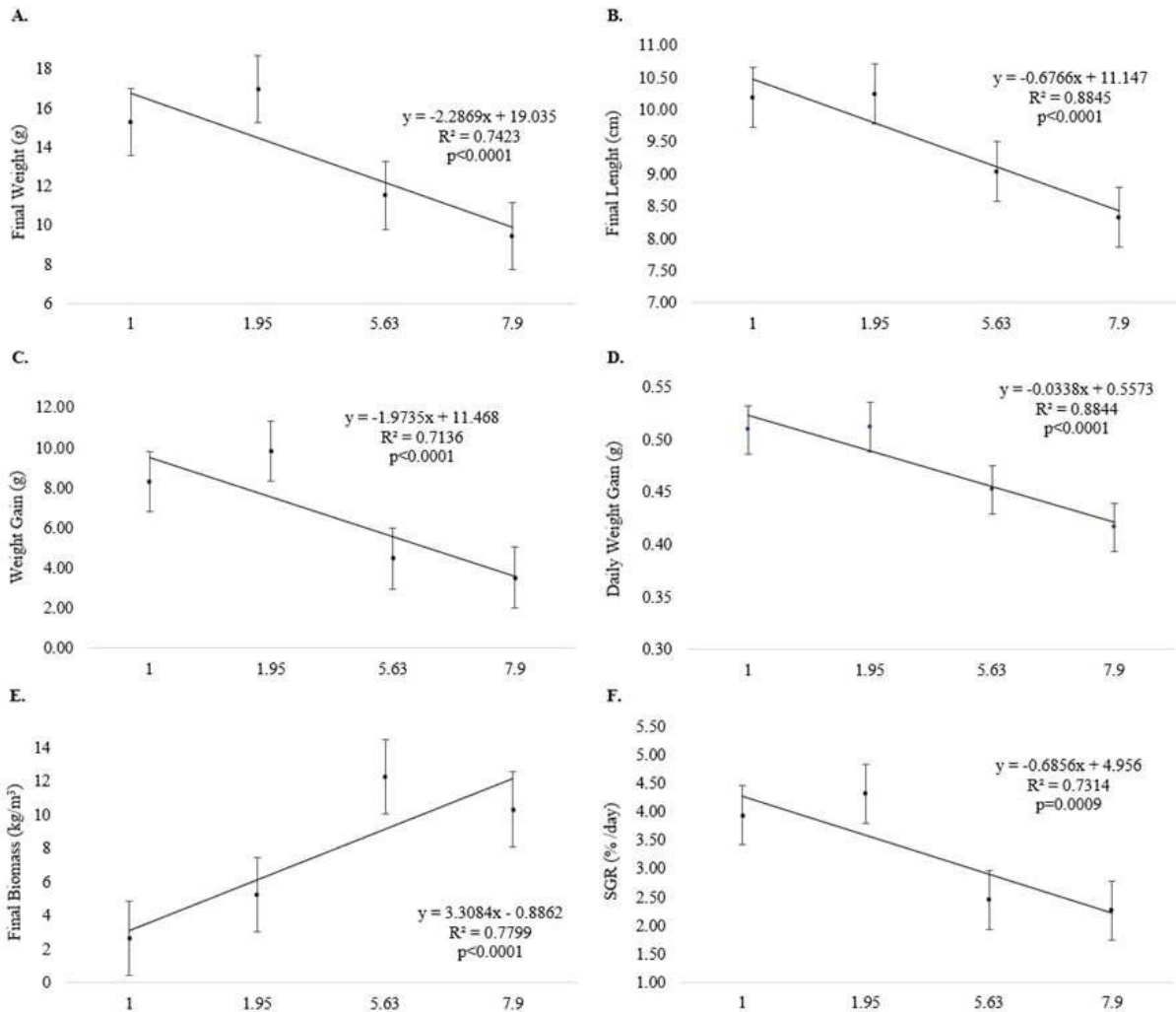


Figure 2. Cont.

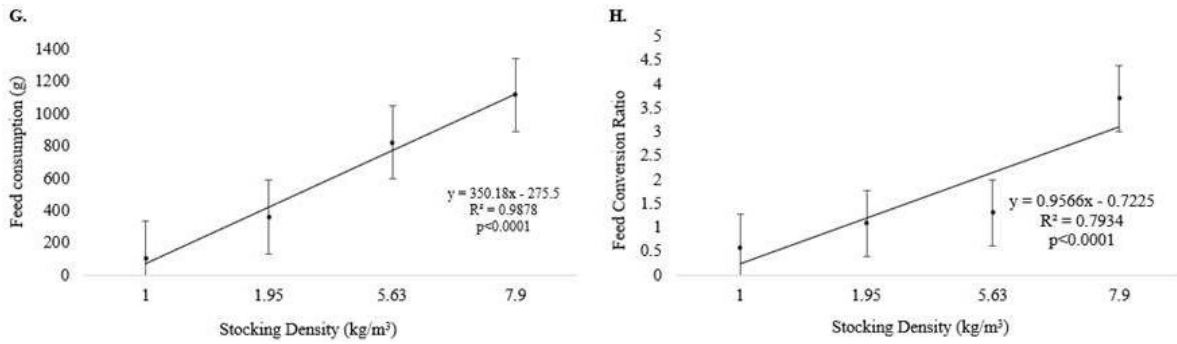


**Figure 2.** Growth performance (means and standard error) of juvenile pirapitinga (*Piaractus brachy-pomus*) after 20 days of culture in Phase 1 at different stocking densities in RAS. (A) Final weight, (B) final length, (C) weight gain, (D) daily weight gain, (E) final biomass, (F) specific growth rate, (G) feed consumption, and (H) feed conversion.

Final weight (Figure 3A), final length (Figure 3B), weight gain (Figure 3C), daily weight gain (Figure 3D), and SGR (Figure 3F) were inversely related to increasing stocking density ( $p < 0.05$ ) at the end of Experiment II. Final biomass (Figure 3E), feed consumption (Figure 3G), and feed conversion (Figure 3H) were directly related to increasing stocking density ( $p < 0.05$ ).

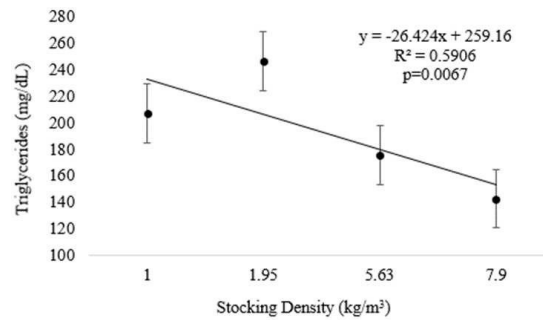


**Figure 3. Cont.**



**Figure 3.** Growth performance (means and standard error) of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of culture in Phase 2 at different stocking densities in RAS. (A) Final weight, (B) final length, (C) weight gain, (D) daily weight gain, (E) final biomass, (F) specific growth rate, (G) feed consumption, and (H) feed conversion.

At the end of Experiment II, plasma triglycerides were inversely related to increasing density (Figure 4 and Table 2) ( $p < 0.05$ ). There were no differences in the regression analyses for tHb and MCV; however, higher values were observed for the lowest density (D<sub>1.0</sub>) ( $p < 0.05$ ) (Table 1). The other variables analyzed, as well as VSI and HSI, did not differ significantly among treatments (Table 2).



**Figure 4.** Plasma triglycerides (means and standard error) of pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of culture in Phase 2 at different stocking densities in RAS.

**Table 2.** Hematological and biochemical parameters and viscerosomatic and hepatosomatic indices (means  $\pm$  standard error) for juvenile pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) after 20 days of production in Experiment II at different stocking densities in RAS.

Parameters	Stocking Density				Overall <i>p</i> -Value	Linear <i>p</i> -Value	Quadratic <i>p</i> -Value
	D <sub>1</sub>	D <sub>1.95</sub>	D <sub>5.63</sub>	D <sub>7.9</sub>			
GLU (mg/dL)	95.07 $\pm$ 1.21	81.55 $\pm$ 8.49	81.35 $\pm$ 6.26	93.75 $\pm$ 3.17	0.1505	0.7175	0.0520
TC (mg/dL)	100.29 $\pm$ 3.62	114.42 $\pm$ 9.29	109.87 $\pm$ 9.74	84.45 $\pm$ 7.79	0.1121	0.0891	0.0858
TG (mg/dL)	207.21 $\pm$ 26.46 <sup>ab</sup>	246.78 $\pm$ 53.22 <sup>a</sup>	175.54 $\pm$ 19.73 <sup>ab</sup>	142.88 $\pm$ 18.13 <sup>b</sup>	0.0233	0.0067*	0.7374
tHb (g/dL)	8.20 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	6.45 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	7.11 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	6.59 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.0472	0.1068	0.5191
Ht (%)	33.50 $\pm$ 1.23	23.83 $\pm$ 2.47	26.78 $\pm$ 2.69	28.92 $\pm$ 2.40	0.0829	0.7255	0.1201
TPP (g/dL)	4.88 $\pm$ 0.09	4.98 $\pm$ 0.16	5.07 $\pm$ 0.07	4.72 $\pm$ 0.15	0.2905	0.3333	0.1028
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	1.12 $\pm$ 0.18	1.38 $\pm$ 0.10	1.24 $\pm$ 0.07	1.28 $\pm$ 0.12	0.5376	0.7820	0.7500
AST (U/L)	39.42 $\pm$ 7.27	28.91 $\pm$ 2.91	31.01 $\pm$ 2.70	33.09 $\pm$ 4.28	0.4609	0.6670	0.3561
ALT (U/L)	9.29 $\pm$ 0.16	7.23 $\pm$ 0.36	8.48 $\pm$ 0.83	9.43 $\pm$ 0.83	0.1199	0.2589	0.2082
MCV (fl)	317.56 $\pm$ 44.49 <sup>a</sup>	178.57 $\pm$ 5.41 <sup>b</sup>	232.13 $\pm$ 32.25 <sup>ab</sup>	198.76 $\pm$ 16.27 <sup>b</sup>	0.0387	0.1300	0.4233
MCH (pg)	74.42 $\pm$ 11.70	48.92 $\pm$ 3.54	59.29 $\pm$ 2.57	55.44 $\pm$ 4.60	0.1210	0.3371	0.4499
MCHC (g/dL)	24.77 $\pm$ 1.32	27.56 $\pm$ 2.62	27.85 $\pm$ 3.33	21.06 $\pm$ 1.84	0.2392	0.2103	0.1124
VSI (%)	7.96 $\pm$ 0.46	7.28 $\pm$ 0.20	7.01 $\pm$ 0.31	7.42 $\pm$ 0.31	0.3029	0.3900	0.1329
HSI (%)	2.00 $\pm$ 0.07	1.85 $\pm$ 0.16	2.00 $\pm$ 0.14	1.90 $\pm$ 0.26	0.8952	0.9470	0.8391

ANOVA, Tukey's test, and regression tests. Means in the same row followed by different letters differ significantly by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). GLU—glucose; TC—total cholesterol; tHb—hemoglobin; TTP—total plasma protein; RBC—erythrocytes; AST—aspartate aminotransferase; ALT—alanine aminotransferase; MCV—mean corpuscular volume; MCH—mean corpuscular hemoglobin; MCHC—mean corpuscular hemoglobin concentration; VSI—Viscerosomatic Index; HSI—Hepatosomatic Index. \* Equation:  $Y = -26.424x + 259.16$ .

#### 4. Discussion

Dissolved oxygen was reduced at the higher stocking densities in both experiments, which may have affected the growth of juveniles kept at  $D_{4.41}$  and  $D_{7.17}$  during Experiment I, and  $D_{5.63}$  and  $D_{7.9}$  during Experiment II. The high survival and physiological changes observed in tHb, MCV, and TG highlight the oxiconforming characteristics of *P. brachypomus*. However, the adaptability of the species and the possibility of its production in the RAS are reinforced by survival rates exceeding 90% after the two experiments, along with unchanged somatic indices, as observed in previous studies [31–34].

Among the physico–chemical parameters of the water, only dissolved oxygen was influenced by stocking density in both experiments, which influenced the growth of juveniles. The ideal concentration of dissolved oxygen for rearing *P. brachypomus* has not yet been determined. However, rivers in the Amazon region have a large amount of organic matter and high water temperatures, variables that result in low levels of available dissolved oxygen [40–42]. These conditions have led Amazonian species to develop morphological and physiological adaptations to resist low oxygen concentrations [43,44]. The reduction in oxygen with increasing density in both phases of the experiment was a result like that found in studies with tambaqui (*C. macropomum*) in the RAS, also an Amazonian species [12,14]. For example, *C. macropomum* can withstand hypoxic conditions [45,46], including excellent recovery after periods of exposure to air [47]. The pacu (*Piaractus mesopotamicus*), although endemic to other river basins, belongs to the same genus as *P. brachypomus* and can also be reared in lower concentrations of dissolved oxygen, around 3 mg/L [48]. The high survival and growth of the juveniles after the experimental period of this study confirms the adaptation and production capacity of *P. brachypomus* in conditions of low oxygen availability, demonstrating its oxiconforming capacity even though its growth is reduced. However, there is still a need for more studies examining the tolerance of *P. brachypomus* in hypoxic situations, how their adaptation mechanisms are activated, as well as research on stocking density in normoxic conditions.

However, the maintenance of the other parameters means that the RAS used was efficient in maintaining water quality. As all the tanks were managed in the same way, future studies should aim to improve the aeration system of the RAS at high densities so that dissolved oxygen levels remain higher than those recorded here. Little is known about  $\text{NH}_3$  tolerance levels for *P. brachypomus* culture; however, *P. mesopotamicus*, used as a study object for  $\text{NH}_3$  toxicity, could withstand concentrations of up to 1.49 mg/L of total ammonia without symptoms of discomfort [49]. Similar studies were carried out with the tambacu hybrid (*C. macropomum* × *P. mesopotamicus*), which indicated an LC of 1.63 mg/L of  $\text{NH}_3$  [50]. Even with the low temperature for Amazonian fish in Experiment II, the daily weight gain, although affected by oxygen concentrations and stocking densities, together with the high survival rate, demonstrates the possibility of rearing *P. brachypomus* in regions with mild temperatures. Results like production in *C. macropomum* have been observed, allowing Amazonian species to be produced in colder regions [51,52].

The two experiments showed similar patterns in relation to growth parameters, except for biomass, feed consumption, and feed conversion ratio, all of which were inversely proportional to the increase in stocking density. These results suggest that space and low dissolved oxygen concentrations are limiting factors for the growth of *P. brachypomus*. Factors such as the species' biology, age, growth stage, and the type of system used determine the stocking density variable [53]. In addition to space limitations, there is an increase in energy demand due to competition for food at high stocking densities [13,54]. The low oxygen concentrations at the highest densities tested in the two experiments should also be considered when reducing the growth of juveniles. In situations of chronic stress, such as hypoxia resulting from the experiments and stocking densities, growth is reduced due to energy reorganization for homeostasis [55]. A study carried out with *C. macropomum* (0.54 g) at different densities (0.3, 0.6, and 0.9 kg/m<sup>3</sup>) also showed similar results, with a reduction in dissolved oxygen levels at higher densities and consequently lower growth at the same densities [14]. However, even under normoxic conditions, juvenile *C.*

*macropomum* with different size classifications suffered the influence of the stocking densities tested (34.88 g—0.5; 1.0; 1.6 kg/m<sup>3</sup>); (150.61 g—1.5; 3.0; 4.5 kg/m<sup>3</sup>); (300–400; 400–500 g—3.9 kg/m<sup>3</sup>) on their growth [13]. High stocking densities also reduced the development of individuals of *Prochilodus cearaensis* (0.09; 0.15; 0.3 g/L) [56], *Micropterus salmoides* (50; 75; 100 peixes/m<sup>3</sup>) [9], and *Clarias gariepinus* (100; 200; 400 kg/m<sup>3</sup>) [10], which is a common response for different species.

One of the indices used to assess the productivity of the system is the final biomass produced [57]. The final biomass, feed consumption, and feed conversion ratio increased with the increase in stocking density in both experiments. The increase in biomass is explained by the greater number of animals kept at the higher densities. However, the feed conversion ratio values remained between the averages of 0.86 and 1.13, results that have already been observed for the species [32,58]. Stocking density influences feeding competition behavior, oxygen consumption, and the response to stress in fish, consequently affecting the feeding rate [59], an influence that varies according to the species [60]. Feed consumption is linked to nutrient retention in fish; when it increases, retention is reduced, interfering with growth [60] and increasing feed conversion. However, in situations of hypoxia, feed consumption and feed conversion ratio are worsened, as reported for *C. macropomum* [14,61], channel catfish hybrids (*Ictalurus punctatus* x *Ictalurus furcatus*) [62], and Atlantic salmon (*Salmo salar*) [63].

Hematological and biochemical parameters and somatic indices can be used to assess an animal's stress condition. Somatic indices are linked to an animal's nutritional status [64], while biochemical and hematological parameters show the influence of stress factors on its health and metabolism [65]. The limited influence of stocking density in Experiment II of the study on unchanged biochemical and hematological parameters, combined with survival and growth performance data, shows the species' adaptation to the RAS. Changes in triglyceride levels are related to energy metabolism linked to glycolytic pathways [66]. Decreases in value may be linked to energy consumption as a way of adapting to stressful situations. Triglycerides are considered important indicators in conditions of high stocking density [67]. The reduction in triglyceride levels observed with the increase in stocking density and the hypoxic conditions resulting from overcrowding may indicate a form of energy consumption by the organism to adapt to its environment. The reduction in the lipedogram of fish under stressful conditions is related to glycolytic pathways, mainly gluconeogenesis, to produce glucose [21]. Nutritional studies carried out on juvenile *P. brachypomus*, testing cycles of food restriction [32] and low water temperature and feeding time [34] as stressors for the species, resulted in a decrease in plasma triglyceride levels. Different supplementations at two different stocking densities for *P. mesopotamicus* under normoxic conditions for the species promoted a reduction in triglyceride levels at the high density tested, regardless of the type of supplementation used [68]. However, studies with different densities of juvenile *C. macropomum* have also reported variations in lipid concentrations, although with an increase in triglyceride levels as stocking density increased [13,14]. The results suggest species-specific responses to this production management.

Hematimetric indices and variables such as tHb, Ht, and RBC are related to oxygen transport capacity in stressful situations [65]. The low MCV and tHb values observed at the highest densities (D<sub>1.95</sub>, D<sub>5.63</sub>, and D<sub>7.90</sub>) may be related not only to the increase in stocking density but also to the low oxygen concentrations available at the respective densities tested. In stressful situations, an increase in the indices related to the fish's blood count is to be expected, given the increased demand for oxygen in order to achieve homeostasis [65]. However, the results observed can be explained by the reduction in oxygen pressure in the water, which facilitates its uptake by increasing the affinity of hemoglobin for oxygen [69]. The results observed in this study may indicate an oxyconforming mechanism of the species. However, more studies are needed to prove this hypothesis and to report on the low oxygen conformation characteristics of *P. brachypomus*. Even with the change in hemoglobin and MCV values, they are still within the limits observed in other studies with the species [32–34], indicating that even with the influence of low oxygen and stocking densities, the well-being of *P. brachypomus* has not suffered major damage. Juveniles of

*C. macropomum* kept at densities of 4 and 6 kg/m<sup>3</sup> in a normoxic situation also showed lower hemoglobin levels than those kept at a lower density (2 kg/m<sup>3</sup>) [14]. Specimens of *Paralichthys olivaceus* kept at five different stocking densities and two dissolved oxygen concentrations showed changes in hemoglobin levels, but their quantity increased with the increase in available oxygen [70].

The other hematological and plasma biochemical indices were not influenced by stocking densities and hypoxia resulting from overcrowding. The responses to stress depend not only on the species and age of the animals, but also on the intensity of the stressor [65], so the conditions of this study did not cause serious problems for the physiology of *P. brachypomus*. *C. macropomum* juveniles kept at three stocking densities also showed no changes in TC, ALS, and AST levels [14].

## 5. Conclusions

Dissolved oxygen levels were reduced at the higher stocking densities, resulting in a hypoxic situation, directly influencing the growth of *P. brachypomus* juveniles in both experiments and the levels of triglycerides, hemoglobin rate, and MCV in Experiment II. The increase in feed consumption and feed conversion ratio made it impossible to produce *P. brachypomus* juveniles weighing 1.5 g at stocking densities above 4.41 kg/m<sup>3</sup> and juveniles weighing 6.6 g at stocking densities above 5.63 kg/m<sup>3</sup>. More studies are still needed on the production of *P. brachypomus* juveniles at high stocking densities under normoxic conditions.

**Author Contributions:** Conceptualization, methodology, validation, formal analysis, resources, investigation, writing—original draft, writing—reviewing and editing, visualization: I.d.M.C.A.; conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation: S.d.S.S., A.d.S.S., F.A.C.d.S., T.B.M., and W.J.d.F.M.; conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, writing—reviewing and editing, visualization, supervision, project administration, funding acquisition: G.C.F. and R.K.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil—402952/2021-9, 310170/2023-0, 316901/2021-0 and 402840/2023-2); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brasil); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil—finance code 001).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Ethics

Committee on Animal Use of Universidade Federal de Minas Gerais. (Protocol number: n 17/2023; Approval date: 5 August 2023).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the main text. Detailed numerical data will be made available to individuals upon request.

**Acknowledgments:** The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Ray, A. Biofloc technology for super-intensive shrimp culture. In *Biofloc Technology—A Practical Guide Book*, 2nd ed.; The World Aquaculture Society: Baton Rouge, LO, USA, 2012; Volume 167, p. 188.
2. Chun, S.-J.; Cui, Y.; Ahn, C.-Y.; Oh, H.-M. Improving water quality using settleable microalga *Ettlia* sp. and the bacterial community in freshwater recirculating aquaculture system of *Danio rerio*. *Water Res.* **2018**, *135*, 112–121. [[PubMed](#)]
3. Verdegem, M.C.J.; Bosma, R.H.; Verreth, J.A.J. Reducing water use for animal production through aquaculture. *Int. J. Water Resour. Dev.* **2006**, *22*, 101–113.
4. Martins, C.I.M.; Eding, E.H.; Verdegem, M.C.J.; Heinsbroek, L.T.N.; Schneider, O.; Blancheton, J.P.; d'Orbecastel, E.R.; Verreth, J.A.J. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* **2010**, *43*, 83–93. [[CrossRef](#)]
5. Sousa, R.M.; Silva, R.R.D.S.; Santos, A.S.D.; Silva, C.V.D.; Magalhães, J.A.; Fogaça, F.H.D.S.; Lopes, J.M. Tambatinga juveniles performance in a recirculation aquaculture system with different stocking densities. *RSD* **2020**, *9*, e178953317.
6. Karnatak, G.; Das, B.K.; Mishal, P.; Tayung, T.; Kumari, S.; Sarkar, U.K.; Das, A.K.; Ali, Y. Impact of stocking density on growth, feed utilization and survival of cage reared minor carp, *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in Maithon reservoir, India. *Aquaculture* **2021**, *532*, 736078.
7. Clois-Fuentes, J.; Nguinkal, J.A.; Unger, P.; Kreikemeyer, B.; Palm, H.W. Bacterial community in African catfish (*Clarias gariepinus*) recirculating aquaculture systems under different stocking densities. *Front. Mar. Sci.* **2023**, *10*, 1073250.
8. Yarahmadi, P.; Miandare, H.K.; Fayaz, S.; Caipang, C.M.A. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *48*, 43–53.
9. Wang, L.; Jia, S.; Guo, X.-R.; Lu, K.; Zhang, L.; Gong, J.; Guo, X.-P.; Hu, Y.; Cheng, T.; Shang, Q.; et al. Effect of stocking density on growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) cultured in containers in a land-based recirculating aquaculture system (C-RAS). *Aquac. Res.* **2021**, *53*, 1518–1526.
10. Bassmann, B.; Hahn, L.; Rebl, A.; Wenzel, L.C.; Hildebrand, M.-C.; Verleih, M.; Palm, H.W. Effects of stocking density, size, and external stress on growth and welfare of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) in a commercial RAS. *Fishes* **2023**, *8*, 74. [[CrossRef](#)]
11. Rebl, A.; Zebunke, M.; Borchel, A.; Bochert, R.; Verleih, M.; Goldammer, T. Microarray-predicted marker genes and molecular pathways indicating crowding stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2017**, *473*, 355–365.
12. Costa, O.T.F.D.; Dias, L.C.; Malmann, C.S.Y.; Lima Ferreira, C.A.D.; Carmo, I.B.D.; Wischneski, A.G.; Sousa, R.L.D.; Cavero, B.A.S.; Lameiras, J.L.V.; Santos, M.C. The effects of stocking density on the hematology, plasma protein profile and immunoglobulin production of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) farmed in Brazil. *Aquaculture* **2019**, *499*, 260–268.
13. Santos, F.A.C.; Boaventura, T.P.; Julio, G.S.C.; Cortezzi, P.P.; Figueiredo, L.G.; Favero, G.C.; Palheta, G.D.A.; Melo, N.F.A.C.; Luz, R.K. Growth performance and physiological parameters of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system (RAS): Importance of stocking density and classification. *Aquaculture* **2021**, *534*, 736274.
14. Ananias, I.D.M.C.; Silva, S.D.S.; Santos, F.A.C.D.; Souza, A.D.S.; Magalhães, T.B.; Reis, P.A.R.; Favero, G.C.; Luz, R.K. Tambaqui production at different stocking densities in RAS: Growth and physiology. *Fishes* **2024**, *9*, 19.
15. Sánchez, P.; Ambrosio, P.P.; Flos, R. Stocking density affects Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) growth independently of size dispersion, evaluated using an individual photo-identification technique. *Aquac. Res.* **2013**, *44*, 231–241.
16. Ahmed, I.; Reshi, Q.M.; Fazio, F. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: A review. *Aquacult Int* **2020**, *28*, 869–899.
17. Ruane, N.M.; Komen, H. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* **2003**, *218*, 685–693.
18. Khansari, A.R.; Balasch, J.C.; Vallejos-Vidal, E.; Teles, M.; Fierro-Castro, C.; Tort, L.; Reyes-López, F.E. Comparative study of stress and immune-related transcript outcomes triggered by *Vibrio anguillarum* bacterin and air exposure stress in liver and spleen of gilthead seabream (*Sparus aurata*), zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *86*, 436–448.
19. Barton, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* **2002**, *42*, 517–525.
20. Upadhyay, A.; Swain, H.S.; Das, B.K.; Ramtke, M.H.; Kumar, V.; Krishna, G.; Mohanty, B.P.; Chadha, N.K.; Das, A.K. Stocking density matters in open water cage culture: Influence on growth, digestive enzymes, haemato-immuno and stress responses of *Puntius sarana* (Ham, 1822). *Aquaculture* **2022**, *30*, 73745.
21. Nakano, T.; Kameda, M.; Shoji, Y.; Hayashi, S.; Yamaguchi, T.; Sato, M. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox. Biol.* **2014**, *5*, 772–776.
22. Refaey, M.M.; Li, D.; Tian, X.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Li, L.; Tang, R. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of Channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* **2018**, *492*, 73–81. [[CrossRef](#)]
23. Wang, Y.; Zhu, J.; Ge, X.; Sun, S.; Su, Y.; Li, B.; Hou, Y.; Ren, M. Effects of stocking density on the growth performance, digestive enzyme activities, antioxidant resistance, and intestinal microflora of Blunt Snout Bream (*Megalobrama Amblycephala*) juveniles. *Aquac. Res.* **2019**, *50*, 236–246. [[CrossRef](#)]
24. Fatima, S.; Izhar, S.; Usman, Z.; Rashid, F.; Kanwal, Z.; Jabeen, G.; Latif, A.A. Effects of high stocking density on condition

- factor and profile of free thyroxine and cortisol in *Catla catla* (Hamilton, 1822) and *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* **2018**, *18*, 217–221.
25. Escobar, L.M.D.; Ota, R.P.; Machado-Allison, A.; Andrade-López, J.; Farias, I.P.; Hrbek, T. A new species of *Piaractus* (Characi- formes: Serrasalminidae) from the Orinoco Basin with a redescription of *Piaractus brachyomus*. *J. Fish Biol.* **2019**, *95*, 411–427. [[CrossRef](#)]
  26. Kolmann, M.A.; Kalacska, M.; Lucanus, O.; Sousa, L.; Wainwright, D.; Arroyo-Mora, J.P.; Andrade, M.C. Hyperspectral data as a biodiversity screening tool can differentiate among diverse. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16157. [[CrossRef](#)]
  27. Kumar, A.; Pradhan, P.K.; Das, P.C.; Srivastava, S.M.; Lal, K.K.; Jena, J.K. Growth performance and compatibility of pacu, *Piaractus brachyomus* with Indian major carps in polyculture system. *Aquaculture* **2018**, *490*, 236–239. [[CrossRef](#)]
  28. Bharane, P.R.; Bethi, C.M.S.; Kudre, T.G. Effect of *Catla catla* roe protein isolate on textural and sensorial properties of surimi gel from *Piaractus brachyomus*. *Food Meas.* **2020**, *14*, 1391–1401. [[CrossRef](#)]
  29. Theerawoot, L. Diversity and distribution of external parasites from potentially cultured freshwater fishes in Nakhonsithammarat, Southern Thailand. *Dis. Asian Aquac.* **2008**, *6*, 235–244.
  30. Xiong, W.; Sui, X.; Liang, S.-H.; Chen, Y. Non-native freshwater fish species in China. *Rev. Fish Biol. Fish.* **2015**, *25*, 651–687. [[CrossRef](#)]
  31. Garcia, L.D.O.; Gutiérrez-Espinosa, M.; Wásquez-Torres, W.; Baldisserotto, B. Dietary protein levels in *Piaractus brachyomus* submitted to extremely acidic or alkaline pH. *Cienc. Rural* **2014**, *44*, 301–306. [[CrossRef](#)]
  32. Favero, G.C.; Santos, F.A.C.; Júlio, G.S.C.; Pedras, P.P.C.; Ferreira, A.L.; Silva, W.S.; Ferreira, N.S.; Neves, L.C.; Luz, R.K. Effects of short feed restriction cycles in *Piaractus brachyomus* juveniles. *Aquaculture* **2021**, *536*, 736465. [[CrossRef](#)]
  33. Ferreira, A.L.; Bonifácio, C.T.; Silva, W.S.; Takata, R.; Favero, G.C.; Luz, R.K. Anesthesia with eugenol and menthol for *Piaractus brachyomus* (Cuvier, 1818): Induction and recovery times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. *Aquaculture* **2021**, *544*, 737076. [[CrossRef](#)]
  34. Favero, G.C.; Santos, F.A.C.; Júlio, G.S.C.; Batista, F.S.; Bonifácio, C.T.; Torres, I.F.A.; Paranhos, C.O.; Luz, R.K. Effects of water temperature and feeding time on growth performance and physiological parameters of *Piaractus brachyomus* juveniles. *Aquaculture* **2022**, *548*, 737716. [[CrossRef](#)]
  35. Corrêa, R.O. Manejo alimentar. In *Criação de Tambaqui*; Correa, R.O., Sousa, A.R.B., Martins-Junior, H., Eds.; Embrapa: Brasília, Brazil, 2018; pp. 13–19.
  36. Santos, F.A.C.; Costa Julio, G.S.; Luz, R.K. Stocking density in *Colossoma macropomum* larviculture, a freshwater fish, in recirculating aquaculture system. *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 1185–1191. [[CrossRef](#)]
  37. Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.* **1971**, *56*, 35–39. [[CrossRef](#)]
  38. Wintrobe, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* **1934**, *51*, 32–49.
  39. Mattioli, C.C.; Takata, R.; Leme, F.O.P.; Costa, D.C.; Melillo Filho, R.; Silva, W.S.; Luz, R.K. The effects of acute and chronic exposure to water salinity on juveniles of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *Aquaculture* **2017**, *481*, 255–266. [[CrossRef](#)]
  40. Silva, E.R.M.D.; Costa, L.G.S.; Silva, A.D.S.; Souza, E.C.D.; Barbosa, I.C.D.C. Physical-chemical, chemistry and chemometric characterization of underground waters from pirabas and Barreiras Aquifers in municipalities of the state of Pará. *Rev. Bras. Geog. Fis.* **2018**, *11*, 1026–1041.
  41. Gomes, D.F.; Sanches, N.A.D.O.; Andrade, D.D.P.; Bastos, W.R. Occurrence of aquatic macroinvertebrates in an extratropical reserve of Brazilian Amazon. *Rev. Biol. Neotrop.* **2019**, *16*, 50–60. [[CrossRef](#)]
  42. Silva, E.C.D.; Gutjahr, A.L.N.; Braga, C.E.D.S. Caracterização físico-química da água de um rio urbano amazônico, Capanema, Pará, Brasil. *RSD* **2021**, *10*, e51101622866. [[CrossRef](#)]
  43. Burggren, W.W.; Arriaga-Bernal, J.C.; Méndez-Arzate, P.M.; Méndez-Sánchez, J.F. Metabolic physiology of the Mayan cichlid fish (*Mayaheros Urophthalmus*): Re-examination of classification as an oxyconformer. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2019**, *237*, 110538. [[CrossRef](#)]
  44. Braz-Mota, S.; Almeida-Val, V.M.F. Ecological adaptations of Amazonian fishes acquired during evolution under environmental variations in dissolved oxygen: A review of responses to hypoxia in fishes, featuring the hypoxia-tolerant *Astronotus* spp. *J. Exp. Zool. A* **2021**, *335*, 771–786. [[CrossRef](#)]
  45. Saint-Paul, U. Diurnal routine O<sub>2</sub> consumption at different O<sub>2</sub> concentrations by *Colossoma macropomum* and *Colossoma brachyomus* (Teleostei: Serrasalminidae). *CBPA* **1988**, *89*, 675–682.
  46. Neves, L.C.; Favero, G.C.; Beier, S.L.; Ferreira, N.S.; Palheta, G.D.A.; Melo, N.F.A.C.; Luz, R.K. Physiological and metabolic responses in juvenile *Colossoma macropomum* exposed to hypoxia. *Fish Physiol. Biochem.* **2020**, *46*, 2157–2167. [[CrossRef](#)]
  47. Neves, L.C.; Silva, W.S.; Ferreira, A.L.; Favero, G.C.; Beier, S.L.; Palheta, G.D.A.; Melo, N.F.A.C.; Luz, R.K. Physiological responses of juvenile *Colossoma macropomum* after different periods of air exposure. *Aquaculture* **2022**, *548*, 737583. [[CrossRef](#)]
  48. Lima, J.A.F.; Ferrari, V.A.; Colares de Melo, J.S.; Gaspar, L.A.; Chabalin, E.; Santos, E.P. Comportamento do pacu, *Colossoma mitrei*, em um cultivo experimental, no centro-oeste do Brasil. *Bol. Técnico CEPTA Cent. Pesqui. Treinamento Aquicultura* **1988**, *1*, 15–29.

49. Pinheiro, M.S.L.; Selini Dorce, L.; Momo Ziemniczak, H.; Honorato Da Silva, C.A.; Hertes Neu, D. Toxicidade aguda da amônia em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* **2021**, *19*, 1. [[CrossRef](#)]
50. Quaresma, F.D.S.; Santos, F.L.B.D.; Ribeiro, P.F.; Leite, L.A.; Sampaio, A.H. Acute toxicity of non-ionized ammonia on tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Ciên. Agron.* **2020**, *51*, e20186277. [[CrossRef](#)]
51. Dairiki, J.K.; Da Silva, T.B.A. *Revisão de Literatura: Exigências Nutricionais do Tambaqui—Compilação de Trabalhos, Formulação de Ração a e Desafios Futuros*; Embrapa Amazônica Ocidental: Manaus, Brazil, 2011; 44p.
52. Izel, A.C.U.; Crescencio, R.; O’Sullivan, F.L.d.A.; Chagas, E.C.; Boijink, C.d.L. *Cultivo do Tambaqui no Amazonas*; ABC da Agricultura Familiar; Embrapa Amazônica Ocidental: Manaus, Brazil, 2014; 51p.
53. Maeda, H.; Silva, P.C.; Aguiar, M.; Padua, D.M.C.; Oliveira, R.P.C.; Machado, N.P.; Rodrigues, V.; Silva, R.H. Efeitos da densidade de estocagem na segunda alevinagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), em sistema raceway. *R. Bras. Zootec.* **2006**, *7*, 265–272.
54. Li, H.W.; Brocksen, R.W. Approaches to the analysis of energetic costs of intraspecific competition for space by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* **1977**, *11*, 329–341. [[CrossRef](#)]
55. Melo, D.C.; Oliveira, D.A.A.; Melo, M.M.; Júnior, D.V.; Teixeira, E.A.; Guimarães, S.R. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2009**, *61*, 1183–1190.
56. Carvalho, M.A.M.D.; Costa, R.B.D.; Silva, L.D.A.; Oliveira, C.G.D.; Miranda, L.A.M.; Martins, L.P.; Sales, R.D.O.; Farias, J.O. Crescimento do curimatã comum, *Prochilodus cearaensis* (Steindachner, 1911) em sistema de recirculação de água (SRA) em três diferentes densidades de estocagem. *Rev. Bras. Hig. San. Anim.* **2020**, *14*, 1–8.
57. Ali, M.; Iqbal, F.; Salam, A.; Sial, F.; Athar, M. Comparative study of body composition of four fish species in relation to pond depth. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2006**, *2*, 359–364.
58. Angeles-Escobar, B.E.; Silva, S.M.B.C.; Severi, W. Growth, red blood cells, and gill alterations of red pacu (*Piaractus brachypomus*) fingerlings by chronic exposure to different total suspended solids in biofloc. *J. World Aquac. Soc.* **2022**, *53*, 652–668.
59. Houlihan, D.; Boujard, T.; Jobling, M. (Eds.) *Food Intake in Fish*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008.
60. Liu, Z.-S.; Zhang, L.; Chen, W.-L.; He, C.-F.; Qian, X.-Y.; Liu, W.-B.; Li, X.-F. Insights into the interaction between stocking density and feeding rate in fish *Megalobrama amblycephala* based on growth performance, innate immunity, antioxidant activity, and the GH-IGF1 axis. *Aquaculture* **2024**, *580*, 740355.
61. Izel-Silva, J.; Ono, E.A.; Queiroz, M.N.; Dos-Santos, R.B.; Affonso, E.G. Aeration strategy in the intensive culture of tambaqui, *Colossoma macropomum*, in the tropics. *Aquaculture* **2020**, *529*, 735644.
62. Torrans, L.; Ott, B.; Bosworth, B. Impact of minimum daily dissolved oxygen concentration on production performance of hybrid female channel catfish × male blue catfish. *N. Am. J. Aquac.* **2015**, *77*, 485–490.
63. Gamperl, A.K.; Ajiboye, O.O.; Zanuzzo, F.S.; Sandrelli, R.M.; Peroni, E.D.F.C.; Beemelmans, A. The impacts of increasing temperature and moderate hypoxia on the production characteristics, cardiac morphology and haematology of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2020**, *519*, 734874.
64. Luckenbach, J.A.; Murashige, R.; Daniels, H.V.; Godwin, J.; Borski, R.J. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **2007**, *146*, 95–104.
65. Urbinati, E.C.; Zanuzzo, F.S.; Biller-Takahashi, J.D. Estresse e sistema imune em peixes. In *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*; Baldisseroto, B., Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Eds.; FUNEP: Jaboticabal, Brazil, 2014; pp. 87–105.
66. Barton, B.A.; Iwama, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* **1991**, *1*, 3–26.
67. Qi, C.; Xie, C.; Tang, R.; Qin, X.; Wang, D.; Li, D. Effect of stocking density on growth, physiological responses, and body composition of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *J. World Aquac. Soc.* **2016**, *47*, 358–368. [[CrossRef](#)]
68. Bacchetta, C.; Rossi, A.S.; Ale, A.; Cazenave, J. Physiological effects of stocking density on the fish *Piaractus mesopotamicus* fed with red seaweed (*Pyropia columbina*) and β-carotene-supplemented diets. *Aquac. Res.* **2020**, *51*, 1992–2003. [[CrossRef](#)]
69. Baldisserotto, B. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*; UFSM: Santa Maria, Brazil, 2002; 49p.
70. Guo, H.-Y.; Dong, X.-Y.; Zhang, X.-M.; Zhang, P.-D.; Li, W.-T. Survival, growth and physiological responses of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. *J. Appl. Ichthyol.* **2017**, *33*, 731–739.

**7. ARTIGO III**

**Crescimento, respostas fisiológicas e purinérgicas, estado oxidativo e morfometria branquial de *Piaractus brachypomus* em RAS em diferentes densidades de estocagem**

Imaculada de Moraes Carvalho Ananias<sup>1</sup>, Sidney dos Santos Silva<sup>1</sup>, André de Sena Souza<sup>1</sup>, Fábio Aremil Costa dos Santos<sup>1</sup>, Nárcia Carolina Santos da Silva<sup>1</sup>, Isabela Maraschin Vieira<sup>2</sup>, Sílvio Teixeira da Costa<sup>2</sup>, Isabela Andres Finamor<sup>3,4</sup>, Caroline Azzolin Bressan<sup>3</sup>, Maria Amália Pavanato<sup>3</sup>, Bernardo Baldisserotto<sup>3</sup>, Matheus Dellaméa Baldissera<sup>4</sup>, Gisele Cristina Favero<sup>1</sup>, Ronald Kennedy Luz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Aquacultura, Departamento de Zootecnia de Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Santa Maria, RS CEP 97105-900, Brazil

<sup>4</sup>Universidade Franciscana, Rua dos Andradas 1614, Santa Maria, RS CEP 97010-033, Brazil

\*Autor Correspondente: Ronald Kennedy Luz, Laboratório de Aquacultura, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil.  
e-mail: [luzrk@yahoo.com](mailto:luzrk@yahoo.com); [luzrk@vet.ufmg.br](mailto:luzrk@vet.ufmg.br)

### **Resumo**

Foram avaliados o crescimento, os parâmetros fisiológicos, a sinalização purinérgica, o estado oxidativo e a morfometria branquial de juvenis de *Piaractus brachypomus* mantidos em diferentes densidades de estocagem em um RAS. O Experimento 1 utilizou 270 juvenis ( $29,55 \pm 3,10$  g) em densidades por 90 dias: D<sub>0,5</sub> – 0,5; D<sub>1,0</sub> – 1,0; e D<sub>1,60</sub> – 1,6 kg m<sup>-3</sup>. O Experimento 2 utilizou 108 juvenis ( $250,35 \pm 13,52$  g) em densidades por mais 90 dias: D<sub>1,5</sub> – 1,5; D<sub>3,0</sub> – 3,0; e D<sub>4,5</sub> – 4,5 kg m<sup>-3</sup>. No Experimento 1, a biomassa final foi maior em D<sub>1,6</sub>, e a conversão alimentar piorou em D<sub>0,5</sub>, e o consumo de ração foi maior nessa densidade. No Experimento 2, D<sub>3,0</sub> e D<sub>4,5</sub> apresentaram os maiores níveis de

biomassa e hemoglobina. O consumo de ração e a conversão alimentar foram piores na menor densidade testada (D<sub>1,5</sub>). Os outros parâmetros zootécnicos e fisiológicos não foram alterados. No Experimento 2, a densidade D<sub>4,5</sub> aumentou a atividade de SOD, GST e reduziu GSH no fígado. D<sub>3,0</sub> proporcionou maior atividade de CAT no fígado e GST e GSH no músculo. SOD no músculo apresentou a maior atividade em D<sub>1,5</sub>. A atividade da NTPDase para hidrólise de ATP foi a mais alta em D<sub>1,5</sub>. Tanto a altura das lamelas branquiais quanto o espaço interlamelar foram menores em D<sub>3,0</sub>. As mudanças no estado oxidativo e a redução nas atividades da NTPDase não afetaram o desempenho dos juvenis de *P. brachypomus* em nenhum dos experimentos. Densidades de estocagem de 1,6 e 4,5 kg m<sup>-3</sup> são recomendadas para produzir 29,55 g e 250 g de *P. brachypomus*, respectivamente, por 90 dias.

**Palavras chaves:** biomassa, estresse, hematologia, histologia branquial, pirapitinga

## 1. Introdução

A pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), oriunda das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (Sandoval-Vargas et al., 2020), possui importância para a aquicultura sul-americana (Garcia et al., 2013; Valladão et al., 2018), com destaque também para a produção asiática (Abraham et al., 2017; Kumar et al., 2018). Considerada uma espécie resistente e com boa qualidade de carne (Valadão et al., 2018; Diaz et al., 2020), além de ser destinada ao consumo, também é utilizada para a produção de híbridos como a tambatinga (*Colossoma macropomum* x *P. brachypomus*) e a patinga (*Piaractus mesopotamicus* x *P. brachypomus*). Seu cultivo é feito predominantemente em viveiros escavados (Sandoval-Vargas et al., 2020). Porém, alguns trabalhos já mostraram sucesso para a produção em sistema de recirculação de água (RAS) (Favero et al., 2021; Favero 2022; Ferreira et al., 2023).

Uma das estratégias para intensificar a produção de peixes é aumentar a densidade de estocagem. Porém, a densidade inadequada pode ser considerada um fator de estresse que pode influenciar o desempenho (Li et al., 2021; Wang et al., 2022), a saúde e bem-estar dos animais (Barton, 2002; Baldwin, 2011; Stevens et al., 2017) e a própria eficiência do RAS (Clols-Fuentes et al., 2023). De maneira geral, o estresse interfere no organismo do animal como um todo, sendo ativado em efeito cascata, primariamente na percepção neurológica, através dos receptores presentes no eixo hipotalâmico-hipofisário

(Barton, 2002; Jerez- Cepa, 2021) seguido por alterações nos níveis fisiológicos dos peixes e como respostas terciárias, exaustão do organismo, afetando o crescimento, comportamento, a reprodução e resistência a doenças, podendo levar o animal a morte (Barton e Iwama 1991). Além disso, diferentes densidades de estocagem podem levar a variações nos valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos (Qi et al., 2016; Santos et al., 2021; Ananias et al., 2024), índices somáticos (Santos et al., 2021; Ananias et al., 2024), enzimas hepáticas (Refaey et al., 2018) e oxidativas (Refaey et al., 2022; Nahida et al., 2025).

Embora existam relatos sobre a influência de diferentes agentes estressantes no sistema purinérgico em peixes (Piato et al., 2011; Leite et al., 2013; Souza et al., 2020), ainda não há dados da influência da densidade de estocagem. O sistema purinérgico é uma via de sinalização crucial em vários processos fisiológicos, incluindo as respostas imune e inflamatória (Savio et al., 2021), e é composto por três elementos principais: 1) nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, que atuam como moléculas mediadoras na sinalização; 2) receptores purinérgicos específicos (P2X, P2Y e P1), que são canais pelos quais nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos; e 3) ectoenzimas, que são responsáveis por regular os níveis desses mediadores no ambiente extracelular (Ai et al., 2023). Os nucleotídeos adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), assim como o nucleosídeo adenosina (Ado), são considerados importantes moléculas de sinalização no ambiente extracelular, participando ativamente da resposta imune durante condições de estresse fisiológico em peixes, como durante o estresse de manejo (Baldissera et al., 2020) e o estresse térmico (Souza et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da densidade de estocagem no crescimento, respostas fisiológicas, a sinalização purinérgicas, o estresse oxidativo e a morfometria branquial dos juvenis de *P. brachypomus* produzidos em RAS.

## **2. Material e Métodos**

O estudo foi realizado no Laboratório de Aquicultura (LAQUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil) e dividido em dois experimentos, com todos os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG - nº 138/2023).

### **2.1. Experimento 1**

Foram utilizados 270 juvenis de *P. brachypomus* ( $29,55 \pm 3,10$  g e  $10,96 \pm 0,94$  cm). Os animais foram distribuídos em nove tanques com volume útil de  $0,8$  m<sup>3</sup>, montados em sistemas RAS individuais (Santos et al., 2021). Cada tanque continha um sistema “*air-lift*” acoplado a filtro mecânico e biológico. O “*air-lift*” proporcionou vazão média de  $0,89$  m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>, filtrando aproximadamente 27 vezes o volume por dia. Cada sistema também possuía aquecimento da água e aeração suplementar. Três densidades de estocagem foram testadas: D0,5 -  $0,5$  kg m<sup>-3</sup>; D1,0 -  $1,0$  kg m<sup>-3</sup>; e D1,6 -  $1,6$  kg m<sup>-3</sup>. O experimento durou 90 dias. O fotoperíodo foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, controlado por temporizador digital (Key West DNI Group).

Nos primeiros 45 dias, os peixes receberam ração comercial extrusada (3–4 mm) da linha Aquos Starter (Total Rações®) contendo 36% de proteína bruta, 12% de umidade, 7% de extrato etéreo, 14% de matéria mineral e 5% de fibra bruta (dados do fabricante). A partir do dia 46, a mesma ração foi fornecida, porém na granulometria 4–6 mm. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 e 15:00) até a observação de pequenas sobras, que foram coletadas e secas para cálculo do consumo e conversão alimentar.

## 2.2. Experimento 2

Foram utilizados 108 juvenis de *P. brachypomus* ( $250,35 \pm 13,52$  g e  $23,05 \pm 0,96$  cm). Os animais foram distribuídos em nove tanques de  $0,8$  m<sup>3</sup> com sistemas RAS individuais, como descrito no Experimento 1. Três densidades de estocagem foram avaliadas: D1,5 –  $1,5$  kg m<sup>-3</sup>; D3,0 –  $3,0$  kg m<sup>-3</sup>; e D4,5 –  $4,5$  kg m<sup>-3</sup>. O experimento teve duração de 90 dias. O fotoperíodo foi de 12 horas claro e 12 horas escuro, controlado por temporizador digital (Key West DNI Group). A mesma ração extrusada (4–6 mm) utilizada no Experimento 1 foi fornecida duas vezes ao dia (09:00 e 15:00), até que pequenas sobras fossem observadas, que foram coletadas e secas para cálculo do consumo e conversão alimentar.

## 2.3. Qualidade de água

Em ambos os experimentos, a temperatura foi medida três vezes por semana usando uma sonda multiparâmetros (Hanna Instruments HI98130, Hanna®, Barueri, SP, Brasil), mantendo-se em  $28,22 \pm 1,03$ °C no primeiro experimento e  $28,46 \pm 0,45$ °C no segundo. Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) (sonda multiparâmetros YSI EcoSense® DO200A) e pH foram medidos semanalmente, sendo o OD de  $7,27 \pm 1,34$  mg L<sup>-1</sup> no

primeiro experimento e  $6,57 \pm 0,59 \text{ mg L}^{-1}$  no segundo, enquanto o pH foi de  $7,25 \pm 0,37$  no Experimento 1 e  $7,08 \pm 0,18$  no Experimento 2.

Os níveis de amônia foram mantidos abaixo de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , monitorados com kit colorimétrico LabconTest (Alcon®, Camboriú, SC, Brasil). Para isso, trocas parciais de água de 20% do volume total dos tanques foram realizadas a cada três dias.

#### 2.4.Crescimento e sobrevivência

A biometria e a contagem dos peixes foram realizadas ao final de cada experimento. O peso foi determinado após anestesia com  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol (Ferreira et al., 2021), utilizando balança digital (Wellmix 10 kg Digital 82.674/wx502). O comprimento total foi medido com ictiômetro com precisão de 0,1 cm. A partir dos dados coletados foram determinados:

- Peso inicial (PI)
- Peso final (PF)
- Comprimento total final (CTF)
- Ganho de peso (GP) = PF – PI
- Taxa de crescimento específico (TCE, % dia<sup>-1</sup>) =  $100 (\ln \text{PF} - \ln \text{PI}) / \Delta T$ , onde  $\Delta T$  representa a duração do experimento em números de dias
- Ganho de peso diário (g dia<sup>-1</sup>) =  $(\text{PF} - \text{PI}) / \Delta T$
- Biomassa final (kg m<sup>-3</sup>)
- Consumo alimentar (g peixe dia<sup>-1</sup>) =  $((\text{ração oferecida} - \text{sobra}) / \text{n}^\circ \text{ de peixes}) / \Delta T$
- Conversão alimentar aparente (CAA) =  $\text{consumo} / (\text{biomassa final} - \text{biomassa inicial})$
- Sobrevivência final (%) =  $100 \times (\text{n}^\circ \text{ de peixes final} / \text{n}^\circ \text{ inicial})$

#### 2.5.Análises hematológicas e bioquímicas

Ao final de cada experimento, os peixes foram submetidos a jejum de 24 h. Cinco peixes por tanque (n=15 por tratamento) foram anestesiados e o sangue foi coletado por venopunção caudal com seringas heparinizadas. Amostras foram usadas para determinação de hemoglobina (kit Bioclin®), hematócrito (método microhematócrito) e proteínas plasmáticas totais (refratômetro). A contagem de hemácias foi realizada diluindo 10 µL de sangue em 2 mL de formalina citratada e leitura em câmara de Neubauer.

O sangue restante foi centrifugado (1792 x g, 10 min) para análises bioquímicas (glicose, triglicerídeos, colesterol total, ALT, AST e lactado (experimento 2)) com kits Bioclin® em espectrofotômetro semi-automático.

Os índices hematimétricos foram calculados conforme Wintrobe (1934):

- $VCM = \text{Hematócrito} \times 10 / \text{Hemácias}$
- $HCM = \text{Hemoglobina} \times 10 / \text{Hemácias}$
- $CHCM = \text{Hemoglobina} \times 100 / \text{Hematócrito}$

## 2.6. Índices somáticos

Após a coleta de sangue, os peixes foram eutanasiados com 285 mg L<sup>-1</sup> de eugenol. Vísceras, gordura visceral e fígado foram pesados para cálculo dos índices:

- $IVS = 100 \times ((\text{vísceras} + \text{gordura visceral})/\text{peso corporal})$
- $IHS = 100 \times (\text{fígado}/\text{peso corporal})$
- $IVG = 100 \times (\text{gordura visceral}/\text{peso corporal})$

## 2.7. Morfometria e rendimentos de filé e carcaça

Ao final do Experimento 2, também foram coletados dados morfométricos utilizando um ictiômetro (precisão de 0,1 cm) e um paquímetro digital (precisão de 0,1 cm), conforme mostrado abaixo, para determinar os seguintes índices (Figura 1):

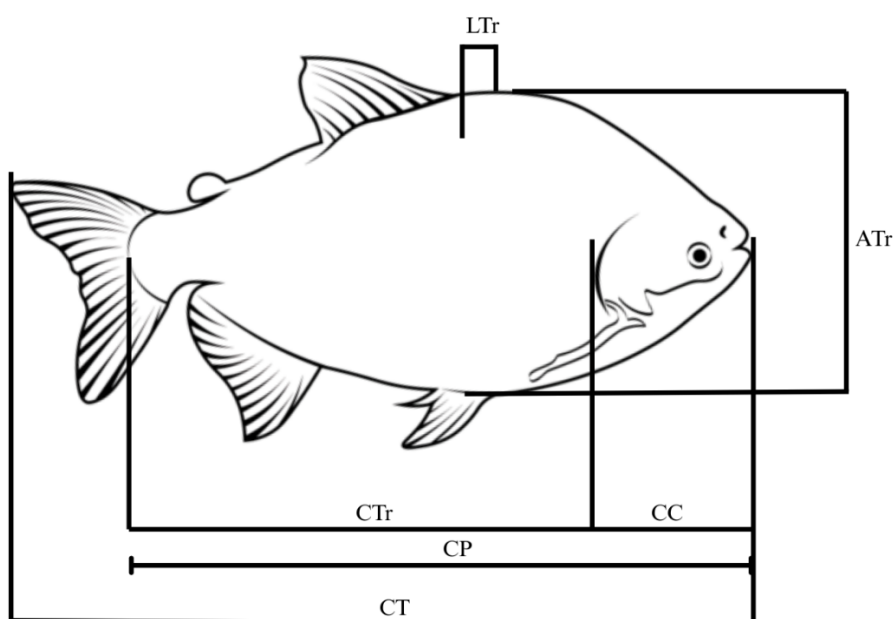


Figura 1. Diagrama das medidas morfométricas de *Piaractus brachypomus*. CT - comprimento total (cm), CP - comprimento padrão (cm), CTr - comprimento do tronco (cm), CC - comprimento da cabeça (cm), ATr - altura do tronco (cm), LTr - largura do tronco (cm). Relação comprimento da cabeça/comprimento

padrão = CC/CP; Relação comprimento padrão/comprimento total = CP/CT; Relação largura do tronco/comprimento do tronco = LTr/CTr; Relação largura do tronco/altura do tronco = LTr/ATr; Relação altura do tronco/comprimento do tronco = ATr/CTr.

Os animais eutanasiados também foram utilizados para a análise do rendimento de carcaça. Imediatamente após a remoção das vísceras, os peixes foram filetados, retirando-se os dois filés com costelas para pesagem e determinação do rendimento:

- Rendimento de filé =  $100 \times (\text{peso do filé (g)} / \text{peso corporal (g)})$
- Rendimento de carcaça =  $100 \times ((\text{peso do filé (g)} + \text{peso do corte com costelas (g)}) / \text{peso corporal (g)})$

## 2.8. Indicadores de Estresse Oxidativo

Ao final do Experimento 2, uma porção dos tecidos musculares e hepáticos foi imediatamente congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram descongeladas, pesadas, maceradas e homogeneizadas (homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem) (1:10 p/v) em solução específica para cada análise enzimática. As amostras foram centrifugadas por 5 min a  $10.000 \times g$ , em centrífuga refrigerada, e a fração sobrenadante foi utilizada para determinar os níveis de glutathione reduzida (GSH) (Ellman, 1959), glutathione S-transferase (GST) (Habig et al., 1974), superóxido dismutase (SOD) (Misra e Fridovich, 1972), catalase (CAT) (Aebi, 1984), peroxidação lipídica (TBARS) (Hermes-Lima et al., 1995), ácido ascórbico (Roe e Kuether, 1943) e níveis de proteínas no fígado e no músculo (Bradford, 1976).

## 2.9. Histologia

Peixes eutanasiados no Experimento 2 também foram utilizados para a coleta de uma porção do arco branquial, que foi colocada individualmente em tubos contendo solução de Bouin por 24 h, seguida de armazenamento em etanol 70% para posterior processamento. Os tecidos foram incluídos em parafina para obtenção de cortes histológicos com  $5 \mu\text{m}$  de espessura. As lâminas histológicas foram preparadas de acordo com protocolos de coloração hematoxilina-eosina. As lâminas foram observadas e fotomicrografadas em microscópio (Axio Scope.A1) com sistema digital de captura de imagens acoplado (AxioCam 105, ZEISS®, Jena, Alemanha). Seis campos de grande aumento foram selecionados aleatoriamente em cada lâmina para medir a altura total das lamelas e a distância interlamelar (Gressler et al., 2016), utilizando o software ImageJ®. A Figura 2 ilustra como foram realizadas as medições da altura total das lamelas (Figura 2A) e da distância interlamelar (Figura 2C).

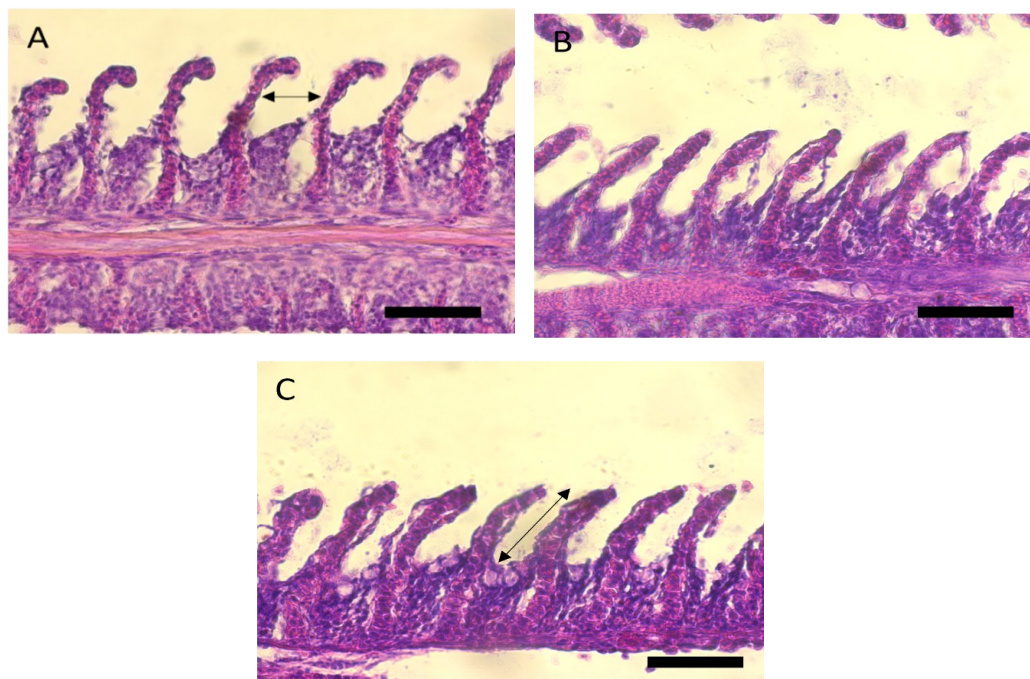


Figura 4. Histologia de brânquias demonstrando as medidas morfométricas de altura total das lamelas e distância interlamelar de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS.

#### 2.10. Sinalização Purinérgica

Porções do músculo e do rim cefálico foram removidas e dissecadas em placas de vidro sobre gelo, homogeneizadas (1:10 p/v) em tubos de vidro Potter com tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e centrifugadas a  $2000 \times g$  por 10 min. Os sobrenadantes foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

As atividades de NTPDase (ATP ou ADP como substratos) e 5'-nucleotidase foram avaliadas espectrofotometricamente a 630 nm, de acordo com o protocolo estabelecido por Rosemberg et al. (2010) e descrito em detalhe por Baldissera et al. (2019). A atividade enzimática foi expressa como nmol de fosfato inorgânico (Pi) liberado  $\text{min}^{-1} \text{mg}$  de proteína $^{-1}$ . A atividade de ADA foi medida espectrofotometricamente com base na liberação direta de amônia gerada quando a enzima atua sobre ADO, conforme previamente relatado por Giusti e Gakis (1971) e recentemente descrito em detalhe por Baldissera et al. (2019). A atividade enzimática foi expressa como U  $\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ . A concentração proteica foi determinada pelo método baseado no corante Coomassie Blue G (Read e Northcote, 1981), utilizando albumina bovina como padrão.

#### 2.11. Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à homocedasticidade e normalidade pelos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Em seguida, foram submetidos à ANOVA unidirecional (one-way ANOVA) para comparação do efeito da densidade de estocagem sobre as variáveis analisadas, seguida do teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de 5%. As variáveis que não atenderam aos pressupostos foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 95% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R.

### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1

A maioria dos parâmetros de desempenho dos juvenis de *P. brachypomus* não foi significativamente afetada pelas densidades de estocagem testadas, exceto a biomassa final, com valores significativamente maiores em D1,6 ( $p < 0,05$ ), e o consumo de ração e FCR foram piores em D0,5 ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Desempenho zootécnico (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 1).

Parâmetros	Densidades de Estocagem (kg m <sup>-3</sup> )			p-valor
	D <sub>0,5</sub>	D <sub>1,0</sub>	D <sub>1,6</sub>	
Peso final (g)	236,18 $\pm$ 29,04	246,86 $\pm$ 18,38	255,09 $\pm$ 9,65	0,8150
Comprimento final (cm)	23,21 $\pm$ 1,06	23,08 $\pm$ 0,72	22,59 $\pm$ 0,20	0,8300
Ganho de peso (g)	206,47 $\pm$ 29,04	225,38 $\pm$ 18,38	217,15 $\pm$ 9,65	0,8150
GPD (g dia <sup>-1</sup> )	2,29 $\pm$ 0,32	2,50 $\pm$ 0,20	2,41 $\pm$ 0,11	0,8150
TCE (% dia <sup>-1</sup> )	2,28 $\pm$ 0,15	2,38 $\pm$ 0,08	2,35 $\pm$ 0,04	0,7881
Biomassa final (kg m <sup>-3</sup> )	3,68 $\pm$ 0,57 <sup>c</sup>	8,76 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>	11,84 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	0,0004
Consumo alimentar (g peixe dia <sup>-1</sup> )	4,63 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	3,52 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	3,16 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	0,0124
CAA	1,97 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	1,24 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,0402
Sobrevivência (%)	84,44 $\pm$ 5,88	90,00 $\pm$ 1,93	85,18 $\pm$ 4,86	0,6624

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e Tukey ( $p < 0,05$ ). GPD – ganho de peso diário; TCE – taxa de crescimento específico; CAA – taxa de conversão alimentar aparente.

As variáveis hematológicas e bioquímicas do sangue não apresentaram diferenças significativas entre as densidades testadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Hematologia e bioquímica sanguínea (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 1).

Parâmetros	Densidades de Estocagem (kg m <sup>-3</sup> )			p-valor
	D <sub>0,5</sub>	D <sub>1,0</sub>	D <sub>1,6</sub>	
Hematócrito (%)	28,93 $\pm$ 0,87	27,93 $\pm$ 1,10	27,60 $\pm$ 1,73	0,7582
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8,91 $\pm$ 0,23	9,32 $\pm$ 0,54	8,85 $\pm$ 0,79	0,8241
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> $\mu$ L <sup>-1</sup> )	0,68 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,07	0,1952
VCM (fL)	428,57 $\pm$ 29,66	447,40 $\pm$ 27,14	404,10 $\pm$ 7,48	0,1591
GCM (pg)	132,01 $\pm$ 7,75	151,36 $\pm$ 18,96	127,54 $\pm$ 5,75	0,1952
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	30,82 $\pm$ 0,28	33,78 $\pm$ 1,65	31,57 $\pm$ 0,90	0,2211
PPT (g dL <sup>-1</sup> )	5,29 $\pm$ 0,25	4,99 $\pm$ 0,04	5,02 $\pm$ 0,11	0,3905
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	74,86 $\pm$ 5,69	68,84 $\pm$ 3,43	62,56 $\pm$ 3,85	0,2263
Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	240,78 $\pm$ 22,56	250,84 $\pm$ 11,15	191,98 $\pm$ 23,37	0,1605
Triglicerídeos (mg dL <sup>-1</sup> )	344,33 $\pm$ 70,21	340,47 $\pm$ 20,33	384,43 $\pm$ 50,70	0,8052
AST (UI L <sup>-1</sup> )	108,11 $\pm$ 6,96	102,27 $\pm$ 6,69	69,11 $\pm$ 18,02	0,1130
ALT (UI L <sup>-1</sup> )	6,84 $\pm$ 0,34	7,13 $\pm$ 0,93	8,33 $\pm$ 2,85	0,8197

VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT – proteína plasmática total; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase.

Não houve efeito significativo das densidades de estocagem sobre os índices somáticos ( $p > 0.05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Índices somáticos (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 1).

Índices (%)	Densidades de Estocagem (kg m <sup>-3</sup> )			p-valor
	D <sub>0,5</sub>	D <sub>1,0</sub>	D <sub>1,6</sub>	
IVS	1,56 $\pm$ 0,10	2,11 $\pm$ 0,18	2,46 $\pm$ 0,29	0,0546
IHS	0,74 $\pm$ 0,06	0,90 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,17	0,2155
IGV	1,76 $\pm$ 0,21	1,74 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,39	0,8910

IVS – índice viscerossomático; IHS – índice hepatossomático; IGV – índice de gordura visceral.

### 3.2. Experimento 2

A biomassa final foi significativamente maior nas densidades D3 e D4,5 ( $p < 0,05$ ). O consumo de ração foi maior na menor densidade testada (D1,5) e a CAA foi melhor em D3,0 do que em D4,5 ( $p < 0,05$ ). Os demais parâmetros zootécnicos não foram significativamente afetados pelas densidades testadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2).

Parâmetros	Densidades de estocagem ( $\text{kg m}^{-3}$ )			p-valor
	D <sub>1,5</sub>	D <sub>3,0</sub>	D <sub>4,5</sub>	
Peso final (g)	693,33 $\pm$ 83,21	744,45 $\pm$ 21,93	639,37 $\pm$ 31,60	0,4264
Ganho de peso (g)	442,98 $\pm$ 83,21	494,10 $\pm$ 21,93	389,01 $\pm$ 31,60	0,4294
GPD ( $\text{g day}^{-1}$ )	4,92 $\pm$ 0,92	5,49 $\pm$ 0,24	4,32 $\pm$ 0,35	0,4264
TCE ( $\% \text{ day}^{-1}$ )	1,11 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,06	0,4564
Biomassa final ( $\text{kg m}^{-3}$ )	5,20 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	11,46 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	13,89 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	0,0006
Consumo alimentar ( $\text{g peixe dia}^{-1}$ )	10,02 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	8,08 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	6,74 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	0,0035
CAA	1,38 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	1,03 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,10 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,0221
Sobrevivência (%)	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	96,30 $\pm$ 3,70	0,4219

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e Tukey ( $p < 0,05$ ). GPD – ganho de peso diário; TCE – taxa de crescimento específico; CAA – taxa de conversão alimentar aparente.

Os valores de hematócrito foram significativamente menores em D1,5 ( $p < 0,05$ ). As demais variáveis hematológicas e bioquímicas não foram significativamente afetadas pelas densidades avaliadas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5. Hematologia e bioquímica sanguínea (média  $\pm$  desvio-padrão) de juvenis *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2).

Parâmetros	Densidades de Estocagem ( $\text{kg m}^{-3}$ )			p-valor
	D <sub>1,5</sub>	D <sub>3,0</sub>	D <sub>4,5</sub>	
Hematócrito (%)	27,69 $\pm$ 0,72 <sup>b</sup>	30,29 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	31,53 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,0058
Hemoglobina ( $\text{g dL}^{-1}$ )	7,51 $\pm$ 0,23	7,93 $\pm$ 0,25	9,24 $\pm$ 1,17	0,2652
Eritrócitos ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	0,64 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,06	0,1919
VCM (fL)	442,02 $\pm$ 85,53	404,51 $\pm$ 23,44	431,55 $\pm$ 35,44	0,7057
HCM (pg)	120,05 $\pm$ 25,30	105,74 $\pm$ 4,69	126,06 $\pm$ 26,78	0,5282
CHCM ( $\text{g dL}^{-1}$ )	27,11 $\pm$ 0,46	26,16 $\pm$ 0,55	29,29 $\pm$ 3,64	0,5974
PPT ( $\text{g dL}^{-1}$ )	5,47 $\pm$ 0,21	5,39 $\pm$ 0,12	5,57 $\pm$ 0,07	0,6998
Glicose ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	74,70 $\pm$ 3,02	72,30 $\pm$ 3,95	72,04 $\pm$ 3,85	0,8532

Colesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	115,95 ± 2,15	99,90 ± 7,93	113,79 ± 6,11	0,1949
Triglicerídeos (mg dL <sup>-1</sup> )	182,49 ± 8,23	269,58 ± 55,17	175,26 ± 13,41	0,1613
AST (UI L <sup>-1</sup> )	52,13 ± 4,31	62,31 ± 2,70	48,07 ± 4,15	0,0876
ALT (UI L <sup>-1</sup> )	5,93 ± 0,43	7,15 ± 0,18	5,67 ± 0,52	0,0864

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e Tukey ( $p < 0,05$ ). VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT – proteína plasmática total; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase.

Não houve efeito significativo das densidades de estocagem sobre os índices somáticos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6. Índices somáticos (média ± desvio-padrão) de juvenis de *Piaractus brachyomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2).

Índices (%)	Densidades de Estocagem (kg m <sup>-3</sup> )			p-valor
	D <sub>1,5</sub>	D <sub>3,0</sub>	D <sub>4,5</sub>	
IVS	4,16 ± 0,39	2,63 ± 0,82	2,59 ± 0,90	0,3043
IHS	1,05 ± 0,18	0,73 ± 0,30	0,74 ± 0,28	0,6319
IGV	4,76 ± 0,34	2,84 ± 0,77	2,98 ± 0,63	0,1190

IVS – índice viscerossomático; IHS – índice hepatossomático; IGV – índice de gordura visceral.

Os parâmetros morfométricos, rendimento de carcaça e rendimento de filé não diferiram significativamente, independentemente da densidade utilizada ( $p > 0,05$ ) (Tabela 7).

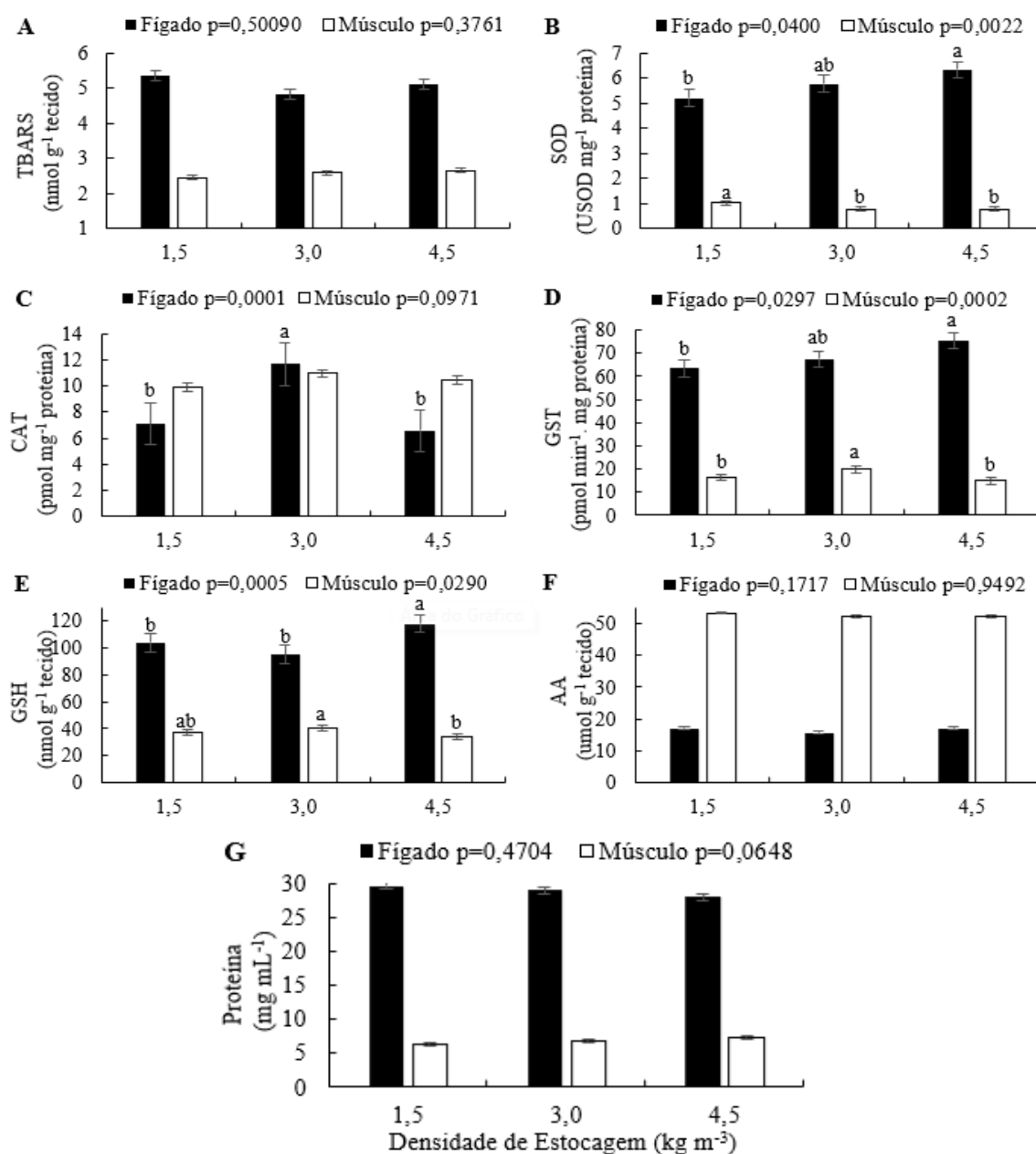
Tabela 7. Parâmetros morfométricos, rendimento de carcaça e rendimento de filé (média ± desvio-padrão) de juvenis de *Piaractus brachyomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2).

Parâmetros	Densidades de Estocagem (kg m <sup>-3</sup> )			p-valor
	D <sub>1,5</sub>	D <sub>3,0</sub>	D <sub>4,5</sub>	
Comprimento total (cm)	31,01 ± 1,49	31,97 ± 0,27	36,68 ± 5,91	0,5142
Comprimento padrão (cm)	25,18 ± 1,26	25,92 ± 0,20	25,37 ± 0,49	0,7956
Comprimento da cabeça (cm)	7,44 ± 0,23	7,82 ± 0,09	7,77 ± 0,07	0,2308
Comprimento do tronco (cm)	17,74 ± 1,03	18,10 ± 0,11	17,60 ± 0,43	0,8544
Altura da cabeça (cm)	13,47 ± 0,43	13,56 ± 0,14	12,70 ± 0,34	0,2053
Largura do tronco (cm)	4,55 ± 0,05	4,45 ± 0,13	4,30 ± 0,14	0,3575
CC/CP (cm)	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,001	0,31 ± 0,003	0,2830

CP/CT (cm)	0,81 ± 0,001	0,81 ± 0,004	0,72 ± 0,10	0,4785
LTr/CTr (cm)	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,6478
LTr/ATr (cm)	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,8284
ATr/CTr (cm)	0,76 ± 0,02	0,75 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,2382
Rendimento carcaça (%)	48,38 ± 1,67	46,81 ± 1,06	45,88 ± 1,52	0,4486
Rendimento filés (%)	42,65 ± 1,57	40,62 ± 1,06	39,85 ± 1,28	0,4201

CC/CP – relação comprimento da cabeça e comprimento padrão; CP/CT – relação comprimento padrão e comprimento total; LTr/CTr – relação largura do tronco e comprimento do tronco; LTr/ATr – relação largura do tronco e altura do tronco; ATr/CTr – relação altura do tronco e comprimento do tronco.

No músculo dos juvenis de *P. brachypomus*, a maior atividade de SOD foi observada em D1,5 ( $p < 0,05$ ) e, no fígado, foi significativamente maior em D4,5 do que em D1,5 ( $p < 0,05$ ) (Figura 3B). A maior atividade de catalase no fígado ocorreu em D3,0



( $p < 0,05$ ) (Figura 3C). No músculo, a maior atividade de GST foi encontrada em D3,0 ( $p < 0,05$ ), e no fígado foi significativamente maior em D4,5 do que em D1,5 (Figura 3D). No fígado, o maior valor de GSH foi observado em D4,5 ( $p < 0,05$ ) e, no músculo, foi significativamente maior em D3,0 do que em D4,5 ( $p < 0,05$ ) (Figura 3E). Os níveis de TBARS no fígado e músculo (Figura 3A), CAT no músculo (Figura 3C), AA no fígado e músculo (Figura 3F) e proteína no músculo e fígado (Figura 3G) não foram significativamente influenciados pelas densidades testadas ( $p > 0,05$ ).

Figura 5. Estado oxidativo hepático e muscular (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A atividade da enzima NTPDase para a hidrólise de ATP foi maior no rim cefálico dos juvenis mantidos em D1,5 do que em D4,5 ( $p < 0,05$ ), porém não foram observadas alterações significativas no músculo ( $p > 0,05$ ) (Figura 4A). A atividade das demais enzimas relacionadas ao sistema purinérgico no rim cefálico e no músculo não foi significativamente afetada pelas diferentes densidades de estocagem ( $p > 0,05$ ) (Figuras 4B, 4C e 4D).

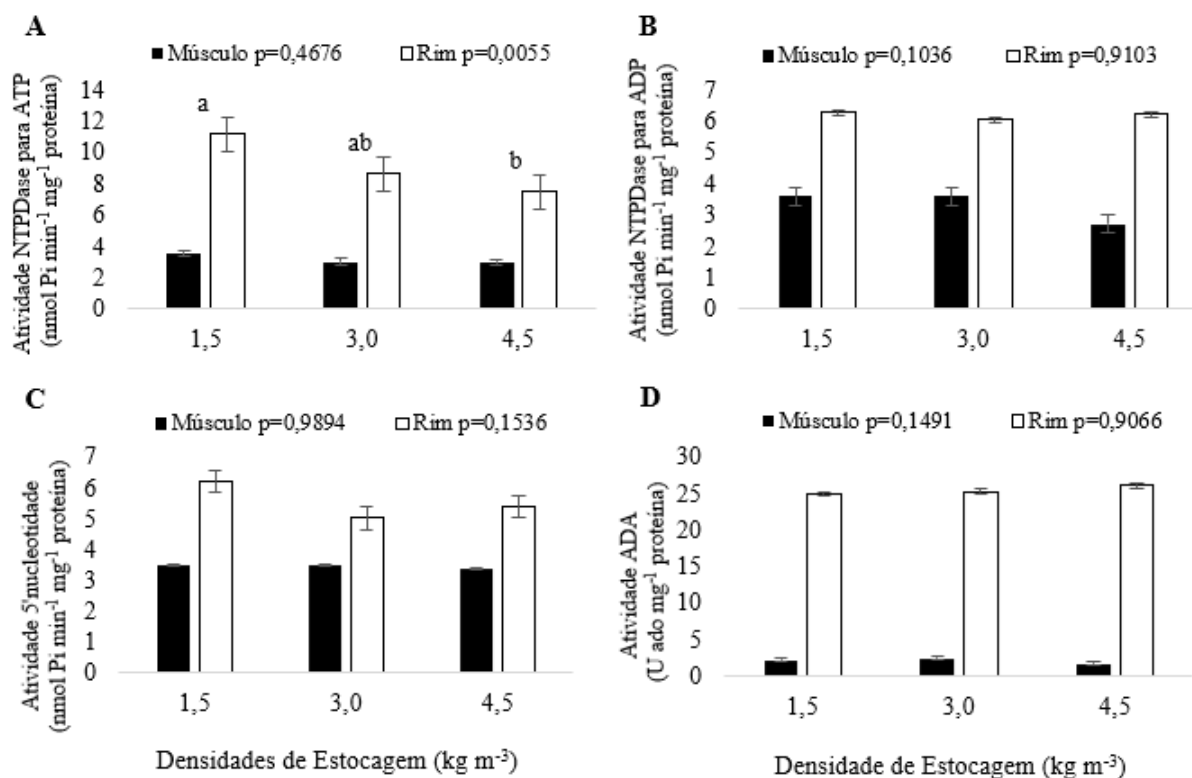


Figura 6. Enzimas relacionadas ao sistema purinérgico (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachypomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste ANOVA unidirecional e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os juvenis mantidos em D3,0 apresentaram a menor altura lamelar das brânquias ( $p < 0,05$ ) (Figura 5A) e um espaço interlamelar significativamente reduzido em comparação àqueles mantidos em D1,5 ( $p < 0,05$ ) (Figura 5B).

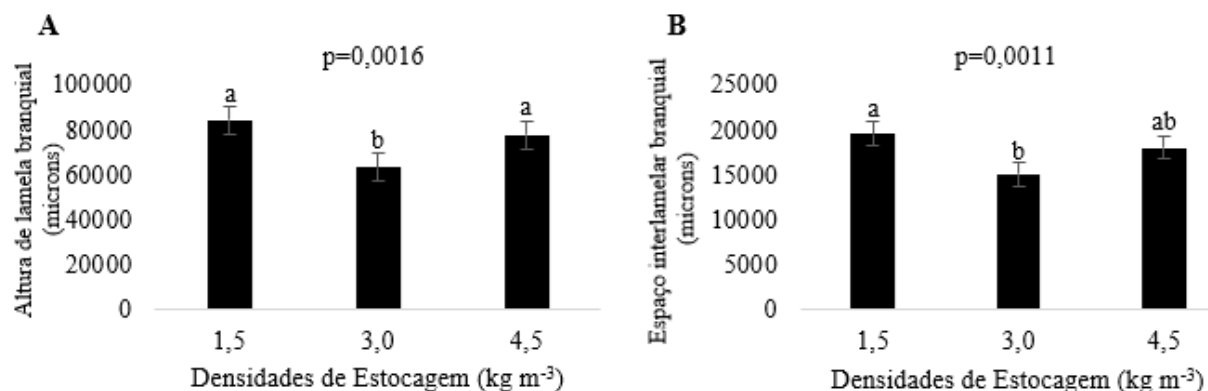


Figura 7. Histologia branquial (média  $\pm$  erro padrão) de juvenis de *Piaractus brachyomus* após 90 dias de cultivo em diferentes densidades de estocagem em RAS (Experimento 2). Barras com letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A alta sobrevivência e as boas respostas de crescimento encontradas em nosso estudo com as diferentes densidades de estocagem testadas em ambos os experimentos confirmam a adaptabilidade de *P. brachyomus* ao RAS, conforme também observado em outros estudos previamente conduzidos com a espécie (Poelo et al., 2011; Favero et al., 2021; Ferreira et al., 2023; Ananias et al., 2025).

Similaridades foram observadas entre os dois experimentos deste estudo, com apenas biomassa final, consumo de ração e conversão alimentar sendo afetados pelas densidades testadas. Ao final de ambos os experimentos, a biomassa final foi maior nas maiores densidades (D1,6 – experimento 1 e D4,5 – experimento 2). A biomassa é utilizada para avaliar a produtividade do cultivo (Ali et al., 2006), em que valores maiores indicam aumento de produtividade. Esse resultado também foi observado em duas fases mais jovens de *P. brachyomus* (Ananias et al., 2025), utilizando densidades de 0,68; 1,45; 4,41; 7,17  $\text{kg m}^{-3}$  (fase 1) e 1,0; 1,95; 5,63; 7,90  $\text{kg m}^{-3}$  (fase 2). O tambaqui (*Colossoma macropomum*), espécie do grupo dos peixes redondos, assim como *P. brachyomus*, também apresentou maiores biomassas nas maiores densidades estudadas (Santos et al., 2021; Ananias et al., 2024).

O consumo de ração está diretamente relacionado à conversão alimentar. As densidades de 1,0 e 1,6  $\text{kg m}^{-3}$  (experimento 1), e 3,0 e 4,5  $\text{kg m}^{-3}$  (experimento 2)

melhoraram o consumo de ração e a conversão alimentar. Estudos testando manejo de restrição alimentar e horários de alimentação na produção de *P. brachypomus* observaram valores de consumo de ração entre 5,79 e 10,33 g peixe<sup>-1</sup> (Favero et al., 2022) e 13,6 a 22 g peixe<sup>-1</sup> (Favero et al., 2021). Entretanto, valores de consumo podem ser influenciados pela duração do estudo, palatabilidade da dieta e idade dos animais.

A conversão alimentar em ambos os experimentos foi pior na menor densidade de estocagem. Os valores de referência de conversão alimentar para *P. brachypomus* ainda são escassos. No entanto, juvenis mantidos a 31,25 peixes m<sup>-3</sup> em RAS e em sistema fechado apresentaram conversão entre 1,5 e 1,6 (Poelo et al., 2011), valores próximos aos observados no presente estudo. Estudos de manejo alimentar com a espécie, mas com pesos diferentes dos utilizados no presente estudo, observaram valores em torno de 0,78 (2,40 g – 0,5 peixe L<sup>-1</sup>) (Favero et al., 2022) e 1,1 (2,99 g – 0,2 peixe L<sup>-1</sup>) (Favero et al., 2021). O nível de intensificação do sistema, parâmetros ambientais relacionados à qualidade da água, comportamento da espécie cultivada, idade e estágio de desenvolvimento dos peixes podem afetar a conversão alimentar (Craig et al., 2017). Além dos fatores mencionados, os resultados deste estudo indicam que altas densidades podem influenciar positivamente a conversão alimentar de juvenis de *P. brachypomus*. O híbrido tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomus*) mantido em RAS em diferentes densidades apresentou taxas de conversão entre 1,08 e 1,16 (Sousa et al., 2020). Ananias et al. (2024) encontraram valores entre 0,64 e 2,36 para *C. macropomum* em diferentes fases de crescimento em RAS.

Os demais parâmetros zootécnicos não foram significativamente influenciados pelas diferentes densidades testadas durante os dois experimentos, indicando que juvenis de *P. brachypomus* se adaptaram ao cultivo nessas densidades. Poelo et al. (2011) também cultivaram com sucesso essa espécie em altas densidades no RAS (31,25 peixes m<sup>-3</sup>, aproximadamente 1,38 kg m<sup>-3</sup>). Juvenis de *P. brachypomus* com 1,5 g mantidos em densidades de até 4,41 kg m<sup>-3</sup> e com 6,6 g até 5,63 kg m<sup>-3</sup> também apresentaram resultados satisfatórios em RAS (Ananias et al., 2025). *C. macropomum*, avaliado em diferentes densidades conforme o crescimento, mostrou bons resultados em densidades de 0,9 kg m<sup>-3</sup> (peso inicial de 0,54 g), 1,6 kg m<sup>-3</sup> (8,22 g), e 4,0 e 6,0 kg m<sup>-3</sup> (142,18 g) (Ananias et al., 2024). Esses resultados permitem concluir que espécies de peixes redondos amazônicos podem ser cultivadas em sistemas intensivos, gerando maior produtividade e possibilitando sua criação em regiões de temperaturas mais amenas.

Densidades de estocagem não ideais podem ser consideradas estímulos estressantes para os peixes (Tort et al., 1996; Ahmed et al., 2020). Nem todas as espécies se adaptam bem ao adensamento, e avaliações de parâmetros bioquímicos e hematológicos são ferramentas que permitem investigar possíveis níveis de estresse (Ahmed et al., 2020). Índices hematológicos como hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos estão relacionados à capacidade do sangue de transportar oxigênio (Weenderlar Bonga, 1997; Ahmed et al., 2020). No presente estudo, observamos que o hematócrito foi maior nas maiores densidades (D3,0 e D4,5) no experimento 2, indicando maior necessidade de captação e transporte de O<sub>2</sub>. Esses resultados indicam que juvenis submetidos a essas densidades iniciaram respostas fisiológicas ao estresse, mesmo que os níveis de OD tenham permanecido adequados; no entanto, maior captação de O<sub>2</sub> pelos eritrócitos foi necessária, sem afetar outros parâmetros sanguíneos de *P. brachypomus*.

Com base nos dados do presente estudo, podemos afirmar que as densidades testadas não afetaram a saúde dos juvenis. Assim como observado aqui, juvenis de *P. brachypomus* mantidos em densidades de 1,0; 1,95; 5,63 e 7,90 kg m<sup>-3</sup> mostraram poucas alterações em seus parâmetros hematológicos e bioquímicos plasmáticos, com interferência apenas nos valores de triglicerídeos (Ananias et al., 2025). Juvenis de *C. macropomum* sofreram pouca influência nos parâmetros hematofisiológicos em densidades de 0,5; 1,0; 1,5; 1,6; 3,0 e 4,5 kg m<sup>-3</sup> (Santos et al., 2021) e 2,0; 4,0 e 6,0 kg m<sup>-3</sup> (Ananias et al., 2024), permanecendo saudáveis, recomendando-se sua produção em altas densidades no mesmo sistema. Estudos de densidade de estocagem para outras espécies também encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mantida em três densidades diferentes (2,84; 4,26; 5,68 kg m<sup>-3</sup>) apresentou aumento no hematócrito conforme a densidade aumentou em RAS (Zafar et al., 2023). No entanto, juvenis de bagre (*Pangasianodon hypophthalmus*) de 10 g mantidos em densidades de 0,2; 0,4 e 0,6 kg m<sup>-3</sup> em hapas apresentaram redução no hematócrito com o aumento da densidade (Refaey et al., 2024). Resultados contraditórios reforçam a afirmação de Ahmed et al. (2020) de que o estresse é dependente da espécie e da necessidade de estudos sobre adaptação de espécies de interesse comercial à intensificação do cultivo.

Índices somáticos estão relacionados ao peso do animal, deposição de gordura visceral e estado nutricional (Luckenbach et al., 2007). Reduções na deposição de lipídios podem indicar redirecionamento energético para adaptações a situações estressantes

(Basrur et al., 2010). As densidades testadas em ambos os experimentos não influenciaram os índices somáticos dos animais. Esses resultados, juntamente com os dados de crescimento e hematofisiológicos, indicam que, mesmo com as alterações de hematócrito observadas no experimento 2, as densidades não promoveram mobilização energética. Em estudo com juvenis de *C. macropomum* mantidos em diferentes densidades em RAS, também não foram encontradas diferenças nos índices somáticos (Ananias et al., 2024).

Os parâmetros morfométricos, rendimento de carcaça e rendimento de filé dos espécimes no experimento 2 também não foram influenciados pelas densidades. Medidas morfométricas de peixes redondos (*C. macropomum* e *P. brachypomus*) e seus híbridos podem ser usadas indiretamente para selecionar peixes mais pesados, além de identificar melhores características de filé (Reis-Neto et al., 2012). Ribeiro et al. (2019) afirmaram que medidas morfométricas podem ser usadas em *P. brachypomus* para estimar peso corporal, peso de carcaça e filé com espinhas. O rendimento de carcaça de surubins (*Pseudoplatystoma* spp.) submetidos a diferentes densidades em viveiros escavados também não foi alterado com o aumento da densidade (Fantini et al., 2014). Híbridos de bagre-channel (*Ictalurus punctatus* x *Ictalurus furcatus*) também não apresentaram diferenças nos rendimentos de carcaça e filé após serem mantidos em diferentes densidades em tanques escavados de 0,4 hectares (Bosworth et al., 2015).

Estudos mostram que maiores densidades podem desencadear alterações no balanço redox intracelular, resultando em estresse oxidativo (Andrade et al., 2015; Ruiz et al., 2021), que é uma simples perturbação no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, levando à desregulação do sinal redox e/ou dano molecular (Sies et al., 2017). O mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo em peixes é semelhante ao de mamíferos, consistindo na ativação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Birnie-Gauvin et al., 2017). Quando ativados, esses mecanismos podem manter o estado redox sob controle (Sies, 1997). No entanto, quando levados ao limite, esses mecanismos são prejudicados e antioxidantes são depletados (Choi et al., 2019). Níveis elevados de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos podem indicar resposta positiva do mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (Gutteridge e Halliwell, 1990; Wang et al., 2013). SOD e CAT são enzimas importantes do sistema antioxidante; SOD é responsável pela dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, que é convertido em oxigênio e água pela CAT (Halliwell e Gutteridge, 2015). A supressão de SOD no músculo nas maiores densidades (D3 e D4,5), de CAT no fígado em D1,5 e D4,5,

e o aumento de SOD no fígado em D4,5 podem indicar o início de dano oxidativo na maior densidade testada no experimento 2. No entanto, esse dano não foi suficiente para afetar o crescimento e as respostas fisiológicas dos juvenis. Outras espécies também sofreram supressão enzimática do sistema de defesa antioxidante nas maiores densidades testadas, como black bass (*Micropterus salmoides*) (Wang et al., 2020; Jia et al., 2022), bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) (Wang et al., 2019), linguado (*Scophthalmus maximus*) (Jia et al., 2016) e butter catfish (*Ompok bimaculatus*) (Majhi et al., 2023).

A GSH, por sua vez, desempenha papel importante em vários processos celulares, como metabolismo de nutrientes, sinalização redox e regulação das funções metabólicas (Aquilano et al., 2014). A GST é ativada pela presença de glutathione, seu cofator enzimático, e uma de suas funções é a remoção de peróxidos de hidrogênio, xenobióticos e metabólitos endógenos (Board e Menon, 2013). Os baixos níveis de GST e GSH no músculo indicam incapacidade desses antioxidantes de manter o equilíbrio redox no tecido. No entanto, o aumento desses dois antioxidantes no fígado de juvenis mantidos na maior densidade no experimento 2 sugere uma ativação positiva do mecanismo de defesa oxidativa no fígado. Pacus (*P. mesopotamicus*) apresentaram aumento da atividade de GST quando mantidos na maior densidade testada ( $22 \text{ kg m}^{-3}$ ) e alimentados com dietas contendo  $\beta$ -caroteno e algas vermelhas (Bachetta et al., 2020). O mesmo foi observado por Diao et al. (2023) com *Pelteobagrus fulvidraco* mantidos na maior densidade testada ( $0,25 \text{ kg m}^{-2}$ ) em sistema integrado com cultivo de arroz. Esses resultados sugerem adaptação do organismo às condições impostas por maiores densidades. No entanto, a alta densidade testada no experimento 2 gerou estresse oxidativo leve ou moderado, sendo necessário observar a produção da espécie ao longo de períodos extensos de cultivo para identificar possíveis efeitos prejudiciais à saúde e ao crescimento de *P. brachypomus*.

A inibição da atividade da NTPDase esplênica indica sinalização purinérgica, induzindo aumento de respostas pró-inflamatórias devido à redução da hidrólise de ATP, liberando, conseqüentemente, mais óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias e seus efeitos imunotóxicos (Baldissera et al., 2018). A baixa atividade de NTPDase para a hidrólise de ATP em peixes mantidos em D4,5 revela a inibição de sua atividade, indicando sinalização pró-inflamatória no rim cefálico de *P. brachypomus*, uma vez que menos ATP é hidrolisado no ambiente extracelular, e o aumento dessa molécula libera mediadores inflamatórios por interação com receptores P2X. A observação da atividade de enzimas ligadas ao sistema purinérgico em peixes submetidos a altas densidades de

estocagem ainda não foi relatada na literatura. No entanto, outros estressores já foram estudados, confirmando sua influência na sinalização purinérgica. Ciclídeos amazônicos (*Geophagus proximus*) mantidos em água preta e expostos à hipóxia também apresentaram redução na atividade da NTPDase para a hidrólise de ATP (Souza et al., 2021). Piato et al. (2011) observaram aumento na hidrólise de ATP por NTPDase em zebrafish (*Danio rerio*) expostos a estresse agudo por restrição de movimento, sendo considerado uma tentativa fisiológica de reduzir níveis de ATP no ambiente extracelular, uma molécula pró-inflamatória quando presente em excesso. *Pterygoplichthys pardalis* submetido ao estresse de manejo também apresentou aumento na atividade da NTPDase usando ATP como substrato (Baldissera et al., 2020), também considerada uma tentativa fisiológica de reduzir ATP extracelular. Assim como as alterações nos parâmetros sanguíneos são dependentes da espécie e do tipo de estressor, os diferentes resultados encontrados na literatura podem indicar que a atividade de enzimas relacionadas à sinalização purinérgica também pode depender da espécie e do tipo de estresse a que o animal é submetido.

As brânquias são os primeiros órgãos a responder a estressores ambientais (Benli et al., 2008). Entretanto, o conceito de saúde branquial ainda não é bem compreendido; geralmente está relacionado à ausência de alterações detectáveis (Foyle et al., 2020) por meio de exames morfológicos ou da resposta imune do tecido branquial via expressão gênica ou presença de patógenos (Bjorgen et al., 2024). A morfometria das lamelas branquiais auxilia na avaliação do bem-estar dos peixes no ambiente ao qual estão submetidos (Reis et al., 2009). Uma maior área lamelar indica um ambiente favorável, que permite maior interação entre o animal e o meio, enquanto uma área lamelar reduzida indica um ambiente desafiador, seja pela presença de substâncias químicas, componentes tóxicos ou características físicas (Reis et al., 2009). O aumento observado na área lamelar nas densidades D1,5 e D4,5 indica que a densidade de estocagem não causou danos ao tecido branquial.

## 5. Conclusão

Juvenis de *P. brachypomus* com peso médio de 29,5 g podem ser cultivados em densidades iniciais de estocagem de até 1,6 kg m<sup>-3</sup> por 90 dias, e juvenis com peso médio de 250 g podem ser mantidos em densidades de até 4,5 kg m<sup>-3</sup> por mais 90 dias sem alterar seu desempenho de crescimento ou a maioria das respostas fisiológicas analisadas. No entanto, a maior densidade no experimento 2 resultou em leve dano oxidativo e alterações

nos valores de hematócrito. Densidades de estocagem mais elevadas devem ser testadas para aumentar a produtividade de *P. brachypomus* em sistemas RAS.

### **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil – 402840/2023-2, 402840/2023-2, 301816/2022-0 e 316901/2021-0); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil – código de financiamento 001);

### **Declaração de Conflito de Interesse**

Os autores declaram que não possuem interesses financeiros concorrentes ou relações pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

### **Contribuição dos Autores**

**Imaculada de Moraes Carvalho Ananias:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Recursos, Investigação, Redação – Rascunho original, Redação – Revisão e Edição, Visualização, Obtenção de financiamento. **Sidney dos Santos Silva:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **André de Sena Souza:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Fábio Aremil Costa dos Santos:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Narcia Carolina Santos da Silva:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Isabela Maraschin Vieira:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Sílvio Teixeira da Costa:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Isabela Andres Finamor:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Caroline Azzolin Bressan:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação. **Maria Amália Pavanato:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação, Recursos, Redação – Revisão e Edição. **Bernardo Baldisserotto:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação, Recursos, Redação – Revisão e Edição. **Matheus Dellaméa Baldissera:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação, Recursos, Redação – Revisão e Edição. **Gisele Cristina Favero:** Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação, Recursos, Curadoria de dados, Redação – Revisão e Edição, Visualização, Obtenção de financiamento. **Ronald Kennedy Luz:**

Conceitualização, Metodologia, Validação, Análise formal, Investigação, Recursos, Curadoria de dados, Redação – Rascunho original, Redação – Revisão e Edição, Visualização, Supervisão, Administração do projeto, Obtenção de financiamento.

## 6. Referências

- Abraham, T.J., Sarker, S., Dash, G., Patra, A., Adikesavalu, H., 2017. *Chryseobacterium* sp. PLI2 and *Aeromonas hydrophila* co-infection in pacu, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) fries cultured in West Bengal, India. *Aquaculture* 473, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.016>.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahmed, I., Reshi, Q.M., Fazio, F., 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquac. Int.* 28, 869–899. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00501-3>.
- Ai, Y., Wang, H., Liu, L., Qi, Y., Tang, S., Tang, J., Chen, N., 2023. Purine and purinergic receptors in health and disease. *MedComm*. 4, e359. <https://doi.org/10.1002/mco2.359>
- Ali, M., Iqbal, F., Salam, A., Sial, F., Athar, M., 2006. Comparative study of body composition of four fish species in relation to pond depth. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2, 359–364. <https://doi.org/10.1007/BF03325897>
- Ananias, I.D.M.C., Dos Santos Silva, S., De Sena Souza, A., Dos Santos, F.A.C., Magalhães, T.B., De Freitas Martins, W.J., Favero, G.C., Luz, R.K., 2025. Effects of Stocking Densities on the Growth Performance and Physiology of Juvenile *Piaractus brachypomus* in Recirculating Aquaculture System. *Fishes* 10, 171. <https://doi.org/10.3390/fishes10040171>
- Ananias, I.D.M.C., Silva, S.D.S., Santos, F.A.C.D., Souza, A.D.S., Magalhães, T.B., Reis, P.A.R., Favero, G.C., Luz, R.K., 2023. Tambaqui Production at Different Stocking Densities in RAS: Growth and Physiology. *Fishes* 9, 19. <https://doi.org/10.3390/fishes9010019>
- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., De Las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R., Costas, B., 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* 438, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.034>

- Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.* 5, e196. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>
- Bacchetta, C., Rossi, A.S., Ale, A., Cazenave, J., 2020. Physiological effects of stocking density on the fish *Piaractus mesopotamicus* fed with red seaweed (*Pyropia columbina*) and  $\beta$ -carotene-supplemented diets. *Aquac. Res.* 51, 1992–2003. <https://doi.org/10.1111/are.14551>
- Baldissera, M.D., De Freitas Souza, C., Val, A.L., Baldisserotto, B., 2020. Involvement of purinergic signaling in the Amazon fish *Pterygoplichthys pardalis* subjected to handling stress: Relationship with immune response. *Aquaculture* 514, 734481. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734481>
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Descovi, S.N., Verdi, C.M., Zeppenfeld, C.C., De Lima Silva, L., Gindri, A.L., Cunha, M.A., Santos, R.C.V., Baldisserotto, B., Da Silva, A.S., 2019. Effects of dietary grape pomace flour on the purinergic signaling and inflammatory response of grass carp experimentally infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Aquaculture* 503, 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.015>
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Descovi, S.N., Zanella, R., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., Baldisserotto, B., 2018. Purinergic signalling as a potential pathway for trichlorfon induced-inflammation and impairment of the immune response using freshwater silver catfish. *Aquaculture* 497, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.037>
- Baldwin, L., 2011. The effects of stocking density on fish welfare. *TPSS.* 4, 372–383.
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.* 1, 3–26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Basrur, T.V., Longland, R., Wilkinson, R.J., 2010. Effects of repeated crowding on the stress response and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 36, 445–450. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9314-x>
- Benli, A.Ç.K., Köksal, G., Özkul, A., 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72, 1355–1358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.037>

- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S.J., Willmore, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish and Fisheries* 18, 928–942. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>
- Bjørngen, H., Koppang, E.O., Nowak, B.F., 2025. Gill Health in Fish Farmed in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A Review. *J. Fish Dis.* 48, e14057. <https://doi.org/10.1111/jfd.14057>
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *BBA - General Subjects* 1830, 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Bosworth, B., Ott, B., Torrans, L., 2015. Effects of Stocking Density on Production Traits of Channel Catfish×Blue Catfish Hybrids. *N. Am. J. Aquac.* 77, 437–443. <https://doi.org/10.1080/15222055.2015.1024363>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Choi, C.Y., Choi, J.Y., Choi, Y.J., Kim, B.-S., Kim, J.-W., 2019. Effects of green wavelength light on antioxidant and non-specific immune responses of the olive flounder *Paralichthys olivaceus* maintained at different stocking densities. *Aquac. Eng.* 84, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.11.004>
- Clois-Fuentes, J., Nguinkal, J.A., Unger, P., Kreikemeyer, B., Palm, H.W., 2023. Bacterial community in African catfish (*Clarias gariepinus*) recirculating aquaculture systems under different stocking densities. *Front. Mar. Sci.* 10, 1073250. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1073250>
- Craig, S.L., Austin, A., Rashidi, M., Adams, M., 2017. Fighting for survival: The experiences of lesbian, gay, bisexual, transgender, and questioning students in religious colleges and universities. *J. Gay. Lesbian. Soc. Serv.* 29, 1–24. <https://doi.org/10.1080/10538720.2016.1260512>
- Diao, W., Jia, R., Hou, Y., Dong, Y., Li, B., Zhu, J., 2023. Effects of Stocking Density on the Growth Performance, Physiological Parameters, Antioxidant Status and Lipid Metabolism of *Pelteobagrus fulvidraco* in the Integrated Rice-Fish Farming System. *Animals* 13, 1721. <https://doi.org/10.3390/ani13111721>
- Díaz, H.A.A., Ramírez, A.P.M., Emerenciano, M.G.C., Carrasco, S.C.P., 2020. Organoleptic and nutritional characteristics of fillets of pirapitinga fed different protein

- sources in a biofloc system. PAB. 55, e01795. <https://doi.org/10.1590/s1678-3921.pab2020.v55.01795>
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Fantini, L.E., Oliveira, C.A.L.D., Rodrigues, R.A., Oliveira, A.M.D.S., Ushizima, T.T., Campos, C.M.D., 2014. Rendimento de carcaça de surubins *Pseudoplatystoma* spp. produzidos em viveiros sob diferentes densidades de estocagem. Semina: Ciênc. Agrár. 35, 2769. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n5p2769>
- Favero, G.C., Dos Santos, F.A.C., Da Costa Júlio, G.S., Batista, F.S., Bonifácio, C.T., Torres, I.F.A., Paranhos, C.O., Luz, R.K., 2022. Effects of water temperature and feeding time on growth performance and physiological parameters of *Piaractus brachypomus* juveniles. *Aquaculture* 548, 737716. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737716>
- Favero, G.C., Dos Santos, F.A.C., Da Costa Júlio, G.S., Pedras, P.P.C., Ferreira, A.L., De Souza E Silva, W., Ferreira, N.S., Do Carmo Neves, L., Luz, R.K., 2021. Effects of short feed restriction cycles in *Piaractus brachypomus* juveniles. *Aquaculture* 536, 736465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736465>
- Ferreira, A.L., Bonifácio, C.T., De Souza E Silva, W., Takata, R., Favero, G.C., Luz, R.K., 2021. Anesthesia with eugenol and menthol for *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): Induction and recovery times, ventilation frequency and hematological and biochemical responses. *Aquaculture* 544, 737076. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737076>
- Ferreira, A.L., Dos Santos, F.A.C., Bonifácio, C.T., Luz, R.K., 2023. Effects of live prey concentration, salinity, and weaning age on larviculture of *Piaractus brachypomus* reared in a recirculating aquaculture system. JAHP 55, 99. <https://doi.org/10.1007/s11250-023-03514-6>
- Foyle, K.L., Hess, S., Powell, M.D., Herbert, N.A., 2020. What Is Gill Health and What Is Its Role in Marine Finfish Aquaculture in the Face of a Changing Climate? Front. Mar. Sci. 7, 400. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00400>
- Garcia, O., Acevezo, J., Ramirez, R., 2013. Proximate analysis and microbiological and sensory evaluation of hamburger patties elaborated with red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*) and textured soy (Glycine max). RVCTA 4, 219–236.
- Giusti, G., Gakis, C., 1971. Temperature Conversion Factors, Activation Energy, Relative Substrate Specificity and Optimum pH of Adenosine Deaminase from Human Serum and Tissues. *Enzyme* 12, 417–425. <https://doi.org/10.1159/000459567>

- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the Hematology Laboratory: The Microhematocrit Determination Am. J. Clin. Pathol. 56, 35–39. <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- Gressler, L.T., Sutili, F.J., Loebens, L., Saccol, E.M.H., Pês, T.S., Parodi, T.V., Da Costa, S.T., Pavanato, M.A., Baldisserotto, B., 2016. Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. Aquac. Res. 47, 2297–2306. <https://doi.org/10.1111/are.12682>
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem. Sci. 15, 129–135. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90206-Q](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90206-Q)
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130–7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Hermes-Lima, M., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. Free Radic. Biol. Med. 19, 271–280. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00020-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00020-X)
- Jerez-Cepa, I., Ruiz-Jarabo, I., 2021. Physiology: An Important Tool to Assess the Welfare of Aquatic Animals. *Biology* 10, 61. <https://doi.org/10.3390/biology10010061>
- Jia, R., Liu, B., Han, C., Huang, B., Lei, J., 2016. Influence of Stocking Density on Growth Performance, Antioxidant Status, and Physiological Response of Juvenile Turbot, *Scophthalmus maximu*, Reared in Land-based Recirculating Aquaculture System. J. World Aquac. Soc. 47, 587–599. <https://doi.org/10.1111/jwas.12295>
- Jia, R., Wang, L., Hou, Y., Feng, W., Li, B., Zhu, J., 2022. Effects of Stocking Density on the Growth Performance, Physiological Parameters, Redox Status and Lipid Metabolism of *Micropterus salmoides* in Integrated Rice–Fish Farming Systems. *Antioxidants* 11, 1215. <https://doi.org/10.3390/antiox11071215>
- Kumar, A., Pradhan, P.K., Das, P.C., Srivastava, S.M., Lal, K.K., Jena, J.K., 2018. Growth performance and compatibility of pacu, *Piaractus brachypomus* with Indian major carps in polyculture system. *Aquaculture* 490, 236–239. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.052>
- Leite, C.E., Maboni, L.D.O., Cruz, F.F., Rosemberg, D.B., Zimmermann, F.F., Pereira, T.C.B., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Campos, M.M., Morrone, F.B., Battastini, A.M.O., 2013. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper

- in zebrafish larvae. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 681–689. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.001>
- Li, L., Shen, Y., Yang, W., Xu, X., Li, J., 2021. Effect of different stocking densities on fish growth performance: A meta-analysis. *Aquaculture* 544, 737152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737152>
- Luckenbach, J.A., Murashige, R., Daniels, H.V., Godwin, J., Borski, R.J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.024>
- Majhi, S.S., Singh, S.K., Biswas, P., Debbarma, R., Parhi, J., Khatei, A., Mangang, Y.A., Waikhom, G., Patel, A.B., 2023. Stocking density affects immune and stress-related gene expression of Butter catfish (*Ompok bimaculatus*) fry in biofloc landscapes. *Fish Shellfish Immunol. Rep.* 5, 100112. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100112>
- Mattioli, C.C., Takata, R., Paes Leme, F.D.O., Costa, D.C., Melillo Filho, R., De Souza E Silva, W., Luz, R.K., 2017. The effects of acute and chronic exposure to water salinity on juveniles of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *Aquaculture* 481, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.016>
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Nahida, R., Rajesh, M., Sharma, P., Pandey, N., Pandey, P.K., Suresh, A.V., Angel, G., Chadha, N.K., Sawant, P.B., Pandey, A., Kamalam, B.S., 2025. Stocking density affects growth, feed utilisation, metabolism, welfare and associated mRNA transcripts in liver and muscle of rainbow trout more pronouncedly than dietary fish meal inclusion level. *Aquaculture* 596, 741717. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741717>
- Piato, A.L., Rosemberg, D.B., Capiotti, K.M., Siebel, A.M., Herrmann, A.P., Ghisleni, G., Vianna, M.R., Bogo, M.R., Lara, D.R., Bonan, C.D., 2011. Acute Restraint Stress in Zebrafish: Behavioral Parameters and Purinergic Signaling. *Neurochem. Res.* 36, 1876–1886. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0509-z>
- Poleo, G., Aranbarrio, J.V., Mendoza, L., Romero, O., 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *PAB.* 46, 429–437. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000400013>
- Qi, C., Xie, C., Tang, R., Qin, X., Wang, D., Li, D., 2016. Effect of Stocking Density on Growth, Physiological Responses, and Body Composition of Juvenile Blunt Snout

- Bream, *Megalobrama amblycephala*. J. World Aquacult. Soc. 47, 358–368. <https://doi.org/10.1111/jwas.12278>
- Read, S.M., Northcote, D.H., 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. 116, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90321-3)
- Refaey, M.M., Li, D., Tian, X., Onxayvieng, K., Tang, R., 2022. Physiological responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) reared at different stocking densities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 557, 738329. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738329>
- Refaey, M.M., Li, D., Tian, X., Zhang, Z., Zhang, X., Li, L., Tang, R., 2018. High stocking density alters growth performance, blood biochemistry, intestinal histology, and muscle quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 492, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.003>
- Refaey, M.M., Mehrim, A.I., Salem, M.F., Badreldin, A.H., El-Tarabily, K.A., Naiel, M.A.E., 2024. The synergistic effects of dietary protein and stocking density on performance, digestive enzymes, and hemato-biochemistry parameters of juvenile striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquac. Rep.* 37, 102260. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2024.102260>
- Reis Neto, R.V., Freitas, R.T.F.D., Serafini, M.A., Costa, A.C., Freato, T.A., Rosa, P.V., Allaman, I.B., 2012. Interrelationships between morphometric variables and rounded fish body yields evaluated by path analysis. *RBZ.* 41, 1576–1582. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000700004>
- Reis, A.B., Sant’Ana, D.D.M.G., Azevedo, J.F.D., Merlini, L.S., Araújo, E.J.D.A., 2009. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 303–311. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000400005>
- Ribeiro, F.M., Lima, M., Costa, P.A.T.D., Pereira, D.M., Carvalho, T.A., Souza, T.V., Botelho, H.A., Silva, F.F.E., Costa, A.C., 2019. Associations between morphometric variables and weight and yields carcass in Pirapitinga *Piaractus brachypomus*. *Aquac Res* 50, 2004–2011. <https://doi.org/10.1111/are.14099>
- Roe, J.H., Kuether, C.A., 1943. The Determination of Ascorbic Acid in Whole Blood and Urine Through the 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative of Dehydroascorbic Acid. *J. Biol. Chem.* 147, 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72395-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72395-8)

- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Langoni, A.S., Spinelli, J.T., Pereira, T.C., Dias, R.D., Souza, D.O., Bonan, C.D., Bogo, M.R., 2010. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 155, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.11.005>
- Ruiz, M.Á., Betancor, M.B., Montero, D., Caballero, M.J., Hernández-Cruz, C.M., Rosenlund, G., Fontanillas, R., Izquierdo, M.S., 2021. The effect of fish stocking density and dietary supplementation of vitamin C and micronutrients (Mn, Zn and Se) on the development of systemic granulomatosis in juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquac. Res.* 52, 5703–5718. <https://doi.org/10.1111/are.15446>
- Sandoval-Vargas, L.Y., Jiménez-Amaya, M.N., Rodríguez-Pulido, J., Guaje-Ramírez, D.N., Ramírez-Merlano, J.A., Medina-Robles, V.M., 2020. Applying biofloc technology in the culture of juvenile of *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): Effects on zootechnical performance and water quality. *Aquac. Res.* 51, 3865–3878. <https://doi.org/10.1111/are.14734>
- Santos, Fabio A.C., Boaventura, T.P., Da Costa Julio, G.S., Cortezzi, P.P., Figueiredo, L.G., Favero, G.C., Palheta, G.D.A., De Melo, N.F.A.C., Luz, R.K., 2021. Growth performance and physiological parameters of *Colossoma macropomum* in a recirculating aquaculture system (RAS): Importance of stocking density and classification. *Aquaculture* 534, 736274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736274>
- Savio, L.E.B., Leite-Aguiar, R., Alves, V.S., Coutinho-Silva, R., Wyse, A.T.S., 2021. Purinergic signaling in the modulation of redox biology. *Redox Biol.* 47, 102137. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102137>
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sousa, R.M., Silva, R.R.D.S., Santos, A.S.D., Silva, C.V.D., Magalhães, J.A., Fogaça, F.H.D.S., Lopes, J.M., 2020. Tambatinga juveniles performance in a recirculation aquaculture system with different stocking densities. *RSD* 9, e178953317. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3317>
- Souza, C.D.F., Baldissera, M.D., Barroso, D., De Lima, M.C.M., Baldisserotto, B., Val, A.L., 2021. Involvement of purinergic system and electron transport chain in two species

- of cichlids from the Amazon basin exposed to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 255, 110918. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110918>
- Souza, C.D.F., Baldissera, M.D., Barroso, D.C., Val, A.L., Baldisserotto, B., 2020. Purine levels and purinergic signaling in plasma and spleen of *Brycon amazonicus* exposed to acute heat thermal stress: An attempt to regulate the immune response. *J. Therm. Biol.* 89, 102569. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102569>
- Stevens, C.H., Croft, D.P., Paull, G.C., Tyler, C.R., 2017. Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture? *J. Fish Biol.* 91, 409–428. <https://doi.org/10.1111/jfb.13377>
- Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 179–188. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05502-9](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05502-9)
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pilarski, F., 2018. South American fish for continental aquaculture. *Rev. Aquacult.* 10, 351–369. <https://doi.org/10.1111/raq.12164>
- Wang, L., Jia, S., Guo, Xiao-rui, Lu, K., Zhang, L., Gong, J., Guo, Xue-peng, Hu, Y., Cheng, T., Shang, Q., Qiao, Z., Li, X., 2022. Effect of stocking density on growth of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) cultured in containers in a land-based recirculating aquaculture system (C-RAS). *Aquac. Res.* 53, 1518–1526. <https://doi.org/10.1111/are.15686>
- Wang, Xi., Dai, W., Xu, M., Pan, B., Li, X., Chen, Y., 2013. Effects of Stocking Density on Growth, Nonspecific Immune Response, and Antioxidant Status in African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* 65, 20667.
- Wang, Y., Ni, J., Nie, Z., Gao, J., Sun, Y., Shao, N., Li, Q., Hu, J., Xu, P., Xu, G., 2020. Effects of stocking density on growth, serum parameters, antioxidant status, liver and intestine histology and gene expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) farmed in the in-pond raceway system. *Aquac. Res.* 51, 5228–5240. <https://doi.org/10.1111/are.14862>
- Wang, Y., Zhu, J., Ge, X., Sun, S., Su, Y., Li, B., Hou, Y., Ren, M., 2019. Effects of stocking density on the growth performance, digestive enzyme activities, antioxidant resistance, and intestinal microflora of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) juveniles. *Aquac. Res.* 50, 236–246. <https://doi.org/10.1111/are.13889>
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>

Wintrobe, M.M., 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol.* 51, 32–49.

Zafar, A., Roni, M.A., Rana, M., Akter, N., 2023. Growth, digestive enzyme activities, proximate composition and hemato-biochemical responses of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at various stocking densities in a recirculatory aquaculture system. *J. Appl. Aquac.* 35, 1179–1201. <https://doi.org/10.1080/10454438.2022.2102957>

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos analisados demonstram que tanto *Colossoma macropomum* quanto *Piaractus brachypomus* apresentam capacidade adaptativa ao cultivo em sistemas de recirculação de água (RAS) sob diferentes densidades de estocagem, embora com respostas fisiológicas e zootécnicas distintas, conforme o seu estágio de desenvolvimento.

Para o *C. macropomum*, o desempenho zootécnico e os parâmetros metabólicos foram satisfatórios mesmo em altas densidades, com adaptações fisiológicas que indicam tolerância a essas condições. Já para o *P. brachypomus*, foi observado que o aumento da densidade reduz o crescimento e altera parâmetros hematológicos e bioquímicos, embora não afete negativamente o desempenho quando os peixes atingem maiores pesos corporais. Além disso, respostas oxidativas e alterações na sinalização purinérgica foram identificadas, especialmente em densidades mais elevadas, sem comprometer o desempenho produtivo. Assim, o manejo adequado da densidade de estocagem deve considerar a fase de crescimento, os efeitos fisiológicos associados e o equilíbrio entre produtividade e bem-estar animal. Recomenda-se a realização de estudos de longo prazo para avaliar os efeitos das densidades ao longo de todo o ciclo produtivo dessas espécies