Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

CONSEQUÊNCIAS DAS CONDIÇÕES DE ESCOLHA NO CRESCIMENTO E INTERAÇÕES AGONÍSTICAS DA TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*

Fernanda Pereira Corbeira da Silva

Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Botucatu – SP

2011

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus Botucatu

CONSEQUÊNCIAS DAS CONDIÇÕES DE ESCOLHA NO CRESCIMENTO E INTERAÇÕES AGONÍSTICAS DA TILÁPIA-DO-NILO, *Oreochromis niloticus*

Fernanda Pereira Corbeira da Silva

Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Botucatu – SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Silva, Fernanda Pereira Corbeira da.
Consequências das condições de escolha no crescimento e interações agonísticas da tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* / Fernanda Pereira Corbeira da Silva. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011
Orientador: Gilson Luiz Volpato
Capes: 20404000

1. Peixe - Comportamento. 2. Tilápia (Peixe).

Palavras-chave: Bem-estar; Confrontos; Escolha; Ganho de peso; Peixe.

SUMÁRIO

Resumo 1

Procedimentos de Ética 2

Introdução 3

Experimento 1 5

Material e Métodos 5

a) Peixes e condições prévias de manutenção 5

b) Delineamento experimental 5

c) Procedimentos específicos 7

c1) Manutenção dos aquários experimentais 7

c2) Morfometria 9

d) Análise dos dados 9

Resultados 9

Discussão 13

Experimento 2 16

Material e Métodos 16

a) Peixes e condições prévias de manutenção 16

b) Delineamento experimental 16

c) Procedimentos específicos 16

d) Análise dos dados 20

Resultados 20

Discussão 22

Considerações finais 25

Referências 26

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Meire, pelo exemplo de serenidade e força para suportar situações mais insuportáveis. Nos últimos meses, agradeço especialmente por sua maior aproximação e apoio.

Ao meu pai, Luiz Fernando, por ter estimulado minha curiosidade sobre o mundo natural desde minha infância e por me criar de forma perfeccionista, exaltando o que eu ainda precisava melhorar. Isso me ajuda a me tornar a cada dia uma cientista melhor, mas não somente; também me ajuda a me tornar a cada dia uma pessoa melhor.

À minha madrinha, Luzia, por estar sempre próxima e desempenhar um papel de segunda-mãe. Agradeço por ter me ajudado tanto em minha educação. Também pelo exemplo de simplicidade, luta e carisma.

À minha terapeuta, Glória, a quem devo a maior parte dos ganhos pessoais que obtive no período do mestrado. Agradeço por ter me trazido à consciência quem eu era (e por que eu era). E, no fim das contas, por ter me tornado mais 'paramétrica'.

Ao meu namorado, Fernando, pela gentileza típica dos homens que já não se fazem mais. Pelo carinho e constante apoio nas horas mais difíceis, mas também pela alegria de uma vida compartilhada a dois.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Comportamento Animal, Grazi, Carol *pink*, Mônica, Sandula, Cipó, Dani e Dani *Vic*. Cada um merece agradecimentos à parte, por ter participado de minha trajetória de maneira à parte, mas eu os uno para agradecer pelo convívio agradável e cheio de oportunidades de aprendizado.

Aos velhos amigos, que não deixaram de participar da minha vida ao longo do mestrado: Sérgio Bambirra, Amanda, Renatinha, Mari Tessarioli, Clayton, Dani Andery, Michelle, Dani *tampa*, Eduardo e Marcus. Agradeço pelas horas, caminhadas, cafés, risadas e lágrimas que construíram, ao longo dos anos, nossa amizade.

Ao meu orientador, Gilson, por confiar em minha capacidade e honestidade. Também por cada uma das inúmeras oportunidades de aprendizado, dentro e fora da vida científica, e pelo exemplo de conduta e luta por um ideal.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Antônio Carlos Tardivo, pela confecção de alguns aparatos experimentais.

Aos meus peixes de estimação de longa data, Eduardo e Band, por me intrigarem com suas personalidades, por me confirmarem diariamente sua senciência e, ainda, por tornarem minha casa uma outra sala de observação de comportamento.

A ciência não progride quando os modelos são confirmados pela investigação,
mas quando certas anomalias forçam os cientistas a questioná-los.

(Rubem Alves 1981)

RESUMO

Nós avaliamos o impacto de uma das definições recentes do estado de bem-estar em peixes, que considera que os animais estão em bem-estar quando se encontram nas condições pelas quais livremente optaram por ficar. Assim, avaliamos na tilápia-do-Nilo os efeitos de um conjunto de condições de escolha (coloração ambiental, intensidade luminosa, refúgios, substrato e frequência de alimentação) sobre o crescimento de juvenis isolados por 80 dias e sobre as interações agonísticas de adultos agrupados por quatro dias. Os peixes eram aleatoriamente inseridos em um dos três tipos de ambientes: a) aquário enriquecido com as condições de escolha da espécie, b) aquário enriquecido com condições de não-escolha da espécie, ou c) aquário não-enriquecido. Os juvenis cresceram menos na condição de escolha, o que sugere que a avaliação do bem-estar da espécie por meio de referenciais de maior crescimento pode não ser adequada. A agressão entre adultos foi mais intensa nas condições de escolha, sugerindo que os recursos presentes foram mais valorizados pelos peixes. Do ponto de vista de seu bem-estar, as condições de escolha da tilápia parecem ser as mais adequadas para sua manutenção, embora não sejam vistas como tal do ponto de vista zootécnico.

PROCEDIMENTOS DE ÉTICA

Os protocolos experimentais desta dissertação estão de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, SP (Protocolo nº 128-CEEA).

INTRODUÇÃO

A criação comercial de peixes visa produzir o maior número possível de peixes com qualidade comercial. A partir do momento que o ser humano confina espécies de peixes, passa a ser também responsável pela qualidade de vida desses indivíduos (veja Evans 2009). Nesse contexto, preocupações com o bem-estar[1] desses animais são cada vez mais relevantes, uma vez que essas produções impingem ao animal, muitas vezes, condições adversas.

O estudo científico do bem-estar animal requer, necessariamente, a operacionalização que permita a obtenção de respaldo empírico para as inferências teóricas de um estado inacessível diretamente. Nessa busca, no entanto, os indicadores de bem-estar têm sido confundidos com indicadores de estresse (vide crítica em Volpato 2009 e Volpato *et al*. 2007, 2009), admitindo-se que quanto menor o estresse, melhor a condição de bem-estar do animal. Frente a isso, uma alternativa são as análises comportamentais que visam identificar comportamentos anormais (Broom 1991), os quais indicariam estados de bem-estar ruim (*poor welfare*). No entanto, a determinação de indicadores de bem-estar decorre inexoravelmente do conceito que se tem de bem-estar (veja Huntingford 2009).

Nesse sentido, Volpato *et al*. (2007, 2009) e Volpato (2009) mostram que indicadores fisiológicos de bem-estar são praticamente improváveis de serem estabelecidos de forma universal, mesmo que apenas entre vertebrados. Isso decorre de não haver uma resposta (ou estado) universal presente em toda condição de bom bem-estar, o que seria um requisito para que a seleção natural atuasse. A condição de bem-estar inclui desde estados de baixa, quanto de alta, demanda energética do organismo, ao contrário do estresse, onde canais bem estabelecidos (controle simpático e controle pelo eixo HPI em peixes) puderam ser selecionados (veja detalhes em Volpato *et al*. 2009). Se tais indicadores são improváveis, se condições de estresse não indicam necessariamente estados de bem-estar bom ou ruim, então a alternativa deve ser outra.

Embora para o ser humano possa ser muito difícil conhecer quando um peixe está em condições de bom bem-estar, Dawkins (1983, 2006, 2008) propõe que devemos observar melhor quais são as vontades e necessidades dos animais com os quais trabalhamos. Baseados nisso, Volpato *et al.* (2007) concluem que o estado de bem-estar

[1] O termo bem-estar (*welfare*) refere-se ao estado do indivíduo, podendo, assim, ser considerado bom (*good*) ou ruim (*poor*) – vide Broom (1991).

pode ser definido como "*the internal state of a fish when it remains under conditions that were freely chosen*". Essa definição baseada na escolha dos animais implica que não se olhe somente o estado fisiológico (por ex., saúde física) do animal, mas, principalmente, se as condições nas quais ele está aquelas em que desejaria estar. Essa definição pressupõe que nas escolhas livres os animais optarão por aquelas que lhes dê maior conforto. Embora a discussão disso no referencial temporal (conforto imediato ou a longo prazo) seja mais complexa (veja Volpato 2009), parece, ao menos, um pressuposto muito razoável.

Dentro desse paradigma teórico, nesta dissertação buscamos conhecer mais detalhadamente as respostas de uma espécie de peixe quando na presença de condições de sua escolha, ou fora dela. Assim, avaliamos o efeito dessas condições no crescimento de juvenis e agressividade de adultos de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1759). A tilápia-do-Nilo foi escolhida por ser espécie de hábito territorial, onde as interações agressivas são evidentes, bem como por ser bastante usada na piscicultura, tanto nacional quanto mundial. Além disso, é uma espécie de fácil manipulação e da qual dispomos de informações sobre algumas de suas escolhas, que foram o ponto de partida para o delineamento deste estudo.

EXPERIMENTO 1

As condições de escolha afetam o crescimento dos alevinos?

MATERIAL E MÉTODOS

a) Peixes e condições prévias de manutenção

Utilizamos juvenis de tilápia-do-Nilo (Linnaeus 1759) provenientes de um estoque mantido ao menos 30 dias em tanques internos de 1.200 L (~3 peixes / 10L) antes do experimento. A água dos tanques foi mantida entre 26 e 28 ºC, pH em torno de 6.8, amônia < 0.02 ppm, nitrito < 2,0 mg/L, aeração constante, e fotofase das 07:00 às 19:00 h, promovida por meio de luz branca fluorescente (~350 Lux). Duas trocas parciais de água (~10% volume) eram realizadas semanalmente e, em seguida, o nível da água era completado com água sem cloro. Para facilitar o manejo dos peixes, os tanques não possuíam qualquer substrato ou material que permitisse refúgio. Os peixes eram alimentados em excesso uma vez ao dia com ração comercial para peixes tropicais (36% de proteína).

b) Delineamento experimental

O delineamento consistiu em avaliar o crescimento dos juvenis socialmente isolados em um dos três tipos de ambiente: a) enriquecido com condições previamente determinadas como de escolha da tilápia-do-Nilo (“escolha”), b) enriquecido com condições de não-escolha da espécie (“não-escolha”), ou c) não-enriquecido (detalhes na Tabela 1). O tratamento “não-escolha” foi criado para avaliar se possíveis diferenças no crescimento se deveram, de fato, à presença das condições de escolha, e não à presença de algum enriquecimento.

Nesses tratamentos, os animais foram mantidos por 80 dias. A cada 20 dias quantificamos o peso e o comprimento padrão de cada peixe. Dessas medidas, calculamos as seguintes variáveis: ganho de peso, ganho em comprimento, taxa de crescimento específico (tanto para peso quanto comprimento), coeficiente de variação de peso e comprimento e relação peso/comprimento. Embora 14 peixes tenham sido estudados em cada tratamento, morreu um peixe no tratamento “não-escolha” e um no “não-enriquecido”.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos aplicados aos juvenis de tilápia-do-Nilo.

Tratamentos	Composição				
	Cor das paredes do aquário	Intensidade luminosa (lux)	Refúgio	Substrato de fundo	Alimentação
Escolha	Amarelas[1,2]	80[1]	1 verdadeiro (cilindro de 12 x 7,5 cm)[3]	Sim[3]	80% às 08:00 h[4] e o restante às 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h, 16:00 h e 18:00 h
Não-escolha	Vermelhas	350[1]	1 falso[3] (cilindro de 12 x 7,5 cm, sem as paredes)	Não[3]	50% às 08:00 h e 50% às 14:00 h
Não-enriquecido	Brancas	350	Não	Não	50% às 08:00 h e 50% às 14:00 h

[1]Freitas 2011

[2]Luchiari *et al*. 2007

[3]Delicio *et al*. 2006

[4]Rodrigues 2011

c) Procedimentos específicos

c1)Manutenção dos aquários experimentais

Cada aquário experimental tinha capacidade para 16 L e possuía um filtro biológico. As condições dos respectivos tratamentos são mostradas na Figura 1. O fundo de cada aquário era sifonado duas vezes por semana, perfazendo uma troca parcial de ~1/3 da água e, em seguida, o nível era completado com água isenta de cloro. Durante a sifonagem cuidávamos para eliminar fezes e restos alimentares, evitando, assim, prejuízos à qualidade da água. Amônia, nitrito, pH e O_2 dissolvido foram avaliados em amostras de aquários no início do experimento. Todos os valores coletados se enquadraram na faixa ideal para a manutenção de peixes tropicais (Tabela 2).

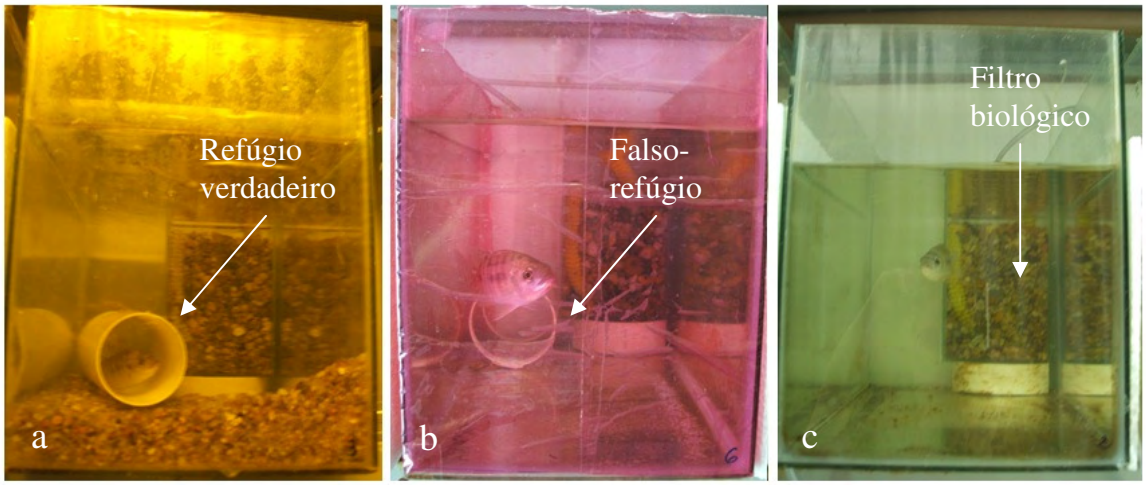


Fig. 1: Condições físicas dos tratamentos (cor, intensidade de luz, substrato e toca)**.** (a) aquários enriquecidos com condições de escolha da tilápia-do-Nilo; (b) enriquecidos com condições de não-escolha da espécie; (c) não-enriquecidos.

A quantidade de ração fornecida para cada peixe correspondia a 3% do peso, o suficiente para gerar sobras. A cada 20 dias, a quantidade era corrigida conforme o novo peso mensurado. Todavia, à medida que o inverno se aproximou, as sobras ficaram maiores que o desejado. Para não comprometer a qualidade da água, em torno do 40º dia reduzimos a quantidade de ração para 1% do peso corporal para todos os tratamentos.

Tabela 2: Condições da água nos tratamentos.

Tratamentos	Amônia (ppm)		Nitrito (mg/L)		pH		O_2 (ppm)		Temperatura***
	Observado	Ideal	Observado	Ideal	Observado	Ideal	Observado	Ideal	
Escolha	0,001		0,3 a 0,5		7		4 a 6		23,9 ± 0,48
Não-escolha	0	< 0,02*	0,15 a 0,5	< 2**	6,8 a 7	6,7 a 7,3*	4 a 6	4 a 11*	24,2 ± 0,41
Não-enriquecido	0 a 0,016		0 a 0,5		6,8 a 7		4 a 6		24,0 ± 0,45

*LabconTest®

**BioNature®

***Dados médios (± DP) do período total (de 0 a 80 dias).

c2) Morfometria

O peso foi medido em balança digital (aproximação de 0,001 g) e o comprimento com régua (aproximação de 1 mm). A taxa de crescimento específico (TCE), baseada em Kearney *et al*. (2008), foi calculada como $TCE\ (\%\ dia^{-1}) = [(lnW_f - lnW_i)/t]$, onde: W_i = peso ou comprimento médio inicial (g);W_f = peso ou comprimento médio final (g) e t = tempo (dias).

d) Análise dos dados

Embora tenhamos iniciado o experimento com 14 réplicas em cada tratamento, dois aquários do tratamento "não-escolha" apresentaram temperatura mais alta que as demais, enquanto três do tratamento "escolha" tiveram temperatura mais baixa. Como a temperatura influencia diretamente o crescimento dos peixes, nós excluímos os dados desses 5 peixes de todo o experimento. Além disso, houve uma morte no tratamento "não-escolha" e outra em "escolha".

A normalidade dos dados foi testada por qui-quadrado e a homocedasticidade pelo teste de Levene. O peso no dia 0 e a temperatura média do período total não apresentaram distribuição normal, mesmo quando transformados, e, por isso, foram comparados entre tratamentos por Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. O peso e o comprimento-padrão entre os dias 20 e 80 foram analisados por ANOVA de medidas repetidas no tempo, seguida de HSD para experimento não balanceado. O comprimento-padrão no dia 0, o ganho de peso e o ganho de comprimento, a TCE do peso (transformado em raiz para alcançar normalidade), a TCE do comprimento e a relação peso/comprimento foram comparados por ANOVA para experimentos inteiramente casualizados, seguida de HSD (n desigual). Em todas as análises o nível de significância foi mantido em $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Como necessário, no dia 0 do experimento os peixes dos três tratamentos não diferiram quanto ao peso (Kruskal-Wallis, p = 0,431, Kw = 1,643) e comprimento-padrão (ANOVA, p = 0,659, F = 0,42). Entretanto, ao longo do tempo todos os peixes aumentaram em peso (Fig. 2a) e comprimento (Fig. 2b) a cada avaliação, sem diferença entre os tratamentos.

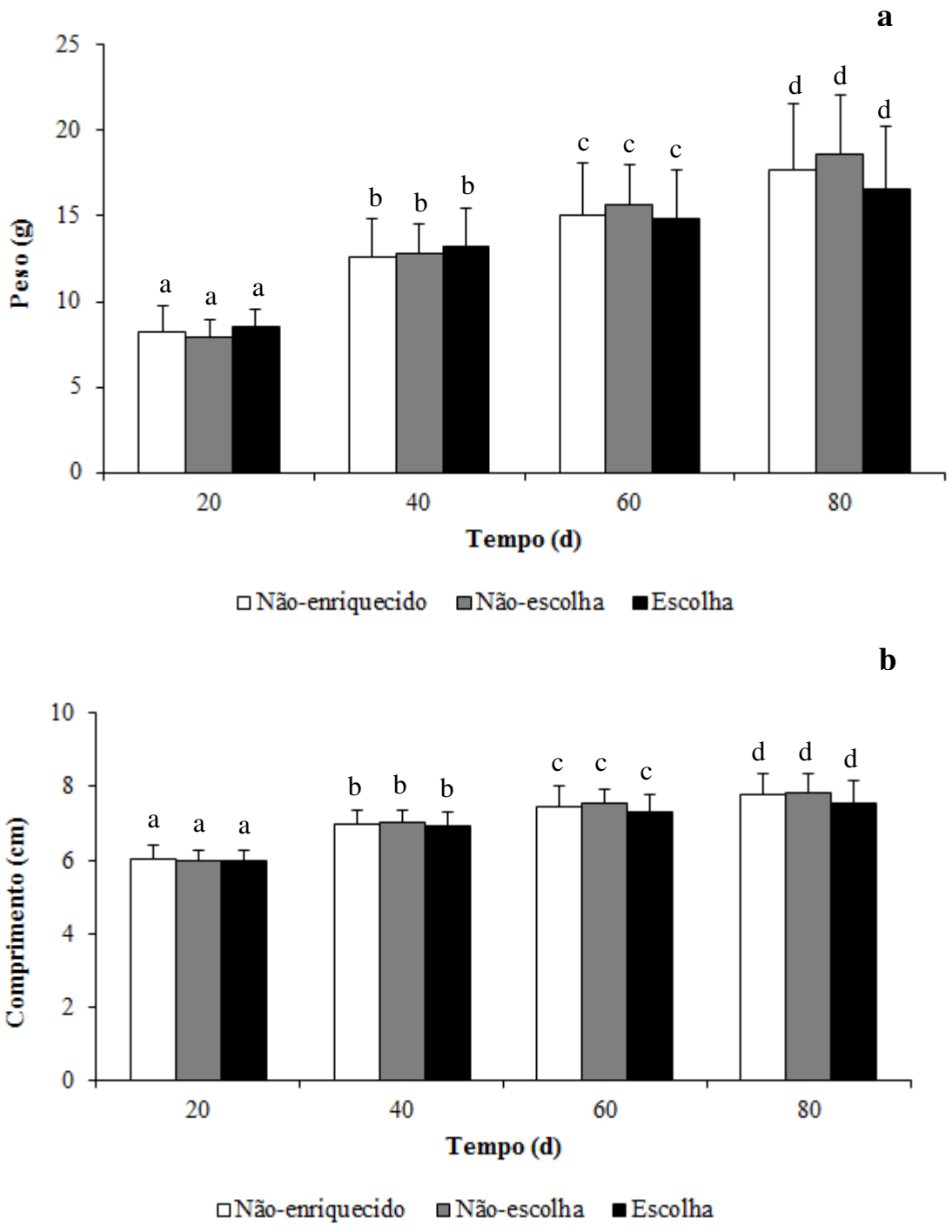


Fig. 2: Biometria dos peixes sob as condições de tratamento. Dados médios (+ DP) de 13 peixes isolados nos tratamentos "não-enriquecido" e 11 em "não-escolha" e "escolha". Letras diferentes indicam diferença significativa num mesmo tratamento ao longo do tempo (ANOVA, medidas repetidas, teste complementar com HSD). (a) peso ($p < 0,0001$ e $F = 353,379$) Não houve diferença entre tratamentos em cada tempo ($p = 0,888$ e $F = 0,119$). (b) comprimento-padrão ($p < 0,0001$ e $F = 467,43$). Não houve diferença entre tratamentos em cada tempo ($p = 0,609$ e $F = 0,50$).

O ganho de peso dos peixes no período total (0 a 80 dias) não diferiu entre tratamentos (Fig. 3a). Entretanto, a análise visual dos gráficos da Figura 2 é sugestiva de que haja algum efeito que se inicia com maior tempo de experimento. Assim, na Figura 3b comparamos os tratamentos no período restrito aos dias 60 e 80, revelando que o ganho de peso foi maior no tratamento "não-escolha" que no "escolha".

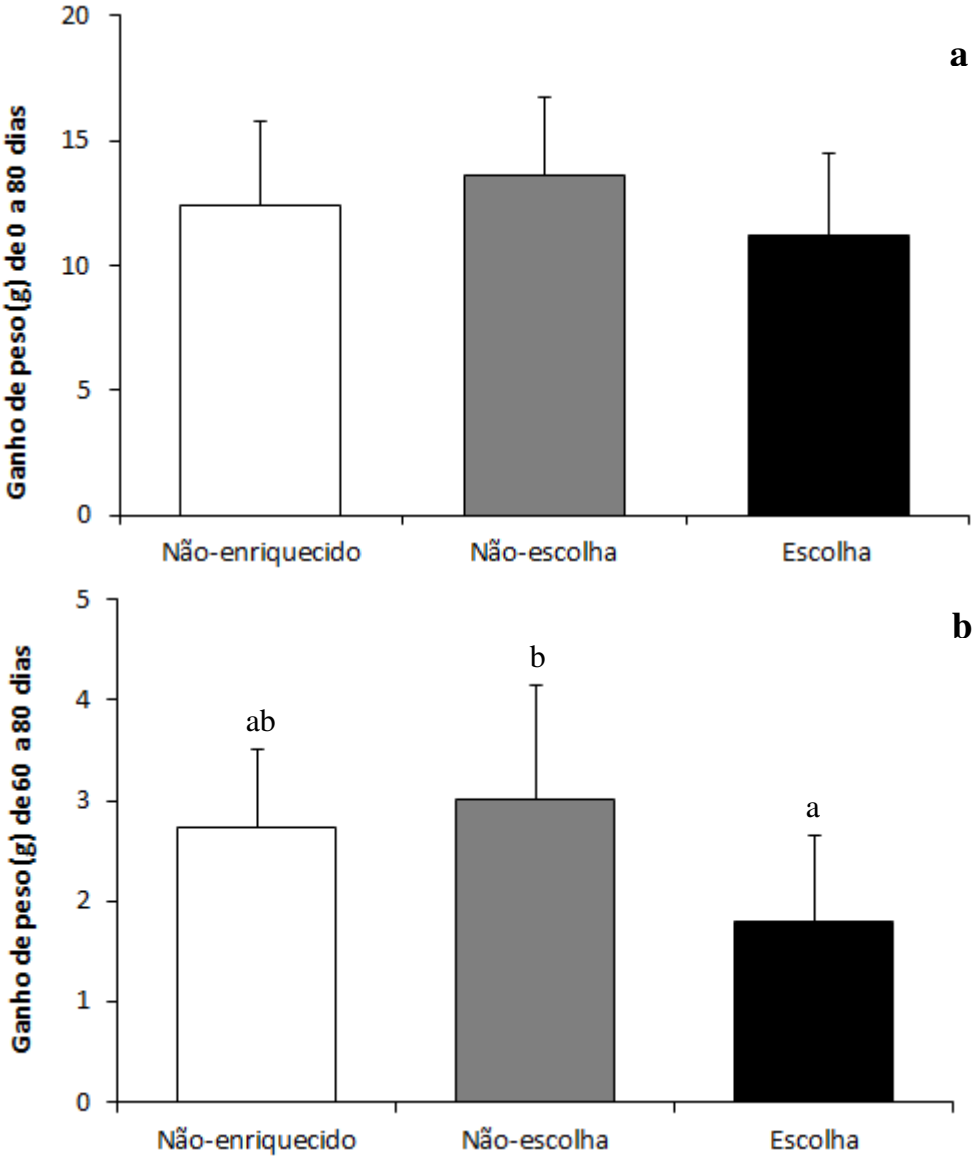


Fig. 3: Ganho de peso dos peixes sob as condições de tratamento. Dados médios (+ DP) de 13 peixes isolados nos tratamentos "não-enriquecido" e 11 em "não-escolha" e "escolha". ANOVA seguida de HSD. (a) 0 a 80 dias ($p = 0,235$, $F = 1,517$). (b) 60 a 80 dias ($p = 0,012$, $F = 5,099$).

O ganho de comprimento dos peixes no período total (0 a 80 dias) não diferiu entre tratamentos (ANOVA, $p = 0,144$, $F = 2,059$). O mesmo aconteceu com o ganho de comprimento entre os dias 60 e 80 (ANOVA, $p = 0,313$, $F = 1,204$).

A condição de “escolha” reduziu a TCE do peso dos peixes no período de 80 dias em relação à condição “não escolha” (Fig. 4a). Porém, quando restrita ao período de 60 a 80 dias, a TCE foi maior nos tratamentos “não-enriquecido” e “não escolha” em relação ao ambiente enriquecido com itens de escolha do peixe (Fig. 4b). A TCE do comprimento dos peixes, por sua vez, não diferiu entre tratamentos (dados não incluídos; ANOVA, p = 0,093, F = 2,562). Após manutenção por 80 dias nos tratamentos, observamos que os tratamentos não afetaram a relação peso/comprimento (ANOVA, p = 0,215, F = 1,614).

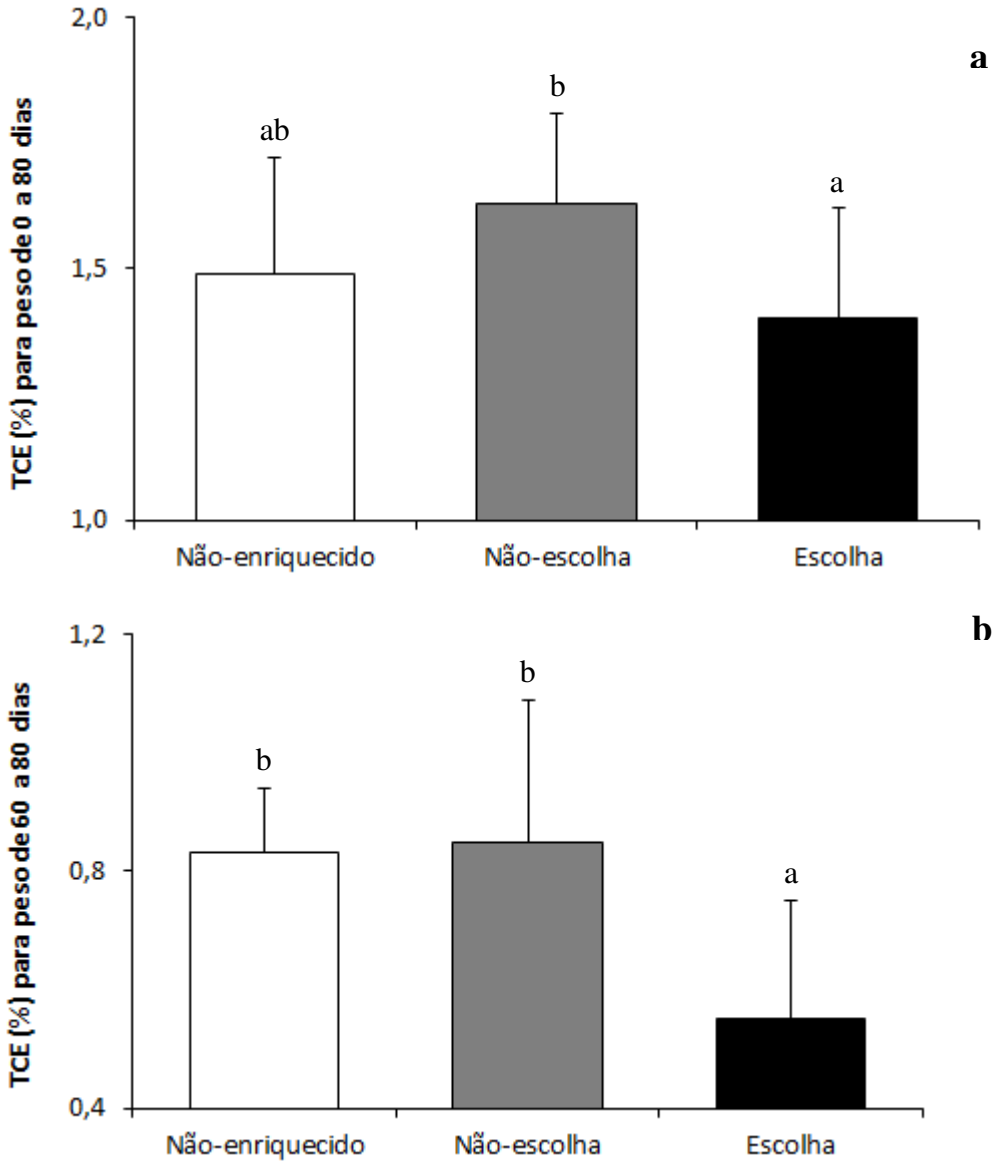


Fig. 4: Taxa de crescimento específico (TCE) do peso dos peixes sob as condições de tratamento. Dados médios (+ DP) de 13 peixes isolados nos tratamentos “não-enriquecido” e 11 em “não-escolha” e “escolha”. ANOVA seguida de HSD. (a) 0 a 80 dias (p = 0,048, F = 3,346). (b) 60 a 80 dias (p < 0,001, F = 8,697).

Além das variáveis quantificadas acima, o comportamento dos peixes diferiu qualitativamente entre os tratamentos. Na iminência de serem capturados, ou quando o experimentador introduzia a mangueira para sifonar o fundo do aquário, todos os peixes do tratamento "escolha" se dirigiram para dentro do refúgio. O mesmo não aconteceu com os peixes do tratamento "não-escolha", que apresentava um falso-refúgio. Além disso, também notamos que os peixes do tratamento "escolha", único tratamento com substrato de fundo, remexeram o substrato formando depressões muito similares aos ninhos que os adultos constroem.

DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que a manutenção de juvenis de tilápia-do-Nilo isolados em condições de enriquecimento afeta seu crescimento, dependendo se os itens foram ou não de escolha da espécie. Tal constatação pode ter importantes implicações para referenciais sobre o bem-estar desta espécie e também para o próprio conceito de bem-estar. Detectamos que nas condições de enriquecimento com elementos de "não-escolha" da tilápia, ou sem enriquecimento, elas crescem mais que nas condições onde o enriquecimento foi feito com elementos de "escolha" da espécie. Esses dados sugerem que ou as condições de escolha não sejam adequadas para o bem-estar da espécie em contextos mais longos, ou que maior crescimento possa não significar, necessariamente, melhores condições para o peixe.

Inicialmente, constatamos que os refúgios verdadeiro e falso foram, na prática, apropriados para os propósitos deste estudo. Isso decorre de todos os peixes do tratamento "escolha" terem usado o refúgio verdadeiro, enquanto que o falso refúgio não era usado com frequência. Isso notamos nos casos em que a aproximação diária do experimentador fazia com que os peixes adentrassem o refúgio, mas não se aproximassem do falso refúgio. Além disso, houve nítida interação dos peixes com o substrato, inclusive com muitos animais escavando-o. Note que a tilápia-do-Nilo é uma espécie que constrói ninhos escavando o substrato (Gonçalves-de-Freitas e Nishida 1998), de forma que a escavação detectada aqui sugere o papel do substrato como elemento de enriquecimento.

O resultado mais interessante deste estudo foi que o maior crescimento da tilápia-do-Nilo ocorreu nas condições sem enriquecimento ou com enriquecimento com

itens que não são da escolha dessa espécie. Ou seja, ela cresceu menos quando em ambiente com elementos de sua preferência. Essa constatação levanta o seguinte dilema: ou as condições de escolha não ofereceram condições de melhor conforto ou taxas de maior crescimento não indicam boas condições de bem-estar.

Os itens de escolha e não-escolha deste estudo foram selecionados com base em estudos prévios que testaram a escolha da tilápia-do-Nilo a curto prazo (até quatro dias) por três ou mais opções. No entanto, um estudo recente desenvolvido em nossos laboratórios (Maia & Volpato 2010) mostra que escolhas estabelecidas em curto prazo podem não significar preferências (escolhas consistentes no tempo). Esses autores observaram juvenis da espécie mantidos em isolamento social por 10 dias, sendo que a cada dia, no mesmo horário, eles eram inseridos em um aquário-teste com opções de escolha. Como resultado, as escolhas do primeiro dia geralmente não se mantiveram ao longo dos demais dias. Além disso, nesse estudo os autores viram que cada peixe pode ter uma preferência e que as determinações de preferência para a "espécie" ou populações da espécie podem ser falaciosas. Aves criadas a longo prazo (28 dias) em determinada cor posteriormente escolhem qualquer outra que não aquela de criação (Praiytno *et al*. 1997). Assim, não podemos negar que nossos peixes podem ter se fartado das condições em que estavam sendo mantidos, mesmo sendo a preferida em estudos de consistência mais aguda (quatro dias). Porém, mesmo que as restrições deste parágrafo sejam válidas num certo contexto, elas devem se aplicar tanto aos itens de escolha quando aos de não escolha. Assim, esta crítica não justifica as diferenças de crescimento entre tratamentos. Afinal, por que aqueles do tratamento "escolha" cresceram menos? Ou porque os dos outros tratamentos cresceram mais? De alguma forma os tratamentos afetaram o crescimento e, portanto, suas condições intrínsecas relativas às escolhas tiveram um efeito considerável.

Além do mais, não há indícios de que os elementos contidos na condição "escolha" possam ter desfavorecido o crescimento dos peixes. A atividade alimentar espontânea da tilápia ocorre preferencialmente no período escuro (Fortes-Silva *et al.* 2010), de forma que a baixa intensidade luminosa (80 lux) não diminuiria a ingestão alimentar (o que poderia se pensar por ser a tilápia uma espécie diurna e ter a acuidade visual reduzida no escuro). A presença de substrato, por propiciar aos juvenis oportunidades de remexerem o fundo, poderia deslocar energia e, consequentemente, reduzir o crescimento dos peixes. Todavia, mesmo a atividade de construção de ninhos em adultos, que exige grande movimentação de peso de substrato, não afeta

significativamente o gasto energético da tilápia (Gonçalves-de-Freitas 1999). Assim sendo, eventuais exibições dessa atividade no presente estudo não podem explicar o menor crescimento dos peixes do tratamento com enriquecimento com condições de "escolha". Em relação à frequência de oferecimento do alimento, tilápias criadas em regime de auto-alimentação (*self-feeding*) apresentam melhores condições, como visto por melhor resposta imunológica e coloração corporal mais clara (Endo *et al*. 2002) comparadas àquelas alimentadas apenas uma vez ao dia. Segundo Sanches & Hayashi (2001), o melhor desempenho de crescimento da tilápia-do-Nilo ocorre com alimentações em frequência acima de quatro vezes ao dia. Assim, no conjunto, essas condições não explicam o menor crescimento da tilápia na condição "escolha".

A morte de um peixe do tratamento "não-enriquecido" e um do "não-escolha" pode indicar que as condições desses dois tratamentos prejudicaram esses peixes, embora a *causa mortis* não tenha sido detectada. Nesse caso, os peixes do tratamento "escolha" teriam estado em melhores condições. No conjunto, a análise acima é mais condizente com a interpretação de que as condições de escolha levaram a uma menor taxa de crescimento. Embora isso requeira mais investigações, inclusive com condições de escolha personalizadas para cada peixe e detectadas de estudos mais crônicos, devemos ficar cautelosos para aceitarmos que maiores taxas de crescimento indiquem condições de bom "bem-estar" nos peixes. Corroborando esta interpretação, vejamos que porcos criados em condições alternativas, chamadas de "amigáveis" para seu bem-estar (em grandes grupos sociais e com substrato) apresentam menor ganho de peso que porcos criados no confinamento convencional (Morrison *et al.* 2007).

EXPERIMENTO 2

As condições de escolha afetam as interações agonísticas entre adultos?

MATERIAL E MÉTODOS

a) Peixes e condições prévias de manutenção

As condições de alojamento são as mesmas descritas no Experimento 1, com a exceção de que os peixes foram mantidos em tanques internos por cerca de seis meses até o início desse experimento.

b) Delineamento experimental

Avaliamos as interações agonísticas de grupos de cinco adultos alojados em um de três tipos de ambientes (escolha, não-escolha e não-enriquecido) cuja composição está detalhada na Tabela 3. Os grupos eram formados no final da tarde de um dia e inseridos aleatoriamente (experimento inteiramente casualizado) em aquários de 120 L (Fig. 5). Por quatro dias foram realizadas filmagens no período da tarde (10 min cada aquário) para registro das interações agonísticas. Estudamos 12 grupos (réplicas) para os tratamentos "não-escolha" e "não-enriquecido" e 11 para o tratamento "escolha".

c) Procedimentos específicos

A formação dos grupos para cada réplica considerou as diferenças de sexo e tamanho dos animais. Cada grupo de adultos era constituído de um macho maior, outro macho menor e três fêmeas menores que os machos e similares entre si (Tabela 4). No dia seguinte ao estabelecimento dos grupos, os peixes eram alimentados no período das 8:00 às 18 h, sempre com a mesma quantidade de ração, oferecida a cada grupo na frequência característica de seu respectivo tratamento experimental. As filmagens eram feitas entre 14:30 e 17:30 h sem a presença de qualquer pessoa no recinto. Quando algum peixe morria ou estava em condições físicas que comprometessem sobremaneira sua saúde, ele era retirado e as observações eram continuadas até o final dos quatro dias ou até que restasse apenas um indivíduo (quando a réplica era então desfeita). Quando alguma desova era detectada no grupo, a réplica era finalizada.

Tabela 3: Descrição dos tratamentos aplicados a grupos de adultos.

Tratamentos	Composição				
	Cor das paredes do aquário	Intensidade luminosa (lux)	Refúgio	Substrato de fundo	Alimentação
Escolha	Amarelas[1,2]	80[1]	4 verdadeiros[3] (cilindro de 12 x 7,5 cm)	Areia grossa[4]	80% às 08:00 h[5] e o restante às 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h, 16:00 h e 18:00 h
Não-escolha	Vermelhas[1]	350[1]	4 falsos[3] (cilindro de 12 x 7,5 cm, sem as paredes)	Cascalho de rio[4]	50% às 08:00 h e 50% às 14:00 h
Não-enriquecido	Brancas	350	Não	Não	50% às 08:00 h e 50% às 14:00 h

[1]Freitas 2011

[2]Luchiari *et al*. 2007

[3]Delicio *et al*. 2006

[4]Gonçalves-de-Freitas 2010

[5]Rodrigues 2011

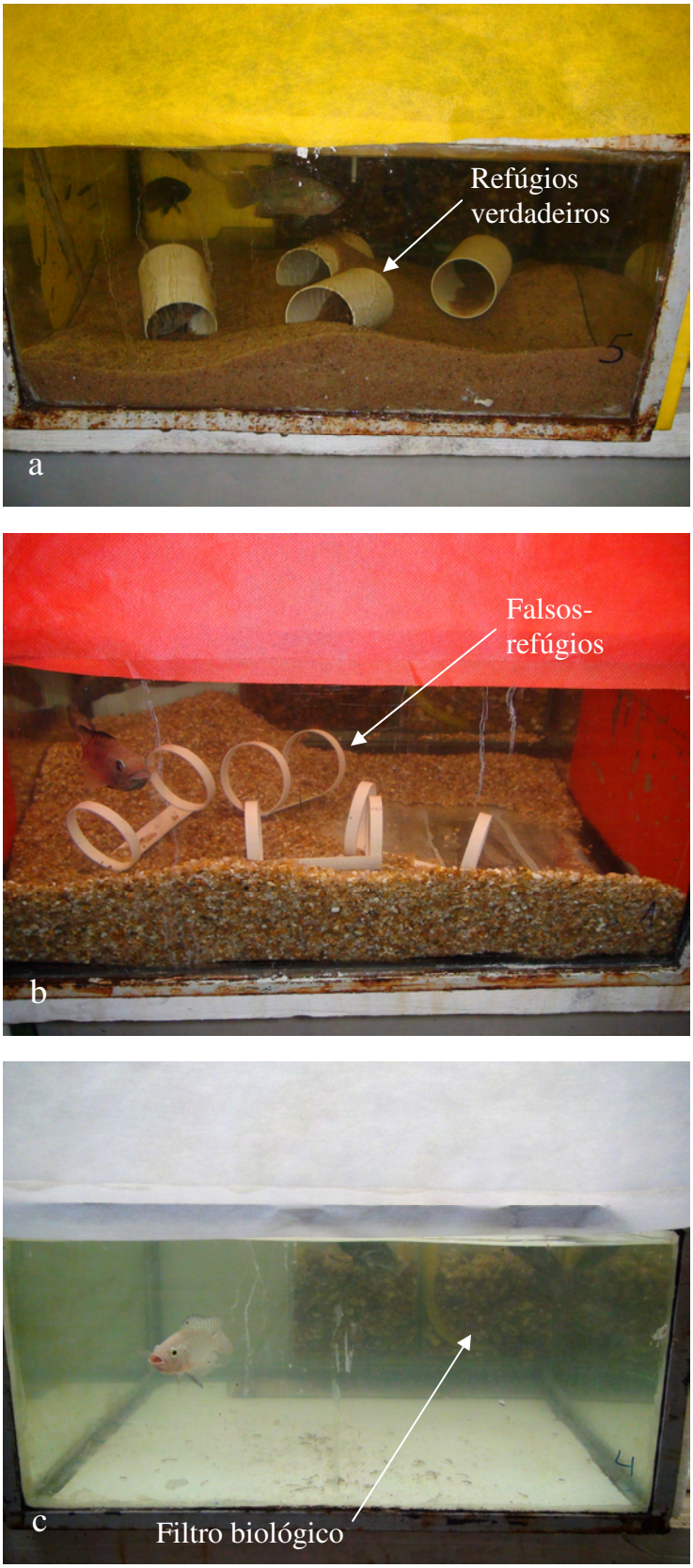


Fig. 5: Condições físicas dos tratamentos (cor, intensidade de luz, substrato, toca)**.** (a) aquários enriquecidos com condições de escolha da tilápia-do-Nilo; (b) enriquecidos com condições de não-escolha da espécie; (c) não-enriquecidos.

Tabela 4: Biometria média dos peixes de cada tratamento.

Categoria	Tratamento	Peso (g)	P	F	CP (cm)	P	F
Macho 1	Escolha	46,15 ± 11,29	0,88	0,13	11,16 ± 0,83	0,82	0,20
	Não-escolha	48,03 ± 7,25			11,28 ± 0,60		
	Não-enriquecido	47,41 ± 6,12			11,36 ± 0,74		
Macho 2	Escolha	33,44 ± 7,17	0,44	0,84	10,11 ± 0,65	0,53	0,65
	Não-escolha	36,89 ± 7,09			10,45 ± 0,65		
	Não-enriquecido	35,60 ± 4,44			10,31 ± 0,79		
Fêmeas	Escolha	28,03 ± 7,91	0,40	0,92	9,34 ± 0,91	0,45	0,81
	Não-escolha	29,73 ± 4,16			9,57 ± 0,48		
	Não-enriquecido	27,78 ± 4,6			9,43 ± 0,67		

CP = comprimento padrão.
P e F = valores da ANOVA (experimentos inteiramente casualizados).
N = 12 réplicas nos tratamentos "não-enriquecido" e "não-escolha" e 11 em "escolha".

Na análise das filmagens registrávamos todas as ocorrências dos principais tipos de interações agonísticas (adaptado de Alvarenga e Volpato 1995 e Medeiros *et al.* 2007): perseguição, mordida, confronto frontal, ameaça lateral e fuga (Tabela 5). Uma vez que o substrato é um recurso importante para adultos de tilápia-do-Nilo, nos tratamentos em que ele estava presente avaliamos a interação dos peixes com o substrato. Para tanto, registramos o tempo que os peixes despenderam construindo ninhos (depressões em forma aproximada de cone), bem como o número de ninhos presentes e a diferença entre a maior e menor altura do substrato (que poderia refletir a intensidade da escavação).

Tabela 5: Etograma utilizado para registro de interações agonísticas em grupos de adultos de tilápia-do-Nilo.

Comportamento	Descrição
Perseguição	Um peixe segue o oponente, que nada na direção oposta
Mordida	Um peixe morde o oponente em qualquer região do corpo
Confronto frontal	Dois peixes se aproximam frontalmente um do outro com a boca aberta e se mordem com as bocas unidas
Ameaça lateral	Um ou dois peixes se posicionam paralelos entre si e ondulam a cauda
Fuga	Um peixe atacado vai para longe da área de confronto ou escapa de uma mordida
Confrontos totais	Soma das interações agonísticas, exceto fuga

d) Análise de dados

Avaliamos a média das interações obtidas nos quatro dias de observação para analisarmos cada comportamento agonístico entre os tratamentos. Os três tratamentos apresentaram, no total das interações agonísticas, alguns valores *outliers* (acima da média) que foram substituídos pela média do respectivo comportamento e tratamento.

A normalidade dos dados foi testada por qui-quadrado e a homocedasticidade por teste de Levene. Os dados de perseguição e confrontos totais foram comparados entre tratamentos por ANOVA (experimentos inteiramente casualizados) seguida de HSD para amostras não balanceadas. Ameaça lateral foi normalizada [raiz(x + ½)] e comparada entre tratamentos também por ANOVA. Mordidas, confronto frontal e fuga não apresentaram normalidade, mesmo com a transformação, e foram comparados entre tratamentos por Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Os dados de uso do substrato (tempo em construção de ninho, amplitude de variação do nível e número de ninhos) foram comparados entre os tratamentos "não-escolha" e "escolha" por teste t de Student. A frequência de mortalidade foi comparada entre tratamentos por teste de proporção de Goodman (1964). Em todas as análises o nível de significância foi mantido em $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Embora a frequência das filmagens não nos permita analisar a latência para o estabelecimento da hierarquia nos grupos de peixes, observamos que em todas as réplicas estudadas o macho maior logo assumia a posição de dominância e estabelecia como seu território a quase totalidade do fundo do aquário. Esses peixes apresentavam o olho e o corpo mais claros que os subordinados. Os subordinados ocupavam algum canto ou a superfície do aquário, onde permaneciam quietos e distantes do dominante.

Os peixes do tratamento "não-enriquecido" exibiram mais perseguições que os peixes dos tratamentos "não-escolha" e "escolha" (Fig. 6). Todavia, os tratamentos não afetaram os demais comportamentos agonísticos: mordida ($p = 0,099$, $Kw = 4,627$), confronto frontal ($p = 0,319$, $Kw = 2,283$), ameaça lateral ($p = 0,556$, $F = 0,598$), total de confrontos ($p = 0,116$, $F = 2,303$) e fuga ($p = 0,1080$, $Kw = 4,451$). Os tratamentos também não afetaram os comportamentos referentes ao uso do substrato (Fig. 7). Além das variáveis quantificadas acima, outras observações importantes foram coletadas e se encontram na Tabela 6.

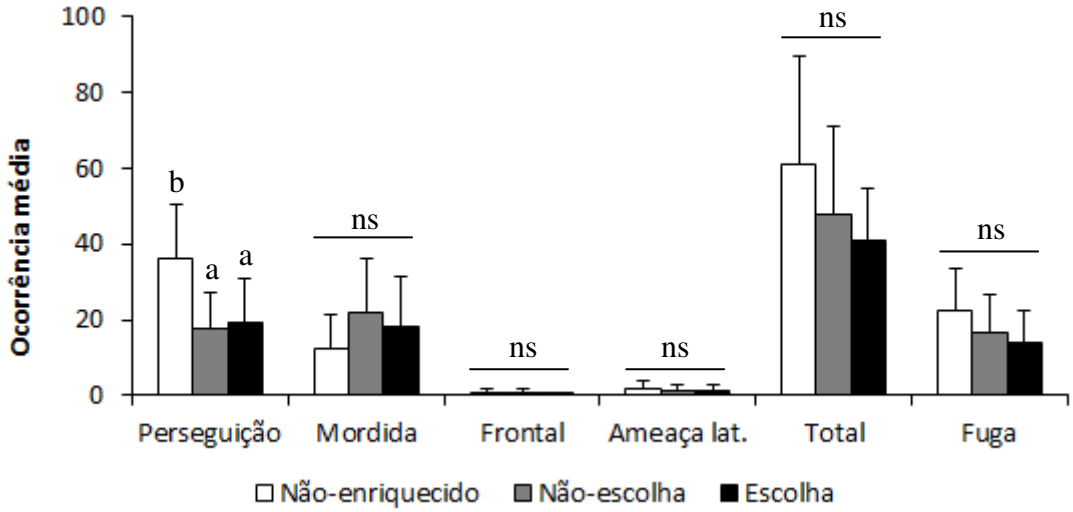


Figura 6. Interações agonísticas em grupos de adultos sob as condições de tratamento. Dados médios (+ DP) de 12 réplicas (com cinco peixes) nos tratamentos "não-enriquecido" e "não-escolha" e 11 em "escolha". Letras diferentes indicam diferença entre tratamentos ($p < 0,001$, $F = 8,779$) e *ns* indica ausência de diferença. ANOVA seguida de HSD. Houve 4 a 5 valores *outliers* em cada tratamento (não-enriquecido: 81,5 em perseguição, 74,2 em mordida, 11,0 em confronto frontal, 9,0 em ameaça lateral; não-escolha: 45,0 em perseguição, 73,0 em mordida, 8,0 em ameaça lateral, 46,5 em fuga; escolha: 83,7 em perseguição, 2,0 em confronto frontal, 7,5 em ameaça lateral, 43,5 em fuga, 92,5 em confrontos totais). Esses *outliers* foram substituídos pelas respectivas médias.

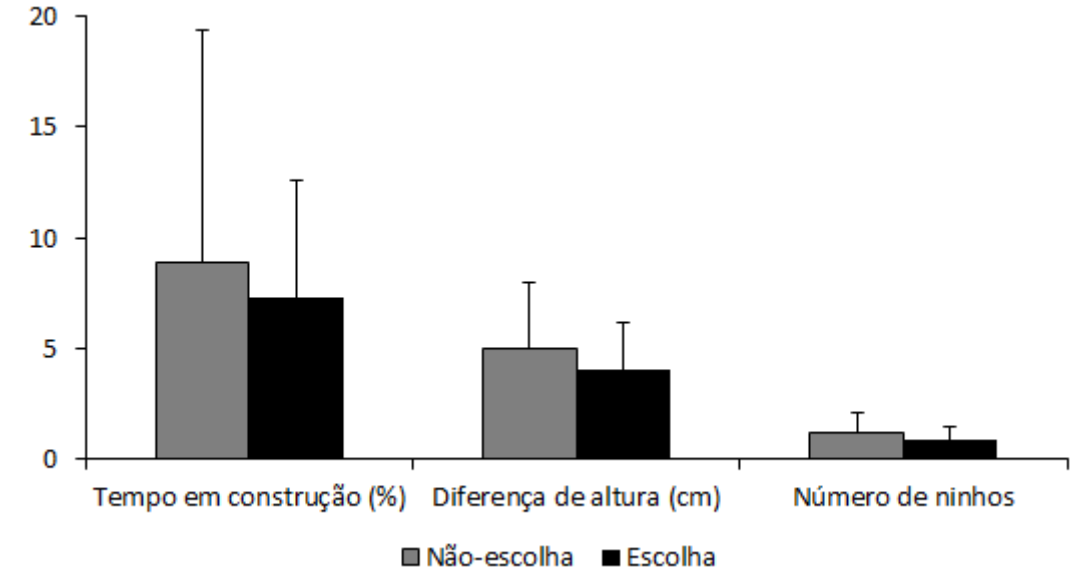


Figura 7. Efeito dos tratamentos na construção de ninho. Dados médios (+ DP) dos quatro dias de 12 réplicas (cinco peixes em cada) nos tratamentos "não-enriquecido" e "não-escolha" e 11 em "escolha". Teste t de Student. Da esquerda para a direita: porcentagem de tempo despendido em construção de ninho ($p = 0,649$, $t = 0,461$); amplitude de variação da altura do substrato ($p = 0,372$, $t = 0,913$); número de ninhos construídos ($p = 0,309$, $t = 1, 042$).

Tabela 6: Mortalidade, reprodução e desmanche de réplicas em grupos de adultos de tilápia-do-Nilo.

Tratamento	*N**	Mortes	Reproduções	Desmanche de réplicas**
Não-enriquecido	12	6[a]	1	0
Não-escolha	12	15	1	0
Escolha	11	19[b]	0	2

*Cada réplica consistia em um grupo formado por dois machos e três fêmeas.
**O desmanche de réplicas acontecia quando quatro peixes eram mortos.
Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos (teste de proporção de Goodman 1964).

DISCUSSÃO

Aqui mostramos que o ambiente enriquecido com condições de escolha da espécie favorece a expressão de seus comportamentos naturais, no caso a agressividade. Quando isso não é benéfico para os interesses dos produtores, emergem questões relevantes sobre o bem-estar dos animais criados.

Inicialmente, observamos que o estabelecimento da hierarquia de dominância ocorreu nos três tratamentos. O macho maior sempre assumia a posição de dominância e estabelecia como seu território a quase totalidade do fundo do aquário, como previamente descrito (Gonçalves-de-Freitas e Nishida 1998). Como relatado por Corrêa *et al*. (2003), os subordinados ocupavam algum canto ou superfície do aquário, onde permaneciam distantes do dominante e, em geral, quietos. Numa análise visual observamos que os olhos e o corpo dos dominantes eram mais claros que os dos subordinados, o que confirma sua posição social (Mendonça e Gonçalves-de-Freitas 2008; Volpato *et al.* 1989, 2003).

Para entendermos as respostas agonísticas da tilápia-do-Nilo detectadas neste estudo, precisamos saber o significado da agressão para esses animais. A agressão tem sido definida como um comportamento com intenção nítida de infligir dano físico em qualquer outro indivíduo (Nelson 2006). O comportamento agressivo foi evolutivamente moldado em virtude de ser uma resposta adaptativa (Lee 2002). Os ciclídeos são peixes tipicamente territoriais e agressivos, ou seja, são espécies onde alguns problemas de sobrevivência foram resolvidos pela possibilidade de expressar atos agressivos aos coespecíficos. Uma das consequências do ato agressivo é a determinação da relação de dominância/subordinação entre indivíduos de uma mesma

espécie, de forma que as interações agonísticas entre dois ou mais indivíduos decidem qual deles ganhará o acesso prioritário ao recurso que está sendo disputado (Nelson 2006). Embora a agressividade da tilápia não seja desejada do ponto de vista do piscicultor, é importante destacarmos que, do ponto de vista do peixe dominante, ela é adaptativa no sentido de garantir acesso prioritário aos recursos que determinam um maior sucesso reprodutivo (principalmente alimento e parceiros sexuais). Ainda que não saibamos se as fêmeas da tilápia-do-Nilo preferem os machos mais agressivos, isso acontece em outros peixes invasores e agressivos (Gozlan *et al*. 2003) e é bem plausível que também ocorra na tilápia. Assim, a agressão pode ser vista como um mecanismo adquirido ao longo da evolução e que confere vantagem adaptativa, mesmo que somente a alguns indivíduos do grupo. Portanto, sua expressão é esperada nas espécies que assim evoluíram, como é o caso da tilápia-do-Nilo.

No presente estudo vimos que a condição isenta de enriquecimento ambiental aumentou as perseguições. Esse é um comportamento que decorre de um conspícuo estabelecimento hierárquico (Corrêa *et al*. 2003) e, num ambiente de espaço restrito, da impossibilidade de saída do subordinado do espaço territorial do dominante. Estranho seria se a tilápia-do-Nilo, espécie territorial agressiva, num ambiente restrito reduzisse as brigas. Aliás, apenas uma visão puramente antropomórfica, ou mesmo centrada nos requisitos da produção animal em confinamento, poderia estabelecer como critério de bem-estar a redução das interações agonísticas nesse caso.

A maior frequência de perseguições e a menor mortalidade (10% dos peixes) no tratamento "não-enriquecido" sugerem que o estabelecimento da hierarquia foi mais efetivo nesse tratamento. Afinal, quando há perseguição é porque um dominante persegue um subordinado. O oposto parece ter acontecido nos tratamentos "não-escolha" e "escolha": as perseguições foram menos frequentes e a mortalidade mais elevada (respectivamente 25% e 34,54%, estatisticamente superior neste último). Essa interpretação é sustentada pelo fato de termos tido que desmanchar duas réplicas do tratamento "escolha" em virtude da morte de quatro peixes já no segundo e terceiro dias. Juntos, esses dados mostram que a agressividade foi mais intensa no tratamento enriquecido com condições de escolha, resultando em danos mais sérios aos subordinados.

Embora tenhamos observado o macho de maior tamanho estabelecendo sua posição de dominante e seu território nos três tratamentos, é provável que o enriquecimento ambiental tenha valorizado o território a ser defendido pelo dominante,

aumentando assim sua motivação para defendê-lo. Esse aumento na motivação pode ocorrer em termos de aumento na agressividade (Elwood *et al*. 1998). Recentemente, Barreto *et al.* (2010) mostraram que o enriquecimento ambiental aumenta agressividade na tilápia-do-Nilo, uma predição coerente com a teoria dos jogos. Embora esses autores sustentem que esses dados contradizem a teoria de que o enriquecimento ambiental pode servir para finalidades de bem-estar, possivelmente a explicação seja mais complexa. Nossos dados de mortalidade indicam que a valorização do território tenha sido exacerbada na condição de escolha, que contava com refúgios verdadeiros e o substrato escolhido pelos adultos da espécie. Portanto, afirmamos que a maior mortalidade encontrada nas condições de escolha da tilápia pode refletir seu melhor ajuste devido aos recursos que constituíam essa condição. Dessa forma, sugerimos que as condições de escolha sejam percebidas pelos peixes como melhores, o que traz claras implicações para o bem-estar da espécie, não obstante as agressões naturais resultantes possam ser percebidas como piores do ponto de vista da produção animal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, as condições escolhidas pela tilápia-do-Nilo resultaram em menor crescimento de alevinos e maior mortalidade entre adultos. Entretanto, isso pode ser o ideal para a espécie se tomamos como base o argumento de que os peixes escolhem o que lhes confere maior conforto e, por consequência, as condições de escolha da tilápia lhe conferem melhor bem-estar. Sendo assim, os interesses do piscicultor podem estar desrespeitando a condição de bem-estar dos peixes, o que merece maior consideração.

REFERÊNCIAS

Alvarenga, C. M. D. & Volpato, G. L. (1995) Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile Tilapia. Physiology & Behavior, 57(1): 75-80.

Alves, R. (1981) "Filosofia da Ciência: introdução ao jogo e suas regras". Editora Brasiliense, 176p.

Barreto, R. E., Carvalho, G. G. A. & Volpato, G. L (2010) The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment. Zoology (*in press*).

Broom, D. M. (1991) Animal welfare: concepts and measurement. Journal of Animal Science, 69 (10), 4167-4175.

Camacho, R. D. (1999) Estresse e apetite na tilápia-do-Nilo. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 65p.

Corrêa, S. A., Fernandes, M. O., Iseki, K. K. & Negrão, J. A. (2003) Effect of the establishment of dominance relationships on cortisol and other metabolic parameters in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus).* Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36: 1725-1731.

Dawkins, M. S. (1983) Battery hens name their price: consumer demand theory and the measurement of ethological 'needs'. Animal Behaviour, 31: 1195-1205.

Dawkins, M. S. (2006) Through animal eyes: what behaviour tells us. Applied Animal Behaviour Science, 100, 4-10

Dawkins, M. S. (2008) The science of animal suffering. Ethology, 114, 937-945.

Delicio, H. C., Barreto, R. E., Normandes, E. B., Luchiari, A. C. & Marcondes, A. L. (2006) A place preference test in the fish Nile tilapia. Journal of Experimental Animal Science, 43: 141-148.

Endo, M., Kumahara, C., Yoshida, T. & Tabata, M. (2002) Reduced stress and increased immune responses in Nile tilapia kept under self-feeding conditions. Fisheries Science, 68(2): 253-257.

Evans, J. C. (2009) The ethics of fish welfare. Journal of Fish Biology, 75: 2872-2874.

Fortes-Silva, R., Martínez, F. J., Villarroel, M. & Sánchez-Vázquez, F. J. (2010) Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus).*Comparative Biochemistry and Physiology A 156, 445–450.

Freitas, R. H. A. (2011) Avaliação do bem-estar da tilápia-do-Nilo a partir do esforço para obtenção de condições de preferência. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 97p.

Gonçalves-de-Freitas, E. (1999) Investimento reprodutivo e crescimento em machos de tilápia-do-Nilo. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 44p.

Gonçalves-de-Freitas, E. & Nishida, S. M. (1998) Sneaking behavior of the Nile tilapia. Boletim Técnico CEPTA, Pirassununga, 11(1), 71-79.

Goodman, L. A. (1964) Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Annals of Mathematical Statistics, Hayward, 35, 716-725.

Gozlan, R. E., Flower, C. J. & Pinder, A. C. (2003) Reproductive success in male sunbleak, a recent invasive fish species in the U.K. Journal of Fish Biology, 63 (A), 131–143.

Huntingford, F. A. (2009). Taking account of fish welfare: lessons from aquaculture. Journal of Fish Biology, 75: 2862-2867.

Kadry, V. O & Barreto, R. E. (2010) Environmental enrichment reduces aggression of pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, during resident-intruder interactions. Neotropical Ichthyology, 8(2): 329-332.

Kearney, M.; Jeffs, A. & Lee, P. (2008) Effects of salinity and temperature on the growth and survival of New Zealand shortfin, *Anguilla australis*, and longfin, *A. dieffenbachii*, glass eels. Aquaculture Research, 39, 1769-1777.

Lee, C. E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. Trends in Ecology & Evolution, 17(8): 386-391.

Maia, C. M. & Volpato, G. L. (2010) Escolhas ou preferências? Uma abordagem para o bem-estar animal. Anais do XXVIII Encontro Anual de Etologia e Simpósio Latinoamericano de Etologia. Alfenas.

Medeiros, A. P. T., Chellappa, S. & Yamamoto, M. E. (2007) Agonistic and reproductive behaviors in males of red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) x *O. mossambicus* (Peters, 1852) (Osteichthyes: Cichlidae). Brazilian Journal of Biology, 67(4): 701-706.

Mendonça, F. Z. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2008) Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). Revista Brasileira de Zoologia, 25(3), 413-418.

Moberg, G. P. (1999) When does stress become distress? Laboratory Animal, 28, 22-26.

Morrison, R. S., Johnston, L. J. & Hilbrands, A. M (2007). The behaviour, welfare, growth performance and meat quality of pigs housed in a deep-litter, large group housing system compared to a conventional confinement system. Applied Animal Behaviour Science, 103: 12–24.

Nelson, R. J. (2006) Biology of Aggression. Oxford University Press, 512p.

Prayitno, D. S., Phillips, C. J. C. & Omed, H. (1997) The effects of color of lighting on the behavior and production of meat chickens. Poultry Science, 76(3): 452-457.

Rodrigues, V. C. S. (2011) Bem-estar em juvenis de tilápia-do-Nilo avaliado por testes de escolha. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Sanches, L. E. F. & Hayashi, C. (2001) Effect of feeding frequency on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas. Acta Scientiarum, 23(4), 871-876.

Siddiqui, A. Q., Howlader, M. S. & Adam, A. A. (1988) Effects of dietary protein levels on growth, feed conversion and protein utilization in fry and young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 70(1-2): 63-73.

Volpato, G. L. (2009) Challenges for assessing fish welfare. ILAR Journal, 50(4): 329-337.

Volpato, G. L.; Frioli, P. M. A. & Carrieri, M. P. (1989) Heterogeneous growth in fishes: some new data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the causal mechanisms. Boletim de Fisiologia Animal, 13, 7-22.

Volpato, G. L.; Giaquinto, P. C.; Fernandes-de-Castilho M.; Barreto, R. E. & Gonçalves-de-Freitas, E. (2009) Animal Welfare: from concepts to reality. Oecologia Brasiliensis, 13(1), 5-15.

Volpato, G. L.; Gonçalves-de-Freitas, E. & Castilho, M. F. (2007) Insight into the concept of fish welfare. Diseases of Aquatic Organisms, 75, 165-171.

Volpato, G. L.; Luchiari, A. C.; Duarte, C. R. A.; Barreto, R. E. & Ramanzini, G. C. (2003) Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilápia. Brazilian Journal of medical and Biological Research, 36, 1659-1663.