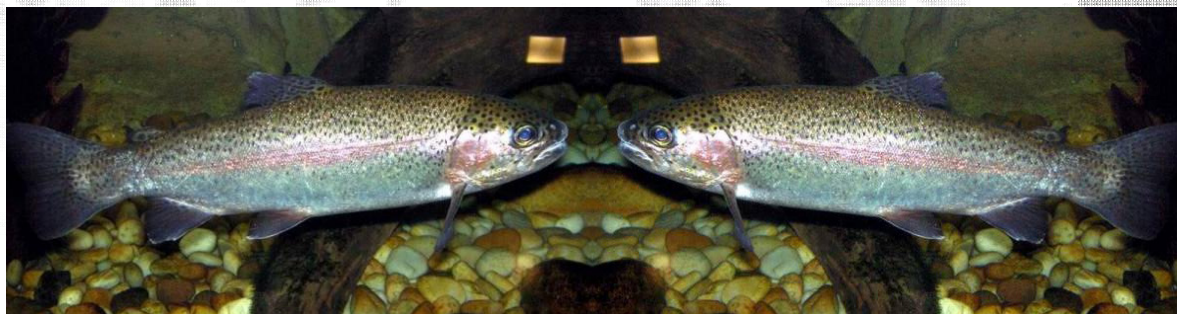


**Suplementação de L-carnitina na dieta de trutas arco-íris
(*Oncorhynchus-mykiss*):
Estudo comparativo entre indivíduos diplóides e triplóides**



CLAUDIA DE FÁTIMA ESCÓRCIO PEREIRA

Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar – Recursos Marinhos

2009

Área de especialização: **Aquacultura**

**Suplementação de L-carnitina na dieta de trutas arco-íris
(*Oncorhynchus-mykiss*):
Estudo comparativo entre indivíduos diplóides e triplóides**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar – Recursos Marinhos submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor José Fernando Magalhães Gonçalves

Categoria – Professor Auxiliar

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador – Doutor Rodrigo Otávio de Almeida Ozório

Categoria – Investigador Auxiliar

Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental.

**Suplementação de L-carnitina na dieta de trutas arco-íris (*Oncorhynchus-mykiss*):
Estudo comparativo entre indivíduos diplóides e triplóides**

**Porto
2009**

“A ciência nada mais é do que a busca para descobrir a unidade na variedade selvagem da natureza ou mais exactamente, na variedade da nossa experiência.”

J. Bronowski

AGRADECIMENTOS

O Mestrado é geralmente a formação académica que se segue após se ter realizado a Licenciatura. Realizá-lo sempre foi um objectivo e um desejo pessoal. Para que este trabalho fosse possível foi necessário a contribuição de várias pessoas e deste modo, não poderia deixar de as mencionar e de lhes prestar o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor José Fernando M. Gonçalves, meu orientador, por me ter aceite como sua aluna de Mestrado e por ter disponibilizado todos os meios necessários para a realização deste trabalho. Muito obrigada por me ter acolhido e orientado.

Ao Doutor Rodrigo O. A. Ozório, meu co-orientador, pela simpatia e paciência com que sempre tirou as minhas dúvidas e por ter partilhado o seu conhecimento, ajudando-me a progredir. Muito obrigada por tudo.

Ao Bruno e à Dra. Stela do Laboratório de Engenharia Aquática do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), por me terem auxiliado durante o período experimental, desde a monitorização constante dos tanques até à alimentação dos peixes, colaboração nas diversas amostragens efectuadas e determinação da osmolalidade plasmática. Muito obrigada pela preciosa ajuda.

Às técnicas do Laboratório de Química do ICBAS, por me terem recebido tão bem e por terem disponibilizado todo o equipamento, material e reagentes para a determinação dos lípidos totais, para além, de me terem auxiliado na sua determinação.

Ao Doutor Rui Bessa e à Dra. Susana Alves, do Laboratório de Metabolismo Lipídico da Unidade de Produção Animal, L-INIA do Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, por me terem acolhido com tanta simpatia, por me terem ensinado e ajudado a analisar os ácidos gordos e por disponibilizarem todos os meios para que isso fosse possível.

Ao Dr. Max Baumgartner da Empresa Lonza Ltd., na Suíça, por ter fornecido a carnitina para suplementar a dieta experimental e por ter analisado o teor de carnitina na dieta e nos tecidos.

Às minhas colegas e amigas (Begoña, Filipa, Inês, Joana, e Odete) do Laboratório de Ecofisiologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), na qual já fiz parte e onde determinei as análises de cortisol e amónia plasmática. Muito

obrigada meninas por todo o companheirismo, amizade, simpatia e por toda a ajuda prestada ao longo deste percurso.

Aos meus companheiros e amigos/as (Ana, Cláudia, Joana, Margarida, Pedro e Sílvia) do Laboratório de Nutrição, qualidade e crescimento do CIIMAR, do qual faço parte actualmente e onde determinei as restantes análises. Obrigada por me terem recebido com tanta simpatia e alegria e por todo o companheirismo. Além disso, queria agradecer-lhes pela ajuda incondicional que me prestaram, ao esclarecerem todas as minhas dúvidas e ao ensinarem-me muitas das técnicas necessárias para a realização deste trabalho. A todos vós um sincero obrigada, pois sem vocês tudo isto não seria possível.

Além disso queria agradecer a todos os Professores que de algum modo me instruíram e apoiaram, fazendo com que eu chegasse até aqui. E um particular obrigada ao Professor Doutor João Coimbra, por me ter aberto as portas do CIIMAR e impulsionado a frequentar o Mestrado.

A todos os meus colegas do mestrado e do CIIMAR e em particular às minhas amigas (Elisabete, Dora, Marisa, Renata, Teresa, Valentina e Vânia) que de uma forma ou de outra, sempre me acompanharam, ajudaram e acreditaram em mim. Muito obrigada pela vossa amizade, compreensão e dedicação.

Ao Carlos Garcia, o meu namorado, por ter estado sempre do meu lado mesmo nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pelo apoio, confiança, companheirismo, amizade e amor. Sem dúvida alguma, tornaste esta jornada muito mais objectiva e concretizável. Obrigada mais uma vez por estares presente em mais uma etapa da minha vida. És sem dúvida alguma, um pilar importante na minha vida.

Além disso, gostaria de agradecer à família Garcia por me ter também impulsionado a frequentar o Mestrado e pelo carinho com que sempre me recebeu.

Às minhas irmãs, Márcia e Paula, que sem dúvida alguma foram e serão sempre as minhas melhores amigas e conselheiras. Obrigada por todo o afecto, força e confiança depositada em mim. E também aos meus cunhados, Filipe e Marco, que de um modo ou de outro, contribuíram com a sua amizade.

Por fim, aos meus pais, Miguel e Alina, o maior e o mais importante de todos os agradecimentos, pois sem vocês este objectivo pessoal não seria concretizável. Muito obrigada por tudo.

RESUMO

A produção de triploides é um método económico e eficaz utilizado para a obtenção em grande escala de peixes estéreis. No entanto, os juvenis triploides apresentam geralmente uma taxa de sobrevivência e de crescimento menor do que os indivíduos diplóides, para além de serem mais susceptíveis ao stress. Assim, para fazer frente a este problema testou-se o efeito da L-carnitina, um nutriente multi-fisiológico, no crescimento, eficiência alimentar e qualidade nutricional de juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) diplóides e triploides, sob condições de cultivo intensivo. Um ensaio de alimentação foi conduzido utilizando juvenis diplóides e triploides com cerca de 30g (3 tanques/tratamento, 34 peixes/tanque). Os peixes foram alimentados manualmente duas vezes por dia, com três dietas nutricionalmente idênticas (44% de proteína, 20% de gordura bruta e 20kJ/g de energia bruta), contendo 15, 200 ou 530mg de L-carnitina/kg de dieta. Ao longo do ensaio os peixes foram submetidos a uma densidade de cultivo de 50kg/m³. No final do ensaio, o desempenho do crescimento, a composição corporal e centesimal do músculo e fígado, a composição de ácidos gordos nos diferentes tecidos e os parâmetros plasmáticos foram determinados. Os resultados mostraram que tanto o crescimento como a sobrevivência, bem como a adaptação dos juvenis de trutas arco-íris, sob as condições experimentais, não foram afectados significativamente nem pela ploidia nem pela suplementação de L-carnitina na dieta. O índice de crescimento diário (2,52 a 2,65% dia⁻¹) não foi afectado estatisticamente pelo efeito da suplementação de L-carnitina dietética, mas verificou-se um aumento tendencial com o aumento da concentração de L-carnitina na dieta. Embora o coeficiente de retenção proteica não tenha sido afectado pelos diferentes tratamentos testados (36-41%), constatou-se que as trutas triploides apresentaram, em média, valores superiores aos indivíduos diplóides. Além disso, os factores em estudo não exerceram efeito na composição corporal bem como na composição centesimal do músculo e fígado, nomeadamente no que diz respeito ao teor lipídico. No entanto, a suplementação de L-carnitina na dieta influenciou a concentração de carnitina nos tecidos. Por fim, quanto ao perfil de ácidos gordos analisado nos diferentes tecidos, verificou-se que especificamente no músculo, a suplementação de L-carnitina dietética tendencialmente contribuiu para a redução de PUFA.

Concluiu-se que, as condições experimentais aplicadas não foram causadoras de stress e que os juvenis de trutas arco-íris triploides tiveram um crescimento semelhante aos diplóides. Assim a suplementação de L-carnitina na dieta não teve um efeito evidente na promoção do crescimento e não contribuiu para a redução da gordura corporal em ambas as estirpes.

ABSTRACT

The production of triploids is an economic and efficient method used to obtain large-scale sterile fish. However, triploid juveniles usually exhibit lower survival and growth rate than the diploid individuals, as well as being more susceptible to stress. Thus, to address this problem, the effect of L-carnitine, a multi-physiological nutrient, on growth, feed efficiency and nutritional quality of diploid and triploid juvenile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), was tested under conditions of intensive culture. A feeding trial was conducted using diploid and triploid juveniles with about 30g (3 tanks/treatment, 34 fish/tank). Fish were hand-fed twice a day, with three nutritionally identical diets (44% protein, 20% of crude fat and 20kJ/g of gross energy) containing 15, 200 or 530mg L-carnitine/kg of diet. Throughout the trial the fish were submitted to a density of 50kg/m³. In the end of the trial, growth performance, body composition and proximate composition of muscle and liver, the fatty acid composition in different tissues and blood parameters were determined. The results showed that growth, survival and the adjustment of juvenile rainbow trout under experimental conditions were not significantly affected by either the ploidy or by supplementation of L-carnitine in the diet. The daily growth rate (2.52 to 2.65% day⁻¹) was not statistically affected by the effect of supplementation of dietary L-carnitine, but there was a trend with increasing concentration of L-carnitine in the diet. Although the rate of protein retention was not affected by different treatments tested (36-41%), it was found that triploid trout have, on average, higher values than diploid individuals. Furthermore, there were no effects on body composition and proximate composition of muscle and liver, particularly with regard to lipid content. However, supplementation of L-carnitine in the diet influenced the concentration of carnitine in tissues. Finally, as the profile of fatty acids analyzed in different tissues, we found that specifically in the muscle, the supplementation of dietary L-carnitine tended contributed to the decrease of PUFA.

It was concluded that the experimental conditions applied were not the cause of stress and that the juvenile triploids rainbow trout had similar growth to diploid. Thus the supplementation of L-carnitine in the diet had no obvious effect in promoting growth and not contributed to the reduction of body fat in both strains.

RÉSUMÉ

La production de triploïdes est une méthode efficace et économique d'obtenir des poissons stériles en grandes quantités. Toutefois, les triploïdes jeunes ont souvent un taux de survie et une croissance plus faible que les individus diploïdes, tout en étant plus sensibles au stress. Pour essayer de résoudre ce problème, l'effet de la L-carnitine, un élément nutritif multi-physiologique, a été testé sur la croissance, sur l'efficacité alimentaire et sur la qualité nutritionnelle des jeunes truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) diploïdes et triploïdes, dans des conditions de culture intensive. Un essai alimentaire a été effectué en utilisant des jeunes diploïdes et triploïdes d'environ 30g (3 réservoirs/traitement, 34 poissons/réservoir). Les poissons ont été nourris manuellement, deux fois par jour avec trois régimes nutritionnellement identiques (44% de protéines, 20% de matières grasses brutes et 20kJ/g d'énergie brut) contenant 15, 200 ou 530mg L-carnitine/kg d'aliment. Tout au long du procès, les poissons ont été soumis à une densité de culture de 50kg/m³. Après l'essai, la performance de la croissance, les compositions corporel et immédiate du muscle et du foie, la composition en acides gras dans de différents tissus et les paramètres du sang ont été déterminés. Les résultats ont montré que, dans des conditions expérimentales, la ploïdie et la supplémentation de la L-carnitine dans l'alimentation n'ont pas affectées, de manière significative, la croissance, la survie et l'adaptation des jeunes truites arc-en-ciel. Le taux de croissance quotidien (2,52 à 2,65% jour⁻¹) n'a pas été statistiquement affecté par l'effet de la supplémentation alimentaire de la L-carnitine, mais il y a eu une tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration de la L-carnitine dans l'alimentation. Bien que le taux de rétention de protéines n'ait pas été affecté par les différents traitements testés (36-41%), il s'est constaté que les truites triploïdes ont présenté, en moyenne, des valeurs plus élevées que les individus diploïdes. Les facteurs en étude n'ont eu aucun effet sur la composition corporelle et immédiate de la composition des muscles et du foie, en particulier en ce qui concerne le contenu en lipides. Cependant, la supplémentation en L-carnitine dans l'alimentation a influencé la concentration de la carnitine dans les tissus. Finalement, relativement aux acides gras qui ont été étudiés dans les différents tissus, il s'est vérifié que, particulièrement dans le muscle, la supplémentation de L-carnitine alimentaire a permis de diminuer les PUFA.

Il s'est conclu que les conditions expérimentales appliquées n'ont pas été une cause de stress et que les jeunes truites arc-en-ciel triploïdes ont eu une croissance similaire aux diploïdes. Ainsi la supplémentation en L-carnitine dans l'alimentation non seulement n'a pas eu d'effet évident dans la promotion de la croissance comme elle n'a pas contribué non plus pour la réduction de la graisse du corps dans les deux souches.

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Résumé	V
Abreviaturas e Símbolos	VIII
Índice de Tabelas e Figuras	X
1. Introdução	1
1.1. Situação Global e Portuguesa da Aquicultura	1
1.2. Truta Arco-íris	2
1.2.1. Características Gerais	2
1.2.2. Histórico de Produção da Espécie	3
1.3. Indução de Triploidia para Controlar a Sexualidade em Aquicultura	4
1.3.1. Controlo Genético da Proporção de Sexos e da Maturação Sexual	4
1.3.2. Triploidia	5
1.3.2.1. Descrição Geral	5
1.3.2.2. Indução	6
1.3.2.3. Identificação	8
1.3.2.4. Efeitos sobre a sua Biologia e Crescimento	8
1.3.2.5. Doenças e Resistência ao Stress	11
1.4. Condições de Cultivo – Causadores de Stress	11
1.5. L-carnitina	13
1.5.1. Descoberta, Estrutura e Ciclo	14
1.5.2. Funções	15
1.5.3. Fontes de Carnitina e o seu Papel em Vertebrados Incluindo o Homem	16
1.5.4. Uso da L-carnitina em Aquicultura	17
1.5.5. Efeito da Carnitina no Crescimento e na Composição Corporal dos Peixes	18
2. Material e Métodos	22
2.1. Animais e Condições Experimentais	22
2.2. Dietas e Programa Alimentar	23
2.3. Procedimento Experimental e Recolha de Amostras	25
2.4. Análises Químicas	26
2.4.1. Análises da Composição Centesimal	26
2.4.2. Análises dos Lípidos Totais e Ácidos Gordos	26

	Índice
2.4.3. Análises Plasmáticas	27
2.4.3.1. Cortisol	28
2.4.3.2. Amónia	28
2.4.3.3. Osmolalidade	28
2.5. Análise Estatística	28
3. Resultados	30
3.1. Parâmetros Indicadores do Crescimento	30
3.2. Composição Centesimal	32
3.3. Análise da Composição de Ácidos Gordos	35
3.3.1. No Músculo	35
3.3.2. No Fígado	37
3.4. Análises Plasmáticas	39
3.4.1. Concentração de Cortisol	39
3.4.2. Concentração de Amónia	39
3.4.3. Osmolalidade	40
4. Discussão	41
4.1. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia no Crescimento	41
4.1.1. Efeito da L-carnitina	41
4.1.2. Efeito da Ploidia	43
4.2. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia na Composição Centesimal	45
4.2.1. Efeito da L-carnitina	45
4.2.2. Efeito da Ploidia	47
4.3. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia na Composição de Ácidos Gordos	49
4.3.1. Efeito da L-carnitina	49
4.3.2. Efeito da Ploidia	51
4.4. Efeito da L-carnitina e da Ploidia ao Nível do Stress	52
4.4.1. Efeito da L-carnitina	52
4.4.2. Efeito da Ploidia	54
5. Conclusões	56
6. Referências Bibliográficas	58
7. Anexos	81

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG	- Ácidos gordos
ATP	- Adenosina trifosfato
CA	- Consumo de alimento
CAT	- Catalase
CoA	- Coenzima A
CRP	- Coeficiente de retenção proteica
D	- Dia
DHA	- Ácido docosahexaenóico
DPA	- Ácido docosapentaenóico
DNA	- Ácido desoxirrinonucleico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	- Ácido eicosapentaenóico
EUA	- Estados Unidos da América
FAME	- Ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization</i>
FID	- Detector de ionização por chama
GLDH	- Glutamato desidrogenase
GP	- Ganho de peso
HDL	- Lipoproteínas de alta densidade
HPI	- Eixo hipotálamo-pituitária-interrenal
HUFA	- Ácidos gordos altamente insaturados
ICA	- Índice de conversão alimentar
ICD	- Índice de crescimento diário
IIV	- Índice de ingestão voluntário
LC	- L-carnitina
LDL	- Lipoproteínas de baixa densidade
M	- Mortalidade
MUFA	- Ácidos gordos monoinsaturados
N	- Noite
NADPH e NADP ⁺	- Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (reduzido e oxidado)
NH ₃	- Amónia
NS	- Diferenças não significativas
P	- Ploidia
PCA	- Ácido perclórico
PUFA	- Ácidos gordos polinsaturados

PVC - Policloreto de Vinilo

RBD - *Randomized Block Designs*

RIA - Radioimunoensaio

SFA - Ácidos gordos saturados

STD - Desvio padrão

UE - União Europeia

¹²⁵I - Isótopo 125 do Iodo

2n - Diplóide

3n - Triplóide

mOsm - Miliosmol

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Produção e utilização da aquicultura e pesca a nível mundial.	1
Tabela II: Ingredientes e composição química e de ácidos gordos das dietas experimentais.	24
Tabela III: Parâmetros indicadores de crescimento e utilização de alimento de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de L-carnitina, após 60 dias de experiência.	31
Tabela IV: Análise da composição corporal e centesimal dos diferentes tecidos (músculo e fígado), em % de matéria fresca, de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes níveis de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), no início e após 60 dias de experiência.	33
Tabela V: Perfil de ácidos gordos no músculo (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes níveis de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta) no final do ensaio.	36
Tabela VI: Perfil de ácidos gordos no fígado (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes níveis de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg dieta), no final do ensaio.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Produção global de Aquicultura de <i>Oncorhynchus mykiss</i> , desde 1950 (A) e Distribuição da produção de <i>O. mykiss</i> pelo mundo (B).	3
Figura 2: Esquema da obtenção de indivíduos triplóides mediante a aplicação de um choque físico (térmico ou hidrostático).	6
Figura 3: Diagrama do metabolismo da carnitina e da sua regulação em vertebrados.	15
Figura 4: Esquema do papel do sistema carnitina e transferência dos grupos acetil no metabolismo intermediário.	16
Figura 5: Laboratório de Engenharia Aquática e disposição dos tanques usados no ensaio.	22
Figura 6: Esquema da distribuição dos peixes pelos 6 grupos.	23
Figura 7: Esquema representativo das análises químicas.	25
Figura 8: Exemplo de um cromatograma.	27
Figura 9: Curvas de crescimento de trutas arco-íris diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas com diferentes dietas experimentais que diferem entre si na concentração de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta) ao longo de 60 dias de ensaio. Os valores do gráfico representam valores médios $\pm$ desvio padrão. Os desvios padrões estão ocultados pelos símbolos.	30
Figura 10: Valores médios $\pm$ desvio padrão (n=3) das concentrações de Carnitina Total (mg/kg) no músculo (A) e fígado (B) de trutas diplóides e triplóides alimentadas com diferentes níveis de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), no final do período experimental.	34
Figura 11: Níveis de cortisol no plasma (ng/ml) de <i>Oncorhynchus mykiss</i> diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas com diferentes dietas experimentais (15, 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta), após 60 dias de experiência. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão (n=3).	39

Figura 12: Concentração de amônia no plasma em $\mu\text{mol/l}$ (valores médios $\pm$ desvio padrão, $n=3$) de *Oncorhynchus mykiss* diplóides ($2n$) e triplóides ($3n$) alimentadas com três dietas experimentais que diferem entre si na concentração de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), durante 60 dias de ensaio. **40**

Figura 13: Níveis de osmolalidade no plasma (mOsm) de *Oncorhynchus mykiss* diplóides e triplóides alimentadas por diferentes dietas experimentais (15, 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta), após 60 dias de experiência. Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). **40**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação Global e Portuguesa da Aquicultura

A aquicultura é uma actividade que consiste na produção, no processamento e na comercialização de plantas e organismos aquáticos de água doce, salobra e salgada, com a finalidade de aumentar a quantidade de alimento disponível no mercado através do desenvolvimento de uma actividade sustentável, que minimize os impactos ambientais. É sabido que a quantidade de produtos obtidos pela actividade pesqueira tem vindo a estabilizar nos últimos anos, enquanto que a proveniente da aquicultura tem aumentado. Os recursos marinhos têm sido sobre-explorados e sujeitos à degradação do ambiente ao longo dos últimos 30 anos levando ao seu declínio. Dados da FAO (2008) confirmam que, a nível global, foi atingido o potencial máximo de captura marinha, sendo necessário repensar nas estratégias de captura de forma a permitir a reposição dos stocks cuja pesca se encontra no máximo sustentável, ou perto deste. Por outro lado, a produção aquícola tem vindo a crescer, quer em volume de produção, quer em relação à sua posição e importância na produção de alimento a nível mundial contribuindo significativamente com o fornecimento de peixe para consumo humano (Tabela I).

Tabela I: Produção e utilização da aquicultura e pesca a nível mundial (adaptado da FAO, 2008).

	2002	2003	2004	2005	2006
	<i>(Milhões de toneladas)</i>				
PRODUÇÃO					
Águas interiores					
Captura	8,7	9,0	8,9	9,7	10,1
Aquacultura	24,0	25,5	27,8	29,6	31,6
Total	32,7	34,4	36,7	39,3	41,7
Marinhas					
Captura	84,5	81,5	85,7	84,5	81,9
Aquacultura	16,4	17,2	18,1	18,9	20,1
Total	100,9	98,7	103,8	103,4	102,0
Captura Total	93,2	90,5	94,6	94,2	92,0
Aquacultura Total	40,4	42,7	45,9	48,5	51,7
Produção Total	133,6	133,2	140,5	142,7	143,6
UTILIZAÇÃO					
Consumo humano	100,7	103,4	104,5	107,1	110,4
Usos não alimentares	32,9	29,8	36,0	35,6	33,3
População (bilhões)	6,3	6,4	6,4	6,5	6,6
Consumo de peixe/per capita (kg)	16,0	16,3	16,2	16,4	16,7

A contribuição da aquicultura para o fornecimento global de peixes, crustáceos e moluscos teve um forte incremento nos últimos 50 anos, devido à inovação tecnológica e à aplicação dos conhecimentos e métodos científicos, como é caso da biotecnologia genética (Jurado, 1987; FAO, 2008). Em 1970 a aquicultura representava cerca de 3,9% da produção total, passando para 36,0% em 2006. Trata-se de um sector cujo crescimento tem sido superior a qualquer outro sector de produção animal, apresentando desde 1970, uma taxa média de 8,8%, enquanto que o sector pesqueiro apenas cresceu 1,2% e a produção animal terrestre 2,8%, durante o mesmo período (FAO, 2006).

Em Portugal, a aquicultura, só se desenvolveu a partir dos anos 80 do século passado, quando as políticas de desenvolvimento da União Europeia (UE) foram aplicadas (Bernardino, 2000). A actividade aquícola em Portugal baseia-se sobretudo no cultivo semi-intensivo de espécies marinhas de elevado valor comercial como o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e a dourada (*Sparus aurata*), e pelo rodovalho (*Psetta maxima*) em regime intensivo. Relativamente à produção de espécies de água doce, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é a mais cultivada, sendo precursora da evolução da produção de espécies piscícolas em cativeiro para um regime intensivo de monocultura.

1.2. Truta Arco-íris

1.2.1. Características Gerais

A truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Walbaum (1792), é uma espécie de água doce que pode atingir aproximadamente 120cm de comprimento e 25kg de peso e durar cerca de 11 anos (Fishbase, 2008). É um salmonídeo nativo da costa do Pacífico da América do Norte, cuja distribuição natural se estende do sul do Alasca até ao norte do México. Desde 1874 que esta espécie tem vindo a ser mundialmente distribuída, principalmente nas regiões mais frias, para fins de aquicultura e pesca recreativa (MacCrimmon, 1971; Behnke, 1992; Machado *et al.*, 2007; FAO, 2009). A truta arco-íris é uma espécie muito resistente e com elevada tolerância a regimes térmicos relativamente amplos (0-27°C) (FAO, 2009). A temperatura ideal para o crescimento da espécie situa-se entre os 15 e os 17°C, obtendo-se melhores índices reprodutivos em temperaturas próximas de 10°C (Igarashi, 2008). Em habitat natural atingem a maturidade sexual por volta do 2º ano de vida, desovando anualmente entre Novembro e Março, normalmente em locais sombreados e pouco profundos constituídos por fundos de calhau rolado. A fêmea coloca os ovos em depressões por ela construídas, sendo estes posteriormente fecundados e cobertos pelo macho. A taxa de sobrevivência nestas condições é geralmente baixa (Gonçalves, 1998). A truta arco-íris é considerada um peixe nobre, de sabor refinado e excelente qualidade nutricional pois, além de ser uma óptima fonte de

proteína de elevado valor biológico, vitaminas e sais minerais, possui ainda ómega 3: ácidos gordos responsáveis pela redução dos níveis de colesterol no sangue e controlo da pressão arterial, além disso, também combatem a osteoporose, melhoram as actividades cerebrais e evitam doenças auto-imunes. Devido a todas estas características, a truta arco-íris despertou um enorme interesse por parte dos produtores em realizar o seu cultivo comercial (Machado *et al.*, 2007).

1.2.2. Histórico de Produção da Espécie

A produção aquícola da truta arco-íris teve início na América do Norte e cresceu exponencialmente desde 1950, sobretudo na Europa e mais recentemente no Chile.

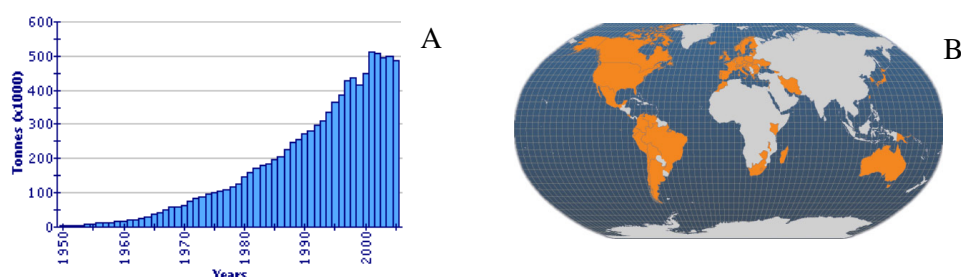


Figura 1: Produção global de Aquicultura de *Oncorhynchus mykiss*, desde 1950 (A) e Distribuição da produção de *O. mykiss* pelo mundo (B), (FAO Fishery Statistic (www.fao.org)).

Este crescimento na produção da espécie deve-se, principalmente, ao aumento da produção de água doce em instalações em terra, em países como a França, Itália, Dinamarca, Alemanha e Espanha que produzem especialmente para o mercado interno, e à expansão da cultura em água salgada em jangadas como na Noruega e no Chile (o maior produtor actual), que produzem para o mercado externo. Em 2002, a truta arco-íris, era produzida em 64 países, sendo a Europa o continente mais importante no que respeita ao volume de produção (FAO, 2009). Portugal contribui igualmente para a produção mundial desta espécie, embora com uma percentagem muito reduzida. É sabido que a produção de truta arco-íris só aumentou em Portugal a partir dos anos 80, tendo atingido um máximo de produção em 1990, constituindo cerca de 41% de um total de 4968 toneladas de todas as espécies produzidas em Portugal. No entanto, na última década do século passado a produção de truta arco-íris tem oscilado entre 900 e 1300 toneladas, representando em 2003 apenas 12% do total das espécies produzidas no nosso país. Este decréscimo deveu-se ao aumento do interesse do consumidor por espécies marinhas, como o pregado, a dourada e o robalo e à importação cada vez mais importante do salmão (FAO, 2006).

1.3. Indução de Triploidia para Controlar a Sexualidade em Aquicultura

1.3.1. Controlo Genético da Proporção de Sexos e da Maturação Sexual

A maturação sexual nos peixes é um dos processos biológicos que mais afecta a produtividade nos cultivos intensivos, uma vez que durante esse período a energia alimentar é canalizada para a maturação das gónadas e produção de gâmetas, resultando na diminuição do crescimento e da eficiência alimentar, na redução da qualidade do pescado, no aumento da susceptibilidade a doenças e no aumento da taxa de mortalidade (Aksnes *et al.*, 1986; Bye e Lincoln, 1986; Bromage *et al.*, 2001; Thorpe, 2004, Felip *et al.*, 2006).

No caso particular da truta arco-íris esses problemas acentuam-se nos machos, uma vez que uma considerável proporção destes se torna madura sexualmente ainda no primeiro ano de vida, ou seja, antes de alcançarem o tamanho comercial mínimo (cerca de 250g), enquanto que as fêmeas maturam somente aos dois anos de idade (Johnstone *et al.*, 1978). A exploração de trutas de tamanho comercial, direccionada para as indústrias de processamento, pesca desportiva e outras formas de consumo doméstico, requer um ciclo de produção que se estende além do período da primeira maturação. Assim, para suprir esse mercado de modo mais racional, tornou-se necessária a adopção de técnicas de controlo da sexualidade visando retardar, ou até mesmo suprimir, os efeitos colaterais associados à maturidade sexual (Tabata *et al.*, 1999).

O controlo da proporção de sexos em aquicultura pode conseguir-se mediante a aplicação de várias técnicas. As mais comuns são o controlo endócrino ou hormonal do sexo (Piferrer, 2001,2007) e a indução de ginogénese (indivíduos com cromossomas exclusivamente de origem materna) (Chourrout, 1982). O controlo da maturação sexual pode exercer-se mediante a manipulação das condições ambientais (Carrillo *et al.*, 2007) ou mediante a indução de triploidia (indivíduos com três conjuntos de cromossomas homólogos). O controlo da proporção de sexos e/ou da maturação sexual dependerá da relação custo/benefício num programa de produção concreto. Entre as técnicas referidas, aquelas que promovem a produção de stocks monossexo femininos através da inversão sexual (manipulação hormonal) e da indução de ginogénese (manipulação cromossómica), assim como a produção de stocks estéreis obtidos respectivamente por triploidia (manipulação cromossómica), têm sido consideradas as mais indicadas na melhoria da qualidade e do desempenho dos salmonídeos cultivados (Donaldson e Hunter, 1982; Dunham, 1990; Ihssen *et al.*, 1990). O uso de lotes monossexo femininos eliminaria as desvantagens apresentadas pela precocidade sexual dos machos, enquanto que a triploidia induzida iria suprimir a actividade reprodutiva, por serem estéreis (Piferrer e Donaldson, 1988). Deste modo, segundo Beardmore *et al.* (2001), as técnicas de

controle sexual trazem muitas vantagens, que viabilizam características morfológicas, fisiológicas ou comportamentais de interesse económico, tais como o aumento da taxa de crescimento, a supressão da reprodução, a contenção de gastos energéticos com a actividade reprodutiva, a uniformidade de tamanho na captura, a redução dos efeitos da maturidade sexual na aparência e na qualidade da carne e a diminuição dos riscos de impactos ambientais decorrentes da fuga de peixes para os sistemas naturais.

As principais biotecnologias genéticas actualmente aplicadas à piscicultura na produção de linhagens de peixes monosexuais, estéreis e com altos níveis de consanguinidade baseiam-se unicamente em métodos de manipulação hormonal e cromossómica, não tendo por isso nenhuma acção de mutações (Toledo-Filho *et al.*, 1996). No entanto, existem outras biotecnologias genéticas aplicadas à piscicultura. Como a utilização de marcadores moleculares (ao nível do DNA), utilizando a transferência de genes entre diferentes peixes e organismos, desenvolvidos principalmente por instituições de investigação assim como por grandes empresas aquícolas, devido ao seu grau de sofisticação técnica (Toledo-Filho *et al.*, 1996). A engenharia transgénica tem sido explorada pelo seu potencial em aumentar a eficiência e o rendimento de produção em aquicultura. Assim, várias espécies de peixes transgénicos, incluindo a truta arco-íris, o salmão do Atlântico (*Salmo solar*), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), o peixe-zebra (*Danio rerio*), a carpa comum (*Cyprinus carpio*), entre outras, estão já a ser testadas pela indústria aquícola e farmacêutica (Rasmussen e Morrissey, 2007).

1.3.2. Triploidia

1.3.2.1. Descrição Geral

A produção de triplóides é geralmente reconhecida como o método mais prático, económico e eficaz para a produção em grande escala de peixes estéreis, uma vez que a esterilidade protege o crescimento somático, a sobrevivência e a qualidade da carne dos efeitos negativos da maturação sexual (Maxime, 2008). Deste modo, a produção de triplóides constitui um excelente caminho para se produzir peixes maiores, cujo tamanho comercial ultrapasse a fase de maturação sexual, como é o exemplo da produção de truta arco-íris, e a utilização de peixes exóticos em programas de piscicultura, minimizando assim possíveis problemas adversos de impacto ambiental, como é o exemplo do uso de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) nos EUA (Toledo-Filho *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2000).

Dentro dos poliplóides, os triplóides são os mais comuns. A triploidia pode ocorrer espontaneamente nos peixes, tanto em espécies selvagens como cultivadas, devido a

uma falha ocasional na expulsão do segundo corpúsculo polar do ovo fertilizado, sendo contudo muito rara de acontecer (Thorgaard e Gall, 1979; Leggatt e Iwama, 2003). Swarup (1959a, b), foi o primeiro a criar com sucesso peixes triploides e a comparar o seu crescimento e maturação sexual com os seus controlos diplóides.

1.3.2.2. Indução

A indução de triploidia tem sido conseguida em muitas espécies de peixes pelo uso de métodos baseados na supressão da segunda divisão meiótica do ovo fertilizado. Deste modo, são aplicados indutores físicos ou químicos durante o desenvolvimento embrionário, resultando na retenção do segundo corpúsculo polar (Figura 2).

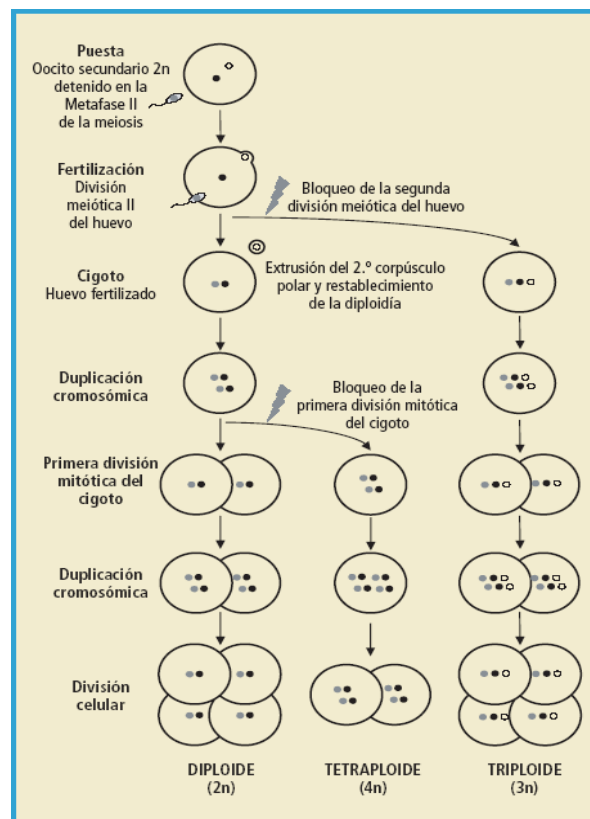


Figura 2: Esquema da obtenção de indivíduos triploides mediante a aplicação de um choque físico (térmico ou hidrostático). Os pontos negros e brancos representam, cada um deles, um conjunto de cromossomos de origem materna, enquanto os pontos cinzentos representam um conjunto de cromossomos de origem paterna. A inibição da expulsão do segundo corpúsculo polar dá origem a um indivíduo triploide. A inibição da primeira divisão mitótica do zigoto dá origem a um indivíduo tetraploide, (modificado de Benfey e Donaldson, 1987).

Entre os indutores físicos, um dos mais utilizados é o choque térmico (por frio ou calor), pelo baixo custo da sua aplicação e por ser facilmente adaptado à produção em massa de peixes cultivados. Geralmente utiliza-se o choque a frio em peixes de água quente (Thorgaard e a Gall, 1979) e o choque de calor em peixes de água fria (Varadaraj e Pandian, 1988). Este último exemplo é frequentemente utilizado na produção de tilápias triplóides (*Oreochromis mossambicus*). Um outro indutor físico aplicado em piscicultura é o choque de pressão (ou hiperbárico). O choque de pressão tem sido aplicado com sucesso na produção de triplóides de truta arco-íris (Lou e Purdom, 1984), peixe-zebra (Streisinger *et al.*, 1981), carpa comum (Linhart *et al.*, 1991), tilápia do Nilo (Hussain *et al.*, 1991), perca amarela (*Perca flavescens*) (Malison *et al.*, 1993) e em salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) (Piferrer *et al.*, 1994a). Contudo, e apesar dos excelentes resultados obtidos com este método, é aplicado em menor frequência do que os choques térmicos, uma vez que implica o uso de equipamento dispendioso. A eficácia do choque térmico ou hiperbárico depende do momento em que este é aplicado, da sua intensidade e da sua duração (Pandian e Koteeswaran, 1998). A sobrevivência dos ovos ou larvas assim como a percentagem de triplóides são ambas dependentes das características do choque. Relativamente às consequências fisiológicas, Peruzzi e Chatain (2000) consideram que os choques de pressão são menos prejudiciais do que os choques de temperatura. Embora a exposição dos oócitos a temperaturas sub ou supra-fisiológicas ou a pressões elevadas possam danificar o desenvolvimento embrionário subsequente dos peixes, assim como os seus processos fisiológicos, os danos causados pela indução de triploidia parecem ser muito limitados. Deste modo, as elevadas mortalidades ou mal formações anatómicas ao nível do esqueleto, observadas às vezes em peixes triplóides, podem ser associadas em parte ao trauma que sucede do tratamento impróprio dos ovos (Maxime, 2008).

Para bloquear também a expulsão do segundo corpúsculo polar em ovos fertilizados de peixes, são utilizados indutores químicos, tais como: citocalasina B (Refstie *et al.*, 1977; Allen e Stanley, 1979), colchicina (Smith e Lemoine, 1979), anestésicos (ex: óxido nítrico e freon) (Johnstone *et al.*, 1989) ou o tratamento com pH elevado e cálcio (Ueda *et al.*, 1988).

A triploidia pode ainda ser obtida mediante a fertilização de um ovo normal (2n) com o esperma de um indivíduo tetraplóide (4n) (Chourrout *et al.*, 1986) ou vice-versa (Arai *et al.*, 1993). Por sua vez, os tetraplóides podem ser produzidos mediante a inibição da primeira divisão mitótica por choque térmico ou hiperbárico, ocorrendo a duplicação do número de cromossomas do zigoto (Figura 2). Apesar dos tetraplóides poderem ser usados para a formação de indivíduos triplóides, a sua fertilidade é muito baixa,

provavelmente devido à presença de mosaicos e de outros factores (Arai, 2000), pelo que não são muito utilizados para produzir triplóides.

1.3.2.3. Identificação

Devido à percentagem cada vez mais elevada de triploidia e à dificuldade em diferenciar morfológicamente os indivíduos triplóides dos diplóides, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos citológicos, directos e indirectos, eficazes para a diferenciação destes indivíduos.

Os métodos directos incluem:

- Técnicas citogenéticas, baseadas na contagem do número de cromossomas (Harrel *et al.*, 1998). É um método altamente preciso para a identificação de triploidia em peixes (Thorgaard, 1983), contudo muito fastidioso e demorado e que requer geralmente o sacrifício dos animais (Harrel *et al.*, 1998);

- Técnicas fluorimétricas, como a citometria de fluxo (Thorgaard *et al.*, 1982), que permite a quantificação de DNA no núcleo dos eritrócitos. Este último método é considerado de momento o mais rápido e exacto para a determinação de ploidia nos peixes.

Os métodos indirectos abrangem:

- Medição do tamanho nuclear e celular, principalmente dos eritrócitos, devido ao aumento extra de DNA nos indivíduos triplóides, implicando um aumento de tamanho e volume das suas células. No caso particular dos eritrócitos, que são nucleados em peixes, a medição do tamanho do seu eixo maior é considerado um método simples para a identificação de peixes triplóides na maioria das aplicações (Benfey, 1999). De facto, a determinação do nível de ploidia através da medição da longitude do eixo maior dos eritrócitos é habitualmente descrita nas espécies onde se induziu triploidia (Benfey, 1999; Piferrer *et al.*, 2003; Luckenbach *et al.*, 2004), sendo considerado um método fiável e por isso dos mais usados;

- Contagem de nucléolos no núcleo dos eritrócitos (Cherfas e Ilyasova, 1980);

- Electroforese de proteínas, que permitem quantificar diferenças na dosagem relativa dos alelos entre diplóides e triplóides (Liu *et al.*, 1978).

1.3.2.4. Efeitos sobre a sua Biologia e Crescimento

Os animais aos quais se induz triploidia podem desenvolver-se e crescer de uma forma normal, o que significa que o processo de divisão celular por mitoses não será afectado pela nova condição. Segundo Toledo-Filho *et al.* (1996), os triplóides possuem nas suas células cerca de 33% mais de informação genética do que os diplóides, por

possuírem três conjuntos de cromossomas em vez de dois, o que pode induzir a pensar que os animais triploides possam crescer mais rapidamente do que os diplóides por possuírem mais genes e os seus núcleos e células serem maiores (Benfey, 1999; Maxime, 2008). Contudo, o facto dos triploides possuírem menor número de células por tecido ou órgão do que os diplóides (Suresh e Sheehan, 1998a; Benfey, 1999; Johnston *et al.*, 1999), faz com que eles se desenvolvam e cresçam de uma forma semelhante aos indivíduos diplóides (Maxime, 2008). Acresce que a meiose, exclusiva das células germinais, é interrompida devido à presença dos três cromossomas homólogos, pelo que os indivíduos aos quais se induziu triploidia são geneticamente estéreis. Todavia, os triploides apresentam aparentemente um sistema endócrino funcional, capaz de responder aos estímulos externos e hormonais (Benfey *et al.*, 1989). A meiose em fêmeas ocorre frequentemente no início do desenvolvimento, o que não se verifica em machos. No entanto, as fêmeas triploides apenas desenvolvem gónadas rudimentares, sem sinais de maturação e essencialmente desprovidas de ovos, ou com oócitos muito pouco desenvolvidos, em algumas espécies. Em qualquer dos casos, as fêmeas triploides são totalmente estéreis e não experimentam a maturação sexual (Carrasco *et al.* 1998; Benfey, 1999). Nos machos, todavia, a meiose não ocorre até ao início da puberdade, de modo que a gónada tem oportunidade de crescer por divisões mitóticas, logo os machos triploides são geralmente mais desenvolvidos sexualmente do que as fêmeas (Thorgaard, 1983). Algumas espécies de machos triploides são capazes inclusive de produzir pequenas quantidades de esperma aneuplóide que, no entanto, não é capaz de gerar descendentes viáveis (Toledo-Filho *et al.*, 1996). Assim, para se conseguir animais completamente estéreis faz-se a indução de triploidia juntamente com a produção de lotes formados exclusivamente por fêmeas (Lincoln e Scott, 1983; Piferrer *et al.*, 1994a).

A produção de triploides tem como principal objectivo a melhoria das taxas de crescimento destes animais, em consequência da sua esterilidade gonadal, o que é confirmado por um aumento de peso em comparação aos diplóides, por não gastarem energia na reprodução (Habicht *et al.*, 1994), embora esta generalização não seja aplicada a todas as espécies (Ihssen *et al.*, 1990; Benfey, 1999; Felip *et al.*, 2001a).

Estudos que avaliam a sobrevivência, o crescimento e a competência fisiológica dos peixes triploides e diplóides mostram que dentro de uma mesma espécie o desempenho comparativo entre triploides e diplóides é muito variável (Ihssen *et al.*, 1990; Galbreath *et al.*, 1994). O consenso geral é que a sobrevivência e o crescimento são consideravelmente mais baixos nos triploides em comparação aos diplóides, nos primeiros estágios de desenvolvimento (Thorgaard, 1986; Sutterlin *et al.*, 1987; Malison *et al.*, 1993; Withler *et al.*, 1995) e que os triploides parecem ser mais susceptíveis ao stress

(Benfey, 1999; Segato *et al.*, 2006). A taxa de mortalidade é geralmente maior em triploides do que em diplóides, tal como foi verificado em truta arco-íris (Myers e Hershberger, 1991; Blanc *et al.*, 1992; Ojolic *et al.*, 1995) e em salmão do Atlântico, especialmente durante o período após a transferência progressiva ou directa para a água salgada (Quillet e Gaignon, 1990; Galbreath e Thorgaard, 1995; McCarthy *et al.*, 1996). Adicionalmente, segundo Solar *et al.* (1984), a redução da sobrevivência dos peixes triploides deve-se ao grau de endogamia, resultante da retenção do segundo corpúsculo polar e/ou ao stress provocado pela intensidade do tratamento (temperatura e duração do choque) para induzir triploidia. No entanto, apesar dos animais triploides apresentarem uma mortalidade superior e um crescimento inferior aos diplóides durante as primeiras fases de desenvolvimento, ocorre uma inversão neste perfil nas fases posteriores (Chourrout *et al.*, 1986; Thorgaard, 1986), uma vez que os triploides são estéreis e assim não gastam energia na maturação das gónadas e com a reprodução (Habicht *et al.*, 1994), o que de acordo com Guo *et al.* (1990) compensaria as perdas iniciais. Esta generalização não se aplica a todas as espécies (Ihssen *et al.*, 1990; Benfey, 1999; Felip *et al.*, 2001a).

Assim, o crescimento dos triploides comparativamente com os seus parentes diplóides tem gerado uma certa controvérsia. A grande variabilidade encontrada deve-se sobretudo às estratégias reprodutivas específicas de cada espécie e às condições de cultivo experimentais utilizadas em cada caso (Guo *et al.*, 1990; Myers, 1991). Assim sendo, existem estudos comparativos do crescimento entre diplóides e triploides quando cultivados nos mesmos tanques e em tanques separados. Quando são produzidos em conjunto os triploides exibem geralmente desempenhos de crescimento inferiores comparativamente com os diplóides (Cassani e Caton, 1986; Benfey *et al.*, 1989; Quillet e Gaignon, 1990; Galbreath *et al.*, 1994; Galbreath e Thorgaard, 1995; McCarthy *et al.*, 1996; Bonnet *et al.*, 1999; Peruzzi *et al.*, 2004). A menor agressividade e capacidade competitiva dos indivíduos triploides são a principal causa para alguns investigadores (Boulanger, 1987; Carter *et al.*, 1994). Segundo Aliah *et al.* (1990), este comportamento pode dever-se a um número mais reduzido de células sensoriais, diminuindo a sensibilidade à luz e ao som, enquanto segundo Benfey (1999) pode dever-se a um número menor de hormonas nos triploides, conduzindo assim a uma menor resposta a estímulos ambientais. Contrariamente, estudos comparativos sobre a sobrevivência e crescimento de peixes diplóides e triploides conduziram à opinião comum de que, quando cultivados em tanques separados, nenhum destes parâmetros é afectado pela ploidia (Oliva-Teles e Kaushik, 1990a; Wolters *et al.*, 1991; Sugama *et al.*, 1992; Na-Nakorn e Lakhaanantakun, 1993; Mol *et al.*, 1994; O'Flynn *et al.*, 1997; Withler *et al.*, 1998; Lilyestrom *et al.*, 1999; O'Keefe e Benfey, 1999; Felip *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004).

1.3.2.5. Doenças e Resistência ao Stress

Apesar da grande semelhança morfológica entre triplóides e diplóides, os indivíduos triplóides estão frequentemente associados com o predomínio de mal formações anatómicas (Sutterlin *et al.*, 1987; Jungalwalla, 1991; McGeachy *et al.*, 1996; Sadler *et al.*, 2001; Oppedal *et al.*, 2003). Relativamente ao sistema imunitário, apesar de haver quem defenda que os triplóides são mais susceptíveis a doenças e ao stress, existem estudos que comprovam a mesma resistência a agentes infecciosos entre diplóides e triplóides (Bruno e Johnstone, 1990; Dorson *et al.*, 1991; Ojolick *et al.*, 1995; Yamamoto e Iida, 1995a), assim como a mesma sensibilidade às vacinas (Inada *et al.*, 1990; Kusuda *et al.*, 1991; Yamamoto e Iida, 1995a, b, c). No entanto, é importante referir que Yamamoto e Iida (1994) observaram que a truta arco-íris triplóide é mais vulnerável à infecção específica na brânquia pelo *Flavobacterium branchiophilum* do que a diplóide. Além disso, segundo Tiwary e Ray (2004), os triplóides parecem ter uma eficiência respiratória mais baixa do que os indivíduos diplóides.

De acordo com todas as investigações conduzidas em salmonídeos, a intensidade e o tempo de resposta fisiológica a um stress agudo (ex: confinamento) é semelhante em ambos os tipos de peixes (Biron e Benfey, 1994; Benfey e Biron, 2000; Sadler *et al.*, 2000a, b). Contudo, de acordo com Benfey (1999), Benfey e Biron (2000) e com as observações dos aquacultores, os peixes triplóides são incapazes de lidar bem com o stress crónico (ex: elevadas densidades de stock) e são especialmente afectados pela má qualidade da água, nomeadamente com baixos teores de oxigénio dissolvido.

1.4. Condições de Cultivo – Causadores de Stress

Os sistemas intensivos são fundamentais para o incremento da produção aquícola sendo o aumento da densidade de stock, o rigor na selecção de animais e a monitorização sanitária permanente características deste sistema (Lawson, 1995; Procarione *et al.*, 1999). Relativamente à densidade de stock, um factor chave na determinação da produtividade e rentabilidade das explorações piscícolas comerciais, a produção de truta arco-íris (baseada em códigos de boas práticas) varia de 2 a 80kg/m³, dependendo do tamanho dos peixes, do tipo de sistema de cultivo, da temperatura e fluxo de água, do oxigénio disponível, da fase no ciclo de produção e do tipo de peixe a produzir, de modo a minimizar o risco de má qualidade da água, danos físicos, stress e doenças (Ellis *et al.*, 2002; North *et al.*, 2006). Todavia, segundo Ellis *et al.* (2002) o intervalo normal aplicável à produção de truta arco-íris é entre 15-40kg/m³, sendo 60kg/m³ visto como o máximo recomendável. As diversas práticas de cultivo aplicadas, no entanto, podem ocasionar stress fisiológico, o que pode ter um efeito inibidor no

crescimento dos stocks, através da supressão do apetite (Schreck *et al.*, 1997; McCormick *et al.*, 1998) e através da inibição na secreção e na acção da GH (hormona de crescimento) e IGF-1 (insulina - como factor primário de crescimento) (Pickering, 1993; Pankhurst e Van Der Kraak, 1997; Dyer *et al.*, 2004). O stress pode ainda aumentar a mortalidade e a susceptibilidade a doenças na população em cultura (Wedemeyer, 1976; Refstie, 1977; Fagerlund *et al.*, 1981; Trzebiatowski *et al.*, 1981). Assim, os peixes precisam encontrar meios para lidar com estes desafios a fim de confrontá-los e de superá-los, para garantir a sua sobrevivência. Todas as mudanças fisiológicas desencadeadas quando o peixe reage a desafios químicos, físicos e biológicos e a tentativa de compensação são frequentemente referidas como resposta ao stress (Wedemeyer *et al.*, 1990).

Segundo Wendelaar Bonga (1997), o stress pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostasia, é perturbado ou ameaçado em consequência da acção de estímulos intrínsecos, denominados agentes de stress. Quando um animal é submetido a stress crónico e/ou agudo, a resposta fisiológica pode perder o seu valor adaptativo e tornar-se disfuncional, levando a mudanças de comportamento, redução do apetite e crescimento, diminuição geral da imunocompetência e mudanças reprodutivas, acarretando danos permanentes para a sua saúde e bem-estar (Carmichael, 1984; Børge *et al.*, 2006). O aspecto fulcral da adaptação ao stress é a mobilização de energia para longe de actividades que necessitem de muita energia, como o crescimento e a reprodução, mobilizando-a em direcção a actividades que permitem o restabelecimento da homeostasia, tais como a respiração, locomoção, balanço hidromineral e reparação de tecidos. Esta dinâmica pode reduzir consideravelmente a capacidade de desempenho de um peixe (Schreck, 1981; Schreck, 1990; Kebus *et al.*, 1992; Pankhurst e Kraak, 1997; Mommsen *et al.*, 1999).

Ao avaliar a resposta integrada ao stress em peixes, é comum fazer-se a distinção entre resposta primária, secundária e terciária (Pickering, 1981; Wedemeyer *et al.*, 1990; Pickering e Pottinger, 1995; Barton, 2002). A resposta primária corresponde à activação do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), resultando numa massiva libertação para a corrente sanguínea de hormonas corticosteróides. O principal corticosteróide em peixes teleósteos é o cortisol, cuja concentração no plasma é extensamente usada como um indicador geral de situações de stress (Kime, 1987; Pickering e Pottinger, 1989). A resposta secundária é usualmente definida como a canalização das acções e dos efeitos imediatos dessas hormonas a nível sanguíneo e dos tecidos, incluindo o aumento dos batimentos cardíacos e da absorção de oxigénio, a mobilização de substratos de energia e, ainda, a perturbação do balanço hidromineral. Por fim, a resposta terciária manifesta-se a nível da população traduzindo-se na inibição do crescimento, da reprodução e da

resposta imune. A limitação da capacidade do animal de tolerar agentes de stress subsequentes ou adicionais também é atribuída a uma manifestação da resposta terciária (Lima *et al.*, 2006).

Está bem documentado para o salmão do Atlântico (Refstie e Kittelsen, 1976), o salvelino-ártico (*Savelinus alpinus*) (Jorgensen *et al.*, 1993), o alabote (*Hippoglossus hippoglossus*) (Bjornsson, 1994), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Paspatis *et al.*, 2003) e o peixe-gato Africano (*Heterobranchus longifilis*) (Coulibaly *et al.*, 2007), que densidades de cultivo elevadas, considerada como um agente de stress crónico, geralmente têm efeitos nocivos no crescimento dos peixes e na sua eficiência alimentar, uma vez que originam uma competição intra-específica pelo alimento (Brett, 1979). Refira-se que, agentes de stress agudo como o manejo (ex: captura, calibragem, transporte, etc.) e alterações abióticas no meio (ex: aumento dos níveis de amónia e flutuações súbitas ou acentuadas de temperatura, pH, oxigénio e salinidade na água) são causadores de grandes distúrbios metabólicos nos peixes, acarretando danos ao nível do sistema fisiológico dos mesmos. Como já se referiu, tanto o stress crónico como o agudo podem aumentar a susceptibilidade dos peixes a doenças (Schreck, 1997; Wendelaar Bonga, 1997), sendo o principal factor responsável pela alteração no número e na composição de leucócitos em circulação (Barton e Iwama, 1991; Benfey e Biron, 2000). Além disso, o stress também afecta a actividade fagocítica do baço, bem como dos principais leucócitos do rim e do plasma (Thompson *et al.*, 1993; Pulsford *et al.*, 1994; Vazzana *et al.*, 2002; Liebert e Shreck, 2006).

Deste modo, para ultrapassar alguns dos potenciais problemas gerados pelos sistemas de cultivo intensivo, surge a possibilidade de se utilizar um aditivo não-poluente, bioactivo e multi-fisiológico, como a L-carnitina, que aumente a resistência dos peixes ao stress e promova o seu crescimento e qualidade.

1.5. L-carnitina

Durante as duas últimas décadas, os efeitos da suplementação de L-carnitina na nutrição e no cultivo de peixes foram estudados em diferentes espécies de peixes. Os resultados obtidos são controversos, pois enquanto alguns estudos mostram resultados positivos, outros não apresentam qualquer tipo de efeito da suplementação de L-carnitina. Assim, importa continuar a explorar a razão pelo qual a L-carnitina foi considerada uma substância interessante para ser utilizada em peixes.

1.5.1. Descoberta, Estrutura e Ciclo

O nome carnitina é derivado do Latim *caro* ou *canis* (carne) e foi descoberta em 1905 em extractos musculares (Gulewitsch e Krimberg, 1905), sendo mais tarde identificada a sua fórmula química $C_7H_{15}NO_3$ e em 1927 a sua estrutura, γ -trimetil- β -hidroxibutirato. A carnitina é uma pequena molécula (peso molecular, 161,20g/mol), que foi inicialmente denominada por vitamina B_T por actuar como vitamina na larva da farinha (*Tenebrio molitor*). Contudo, mais tarde o termo "vitamina" foi rejeitado por ser susceptível de causar confusão quando cientistas descobriram a sua presença em órgãos de mamíferos (ex: Homem) e de pequenos animais, assim como em inúmeros microorganismos e plantas (Rebouche e Seim, 1998; Harpaz, 2005). Sob determinadas circunstâncias, as necessidades em L-carnitina excedem a capacidade de um indivíduo para a sintetizar, fazendo dela um nutriente essencial (Harpaz, 2005). Quimicamente, a carnitina pode ser encontrada sob duas formas isoméricas: a D-carnitina e a L-carnitina mas, naturalmente, só é encontrada sob a forma de L-carnitina (Ozório, 2001).

Segundo Borum (1983), este nutriente orgânico é sintetizado a partir de dois aminoácidos essenciais (lisina e metionina), três vitaminas (C, B₆ e a niacina) e o ião ferro (Fe^{2+}). A carnitina, que é uma amina quaternária, está presente nos tecidos como carnitina-livre e em ésteres de acilcarnitina. A carnitina-livre nos vertebrados tanto deriva da biossíntese, ocorrendo primeiramente no fígado e só depois nos rins, como de fontes exógenas (alimentação) (Rebouche e Seim, 1998) (Figura 3). Após a sua síntese, a L-carnitina é transportada para outros tecidos. Os tecidos que usam os ácidos gordos como fonte primária dietética, como o músculo cardíaco e esquelético, possuem uma quantidade de L-carnitina superior (Fritz e Yue, 1963). Deste modo, a carnitina tem de ser transportada do fígado e rins para o músculo para ser usada na β -oxidação, convertendo-se carnitina-livre a ésteres de carnitina esterificados. Os ésteres de acilcarnitina são transportados dos tecidos periféricos para os rins onde a maioria da carnitina é reabsorvida e uma pequena parte é excretada através da urina. Além disso, a carnitina reabsorvida é transportada pelo sangue de volta para o fígado, e daí para outros tecidos. Grandes variações na concentração de carnitina são observadas entre os diferentes tecidos. Os músculos contêm 98% da quantidade total, enquanto que 1,5 e 0,5% da carnitina são encontrados no fígado e outros tecidos, respectivamente (Ozório *et al.*, 2002).

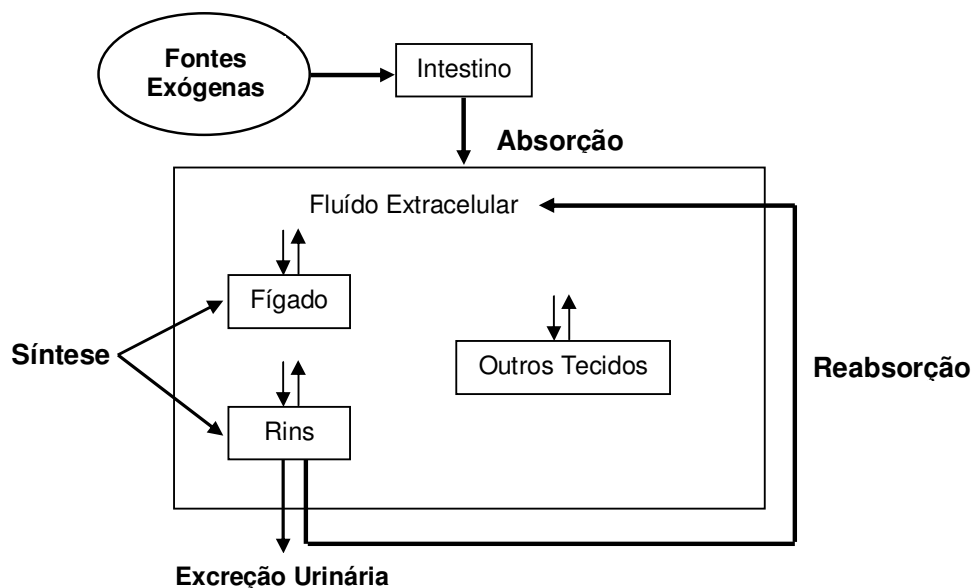


Figura 3: Diagrama do metabolismo da carnitina e da sua regulação em vertebrados (modificado de Rebouche e Seim, 1998).

1.5.2. Funções

A carnitina desempenha funções fisiológicas importantes, sendo a mais conhecida o facto de transportar os ácidos gordos de cadeias longas do compartimento citosólico para o interior da matriz mitocondrial sob a forma de acilcarnitina (Hathcock e Shao, 2006), para a oxidação e produção de energia ATP nos tecidos periféricos como o músculo (Gulçin, 2006) (Figura 4). A L-carnitina é ainda responsável por transportar os ésteres de acilcarnitina para o exterior da matriz mitocondrial, desempenhando assim uma função indispensável no metabolismo dos ácidos gordos. Algumas evidências sugerem que alguns ácidos gordos, como o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n -3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 n -3), parecem ser sintetizados nas mitocôndrias do fígado pela desnaturação dos ácidos gordos pelo que a carnitina é um co-factor essencial (Infante e Huszagh, 2000; Wynn e Ratledge, 2000).

De acordo com o exposto anteriormente, a carnitina também modula a rácio acetil coenzima A (CoA), actuando como um reservatório para as unidades de acetil activadas. A carnitina pode modular os efeitos tóxicos do grupo acil mal metabolizado de qualquer xenobiótico (ex: ácido piválico) ou resultantes do bloqueio de uma via metabólica normal (ex: ácido propiónico em acidemia propiónica), por transesterificação da CoA e posterior remoção dos ésteres de acilcarnitina. Adicionalmente, a carnitina está envolvida no transporte de ácidos orgânicos de cadeia curta e média activados de peroxissomas para mitocôndrias (Rebouche e Seim, 1998).

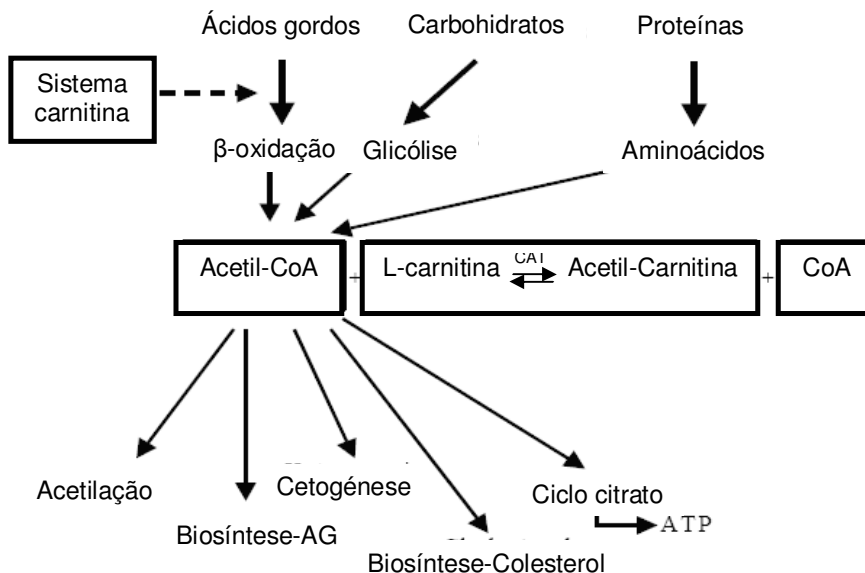


Figura 4: Esquema do papel do sistema carnitina e transferência dos grupos acetil no metabolismo intermediário (modificado de Rotzsch *et al.*, 1996).

1.5.3. Fontes de Carnitina e o seu Papel em Vertebrados Incluindo o Homem

As carnes vermelhas são a melhor fonte de carnitina, seguida pelos peixes, aves e derivados do leite. Em contrapartida, os vegetais, as frutas, os cereais e outros alimentos de origem vegetal possuem muito pouca carnitina (Harpaz, 2005). Durante as primeiras fases da vida, as crianças são particularmente susceptíveis à deficiência de carnitina, porque as exigências para o desenvolvimento dos tecidos associadas com o rápido crescimento excedem a capacidade do corpo para a sintetizar. No entanto, na infância, as concentrações de carnitina no plasma e em outros tecidos substancialmente inferiores não prejudicam o crescimento ou outros indicadores do desenvolvimento normal (Bremer, 1983; Lohninger *et al.*, 1987). Na deficiência de carnitina, a oxidação dos ácidos gordos é reduzida e os ácidos gordos são desviados para a síntese de triacilglicerol, particularmente no fígado. O menor desempenho mitocondrial ocorre na deficiência de carnitina quando existe uma disponibilidade insuficiente desta no tecido para tamponizar os metabolitos tóxicos de acil-coenzima. As quantidades tóxicas de acil-CoA prejudicam o ciclo citrato, a gliconeogénese e a oxidação dos ácidos gordos. Estes processos são reversíveis com a adição de quantidades suficientes de carnitina à dieta (McDowell, 1989).

O papel da carnitina nos vertebrados foi extensivamente estudado e a maioria dos estudos descreve o seu papel na oxidação dos ácidos gordos. Contudo, ela pode ter

também funções no metabolismo celular, como a reestruturação de ácidos gordos da membrana plasmática e a regulação de genes. No homem, os ésteres de carnitina (acetil- e propionil-carnitina) podem ter valor farmacológico, em virtude das suas propriedades antioxidantes em desordens crónicas, tais como disfunção miocárdica induzida por isquemia na angina do peito (Sinatra e Sinatra, 1999). A carnitina diminui as concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumenta a fracção de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue (Brouquist, 1994). A carnitina, devido ao seu papel na oxidação dos ácidos gordos, pode também diminuir a modulação da transcrição de enzimas do ciclo da ureia, pelos ácidos gordos de cadeia-longa, e aumentar a síntese de ureia no fígado (O'Connor *et al.*, 1984). Adicionalmente, a carnitina e acetil-carnitina realçam a função imune (Rebouche, 1998) e o éster acetil protege ainda as células nervosas do stress e deterioração (Crayhon, 1998). Para além das diversas funções da carnitina, mencionadas anteriormente, esta tem também funções nutracêuticas, uma vez que assegura protecção do organismo contra problemas sanitários, sendo exemplo disso o trabalho realizado por Ozório e seus colaboradores (trabalho ainda não publicado) em que a suplementação de L-carnitina na dieta teve um efeito protector nos peixes contra agentes de stress bióticos (ex: agentes bacterianos) e abióticos (ex: níveis elevados de amónia e de acetato de amónia) (Tremblay e Bradley, 1992).

1.5.4. Uso da L-carnitina em Aquicultura

Desde o fenómeno El Niño de 1998 que a disponibilidade da farinha de peixe tem vindo a diminuir, tornando-se preocupante, uma vez que é a principal fonte proteica nas dietas para aquicultura (Urbinati *et al.*, 2000). A instabilidade no fornecimento de farinha de peixe, resultando no aumento do seu custo, levou à procura de fontes alternativas que permitissem a substituição da fracção proteica, proveniente da farinha de peixe, por outras fontes alternativas (ex: de origem vegetal) ou mesmo a substituição de uma parcela da fracção proteica por uma fonte lipídica que passasse a ser incorporada pelo peixe. Relativamente à substituição da farinha de peixe por produtos vegetais, mesmo que feita parcialmente, sabe-se que pode às vezes ter impactos negativos na saúde e no desempenho do animal, já que interfere no fornecimento de alguns nutrientes essenciais. Segundo Ozório (2001), como as fontes vegetais apresentam em média 10 a 20 vezes menos carnitina do que as fontes animais, torna-se importante, por exemplo, a suplementação de carnitina nas formulações. Quanto à substituição parcial da fracção proteica por uma lipídica, testada principalmente na alimentação de muitos peixes carnívoros, constatou-se que alimentos ricos em energia estão a ser utilizados e o teor de gordura na dieta tem vindo a aumentar bastante, alcançando valores acima dos 35%.

Estes elevados níveis de gordura na dieta têm desencadeado interesse quanto à capacidade que os peixes têm para utilizarem um alimento rico em energia.

Carr e Chaney (1976) descobriram que os aminoácidos e as aminas quaternárias (como a carnitina, betaína e a colina) são estimulantes alimentares potentes para algumas espécies de peixes. A suplementação na dieta de carnitina, por exemplo, tem sido atribuída a um aumento do consumo (Twibell e Brown, 2000), a uma melhoria no crescimento e ao aumento do ganho de peso num grande número de espécies de peixes (Santulli e D'Amelio, 1986a; Torreele *et al.*, 1993; Chatzifotis *et al.*, 1995; Focken *et al.*, 1997), podendo também levar a uma diminuição no teor da gordura corporal, como descrito para o robalo (Santulli *et al.*, 1990) e para o peixe-gato Africano (Ozório *et al.*, 2001a, b). Estes benefícios são atribuídos a um aumento da oxidação lipídica, resultando numa melhor utilização da gordura como fonte de energia (Torreele *et al.*, 1993; Harpaz, 2005).

No entanto, existem outros benefícios relacionados com a suplementação de carnitina na dieta, como a protecção contra níveis tóxicos de amónia (Tremblay e Bradley, 1992), xenobióticos (Schreiber *et al.*, 1997; Arrigoni-Martelli e Caso, 2001) e agentes infecciosos (Juliet *et al.*, 2003 e Thangasamy *et al.*, 2007), possibilitando a redução e/ou a eliminação da utilização de antibióticos na aquicultura. Relativamente aos níveis tóxicos de amónia, agente de stress comum nas pisciculturas, foi demonstrado que a carnitina proporciona protecção aos peixes contra a toxicidade aguda desta substância (Harpaz, 2005). A carnitina pode ser fornecida aos animais de diferentes modos, directamente por injeção intravenosa (Deshmukh e Rusk, 1988; Tremblay e Bradley, 1992) ou através da dieta (Li *et al.*, 1992), sendo no primeiro caso mais eficaz, uma vez que a carnitina dilui o nível de amónia no sangue dos animais, evitando assim a sua toxicidade (Deshmukh e Rusk, 1988). Além disso, a carnitina, aumenta a resistência ao stress causado pelo manuseamento e por possíveis alterações abióticas no meio onde vivem, facilitando a aclimação dos peixes (Harpaz *et al.*, 1999; Harpaz, 2005). No entanto, a carnitina também pode modificar a estrutura/textura do músculo, relacionadas com os níveis elevados de natação, e melhorar a reprodução dos animais cultivados (Harpaz, 2005).

1.5.5. Efeito da Carnitina no Crescimento e na Composição Corporal dos Peixes

Como já foi referido, a capacidade de promover o crescimento pela suplementação de L-carnitina na dieta de peixes foi atribuída ao incremento na utilização de energia como resultado do aumento da oxidação dos ácidos gordos pela mitocôndria. É assim

esperado, de forma indirecta, que esta amina estimule a oxidação corporal de lípidos e por consequência previna o catabolismo de proteínas.

O efeito de promover o crescimento pela suplementação de L-carnitina foi encontrado nas seguintes espécies: robalo Europeu (Santulli e D'Amelio, 1986a, b); peixe-gato Africano (Torreele *et al.*, 1993); dourada Japonesa (*Pagrus major*) (Chatzifotis *et al.*, 1995, 1996); tilápia Moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) (Jayaprakas *et al.*, 1996); “rohu” (*Labeo rohita*) (Keshavanath e Renuka, 1998); tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) (Becker *et al.*, 1999); em híbridos de robalo-muge (*Morone saxatilis* male x *M. Chrysops* female) (Twibell e Brown, 2000) e em dourada negra (*Sparus macrocephalus*) (Ma *et al.*, 2008). Em contrapartida, a suplementação de L-carnitina não teve qualquer efeito no crescimento nos trabalhos realizados por: Rodehutschord (1995) e Chatzifotis *et al.* (1997) na truta arco-íris; Ji *et al.* (1996) no salmão do Atlântico; Harpaz *et al.* (1999) em ciclídeos ornamentais (*Pelvicachromis pulcher*); Gaylord e Gatlin (2000a, b) em híbridos de robalo-muge; Dias *et al.* (2001) no robalo Europeu; Ozório (2001) e Ozório *et al.* (2001a, b) no peixe-gato Africano; Dzikowski *et al.* (2001) em peixes guppys (*Poecilia reticulata*) e por Schlechtriem *et al.* (2004) na tilápia híbrida.

Os peixes necessitam de um nível muito elevado de proteína na sua dieta em comparação com a produção de outros animais, pelo facto de utilizarem parte dessa proteína para produzirem energia e não para crescimento (Wilson, 2002). Factores como o tamanho e a idade dos peixes, a composição da dieta, a taxa de alimentação, a presença de alimento natural, a temperatura da água e a densidade de stock podem influenciar a exigência proteica dos animais. A proteína é um dos principais nutrientes utilizados nas dietas para peixes, sendo o macro nutriente mais caro, devido à elevada quantidade em que é utilizado (Lazo *et al.*, 1998).

Inúmeros estudos com peixes carnívoros têm tentado substituir uma parcela da proteína por gordura (Hanley, 1991; Brecka *et al.*, 1996). Neste sentido, a carnitina surge como um nutriente promissor, uma vez que estimula a oxidação corporal de lípidos. Sabendo que a carnitina está associada ao metabolismo lipídico, muitos investigadores tentaram estabelecer correlações entre os níveis mais elevados de carnitina na dieta para peixes e o metabolismo lipídico (Santulli *et al.*, 1988; Kiessling e Kiessling, 1993; Burtle e Liu, 1994; Chatzifotis *et al.*, 1995; Froyland *et al.*, 1998). Pelo facto de aumentar a oxidação lipídica, a adição de carnitina permite que sejam utilizados altos níveis de gordura na dieta, pois reduz a acumulação de lípidos nos tecidos. Assim, os animais alimentados com maiores quantidades de carnitina, em dietas com um teor de gordura considerável, beneficiariam desta função e passariam a direccionar a energia proveniente da proteína para o crescimento. Alguns trabalhos realizados, por exemplo no robalo

Europeu (Santulli e D'Amelio, 1986a; Santulli *et al.*, 1988, 1990) e no peixe-gato Africano (Torreele *et al.*, 1993; Ozório *et al.*, 2001b), comprovaram o efeito benéfico da suplementação de L-carnitina na dieta, quer na estimulação do crescimento, quer na redução da gordura corporal.

Em contrapartida, existem experiências em que a suplementação de L-carnitina não reduziu o índice lipídico na composição corporal, como na truta arco-íris (Rodehutsord, 1995), nem no músculo e fígado, como demonstrado na dourada Japonesa (Chatzifotis *et al.*, 1995, 1996).

Devido a esta variabilidade de respostas sobre a alimentação com carnitina que é fornecida aos peixes, é difícil de explicar os mecanismos subjacentes pelos quais a suplementação de L-carnitina na dieta pode exercer possíveis efeitos benéficos em termos de desempenho do crescimento, deposição lipídica e sobrevivência (Dias *et al.*, 2001). Essas contradições podem ser atribuídas a uma interacção de factores, como a idade do animal, a composição da dieta (ex: teores de gordura, lisina e L-carnitina), as necessidades nutricionais da espécie em estudo e as condições ambientais ou de cultivo, muitas vezes causadoras de stress (Harpaz, 2005).

O custo-benefício é outra questão importante a ser considerada. Mesmo nos casos em que a L-carnitina demonstrou efeitos positivos, o nível requerido desta substância, que é muito onerosa, pode não justificar o crescimento adicional obtido. A utilização de concentrações intermediárias pode ser mais rentável do que os níveis de L-carnitina exigidos para uma taxa de crescimento máxima (Torreele *et al.*, 1993). A maioria dos estudos que exibem os efeitos positivos da suplementação de L-carnitina nas dietas de peixes mostram que os níveis de suplementação exigidos são muito elevados (usualmente mais de 150mg/kg) e, nesses níveis, a sua viabilidade económica deve ser cuidadosamente avaliada. Contudo, de acordo com Harpaz (2005), os aspectos ecológicos de uma melhor conversão alimentar devem também ser tomados em conta na presente avaliação.

A realização deste trabalho procura esclarecer o efeito da L-carnitina na condição fisiológica de trutas juvenis, diplóides e triplóides, produzidas em condições semelhantes às praticadas numa piscicultura. O cultivo de peixes triplóides é actualmente muito utilizado devido a todas as vantagens enumeradas, quer a nível de crescimento, quer em termos de qualidade da carne. Contudo, os juvenis triplóides apresentam geralmente uma taxa de sobrevivência e de crescimento menor do que os diplóides, sendo por isso mais susceptíveis ao stress. Deste modo, pelo facto de não existir nenhum estudo que relacione estes dois factores, L-carnitina e Ploidia, de modo a beneficiar o cultivo intensivo de peixes triplóides, surgiu a hipótese de realizar este trabalho. Assim o

principal objectivo deste estudo foi avaliar e comparar os efeitos da suplementação de L-carnitina dietética na sobrevivência, crescimento e metabolismo lipídico de juvenis de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) diplóides e triplóides cultivados em sistemas intensivos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e Condições Experimentais

Neste estudo foram utilizados dois lotes com a mesma origem de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), com cerca de 5 meses de idade (geração de Novembro de 2007), dos quais um dos lotes correspondia a trutas diplóides ($2n$) (só fêmeas, provenientes de progenitores manipulados hormonalmente), com cerca de $29,53 \pm 0,60$ g de peso médio inicial, enquanto que o outro lote correspondia a trutas triplóides ($3n$) (peixes estéreis, resultantes de manipulação cromossómica através de choques hiperbáricos), com cerca de $31,75 \pm 0,49$ g. Estes peixes foram adquiridos numa piscicultura (Truticultura do Minho) em Paredes de Coura, onde eram mantidos em condições de cultivo padronizados (Gonçalves, 1998) a uma densidade de 15 a 20kg/m³.

O ensaio experimental efectuado no âmbito deste trabalho decorreu no Laboratório de Engenharia Aquática do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS), da Universidade do Porto (Figura 5), de Abril a Junho de 2008. Inicialmente, os peixes foram acondicionados em 18 tanques rectangulares de fibra de vidro (90×47×50cm), abastecidos com água doce e mantidos por um período de aclimação de 1 semana, antes do início da experiência. Cada tanque estava provido de um arejador e coberto por uma placa PVC para impedir eventuais fugas dos peixes. O sistema de abastecimento de água consistia de um circuito fechado (TMC-5000) que integrava dois filtros biológicos, um filtro mecânico, um escumador, um sistema de esterilização ultravioleta e um refrigerador. O laboratório possuía ainda um sistema de ar condicionado, permitindo o controlo da temperatura ambiente.



Figura 5: Laboratório de Engenharia Aquática e disposição dos tanques usados no ensaio.

Com o início da experiência, 612 trutas arco-íris foram pesadas individualmente e distribuídas aleatoriamente (segundo o método *Randomized Block Designs (RBD)*) por 18 tanques, para constituir 6 grupos (3 tanques/grupo, 34 peixes/tanque), de acordo com a ploidia e a dieta fornecida (Figura 6).

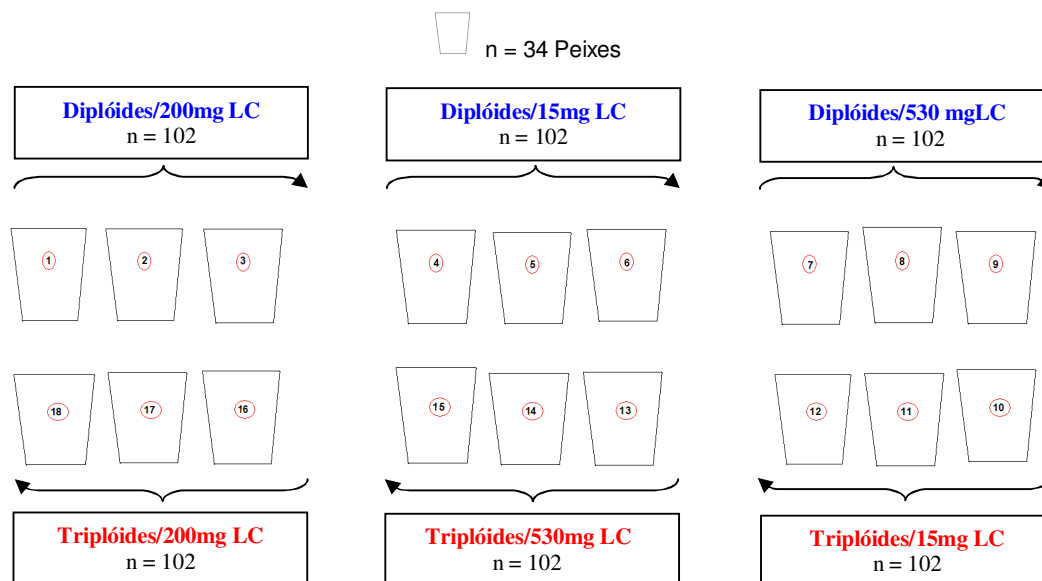


Figura 6: Esquema da distribuição dos peixes pelos 6 grupos.

Cada tanque continha cerca de 50L de água e uma rede divisória, que foi ajustada ao longo do ensaio para se obter uma densidade constante de 50kg/m³. Ao longo de toda a experiência os parâmetros físico-químicos da água foram monitorizados diariamente. Os valores médios obtidos foram de 16,9±0,5°C para a temperatura, 7,3±0,1 para o pH 8,0±0,4mg/L para o oxigênio dissolvido e as concentrações de amônia ionizada e de nitritos foram de 0,6±0,8mg/L e 1,2±0,5mg/L, respectivamente. A experiência decorreu com um fotoperíodo constante de 12h D/12h N com uma intensidade de luz de 200 LUX à superfície dos tanques.

2.2. Dietas e Programa Alimentar

Durante o ensaio, os peixes foram alimentados manualmente, duas vezes por dia (às 10:00h e 15:00h) a uma taxa de alimentação de 3% do peso corporal/dia, durante 56 dias, uma vez que durante os 60 dias em que a experiência decorreu todas as amostragens efectuadas foram precedidas em jejum. Foi fornecida uma das três dietas (consoante o tratamento) isoprotéicas (44%) e isoenergéticas (20kJ/g), contendo 15, 200 ou 530mg de L-carnitina/kg de dieta (Tabela II). A dieta que contém 200mg de L-carnitina

foi considerada como Controlo entre as dietas experimentais, pois é aquela que possui um nível de carnitina semelhante à dieta comercial e que foi fornecida às trutas antes da experiência. A L-carnitina utilizada na formulação da ração (Carniking) foi fornecida pela Empresa Lonza (Suíça).

Tabela II: Ingredientes e composição química e de ácidos gordos das dietas experimentais.

Dieta (mg L-carnitina/kg dieta)	LC-15	LC-200	LC-530
<i>Ingredientes (%)</i>			
Farinha de peixe (60%)	19,0	19,0	19,0
Farinha de soja (65%)	16,2	16,3	16,4
Bagaço de soja	14,8	14,7	14,5
Óleo de peixe	14,5	14,5	14,5
Glúten de milho	12,0	12,0	12,0
Glúten de trigo	10,0	10,0	10,0
Trigo	10,0	10,0	10,0
Lecitina	3,0	3,0	3,0
Pré-mistura vitamínica e mineral	0,47	0,50	0,50
Carniking	0,00	0,04	0,12
<i>Composição química</i>			
Matéria seca (%)	90,34	88,90	91,58
Cinzas (% MS)	6,23	5,83	6,20
Proteína bruta (% MS)	44,47	43,86	44,91
Gordura bruta (% MS)	21,03	19,96	21,32
Energia bruta (kJ/g MS)	19,87	19,86	19,85
Carnitina (mg/kg)	16,83	198,86	533,68
<i>Ácidos gordos (%)</i>			
14:0	5,02	5,07	5,05
16:0	16,34	16,33	16,11
18:0	3,78	3,78	3,73
16:1	4,55	4,71	4,52
18:1	13,89	13,93	13,68
20:1	7,49	7,05	7,53
22:1	9,59	9,00	9,71
18:2 n -6	11,32	10,91	11,26
20:2 n -6	0,22	0,21	0,20
20:4 n -6	0,58	0,65	0,60
18:3 n -3	1,73	1,70	1,73
18:4 n -3	2,39	2,42	2,46
20:5 n -3	8,24	8,62	8,38
22:5 n -3	1,04	1,09	1,06
22:6 n -3	9,37	9,76	9,82
¹ Σ Saturados	26,84	26,89	26,60
² Σ Monoinsaturados	36,47	35,49	36,37
³ Σ n -3 Polinsaturados	23,44	24,28	24,14
⁴ Σ n -6 Polinsaturados	12,62	12,29	12,57

¹Saturados: 14:0, i-C15:0, 15:0, 16:0, i-C18:0, 18:0, 20:0, 22:0.

²Monoinsaturados: 16:1 n -7, 17:1 n -8, 18:1 n -9, 18:1 n -7, 18:1, 20:1 n -11, 20:1 n -9, 20:1 n -7, 22:1 n -11, 22:1 n -9, 24:1 n -9.

³ n -3 Polinsaturados: 18:3 n -3, 18:4 n -3, 20:3 n -3, 20:4 n -3, 20:5 n -3, 22:5 n -3, 22:6 n -3.

⁴ n -6 Polinsaturados: 18:2 n -6, 18:3 n -6, 20:2 n -6, 20:4 n -6, 22:5 n -6.

2.3. Procedimento Experimental e Recolha de Amostras

Ao longo da experiência de aproximadamente 60 dias, os peixes foram sujeitos a determinadas condições, densidade de cultivo de 50kg/m³, mantida ao longo do ensaio, e captura, repetida uma vez por semana (com o auxílio de redes os peixes foram capturados e expostos ao ar durante 15 segundos), com o objectivo de simular as condições de trabalho numa piscicultura, aumentando eventualmente o stress, na expectativa de se poder potenciar o eventual efeito da L-carnitina.

No início do ensaio, os animais foram anestesiados por imersão em banho de éter monofenílico de etilenoglicol e pesados individualmente, sendo distribuídos pelos respectivos tanques. Dos dois lotes iniciais sacrificaram-se 36 peixes (amostragem inicial), 12 (6/2n e 6/3n) para carcaças e 24 (12/2n e 12/3n) para a recolha de músculo e fígado, para a determinação da composição centesimal e avaliação do perfil de ácidos gordos e carnitina. Destes 24 peixes também se extraiu sangue para análises plasmáticas de cortisol, amónia e osmolalidade (Figura 7). No decorrer da experiência, a cada 2 semanas, foram realizadas amostragens intermediárias, procedendo-se a pesagens de grupo para calcular a biomassa total em cada tanque e avaliar o crescimento e eficiência alimentar. Para a realização destas amostragens os peixes foram mantidos em jejum durante 24 horas. No fim da experiência procedeu-se à amostragem final, na qual foram pesados, medidos e sacrificados cerca de 72 trutas (12 peixes/grupo), para a recolha de músculo, fígado e sangue e mais 72 trutas para carcaças. Todas as amostras recolhidas foram identificadas e armazenadas a -20°C ou a -80°C, consoante o tipo de análise, até posterior processamento.

A experiência foi conduzida de acordo com a Directiva Europeia 86/609/UE, que protege os direitos dos animais usados em experiências ou outros fins científicos e acompanhada por um investigador-coordenador creditado pela Direcção-Geral de Veterinária do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas ao abrigo do ponto iii) da alínea e) do nº 3 da Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro.

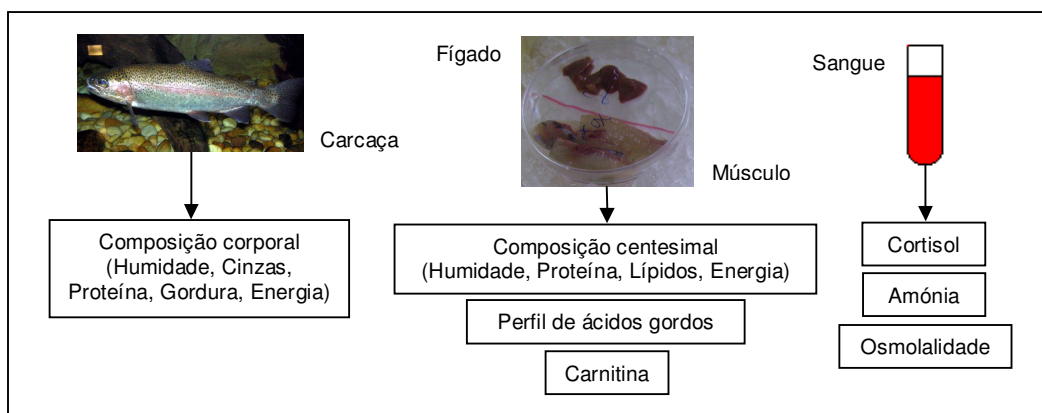


Figura 7: Esquema representativo das análises químicas.

2.4. Análises Químicas

2.4.1. Análises da Composição Centesimal

Na amostragem inicial foram homogeneizados conjuntamente seis peixes de cada lote para constituir duas amostras iniciais (1 amostra/ploidia), enquanto na amostragem final foram homogeneizados conjuntamente quatro peixes de cada tanque, para constituir 18 amostras finais (1 amostra/tanque). Apenas as amostras iniciais foram liofilizadas. As amostras de carcaça e de dieta foram então analisadas, em duplicado, quanto ao seu teor de humidade, matéria inorgânica, gordura bruta, proteína bruta e valor calórico.

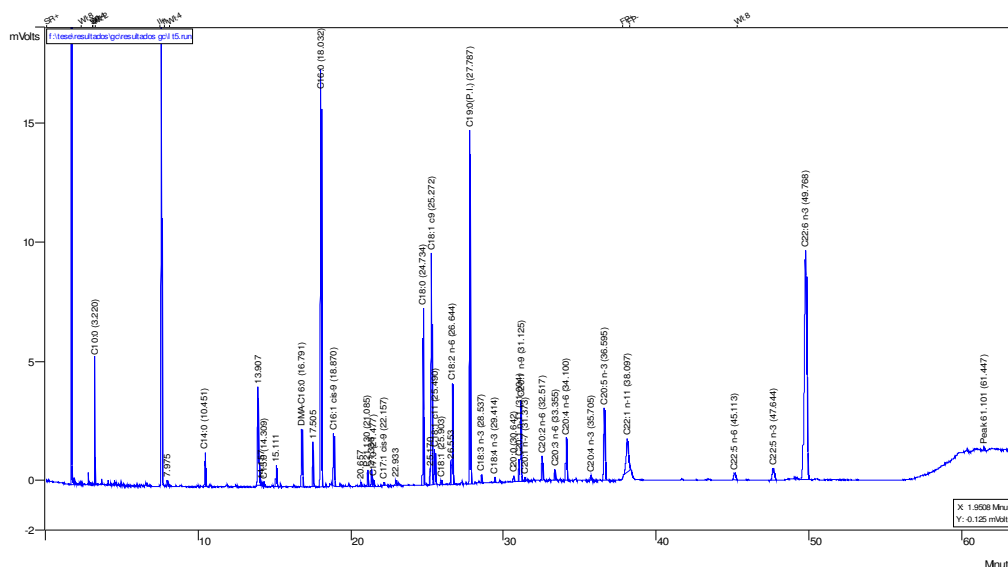
- *Matéria Seca*: determinada após secagem em estufa a 105°C, durante 24°C (Anexo I);
- *Cinzas*: obtidas após incineração em mufla, a 550°C, durante 5 horas (Anexo II);
- *Gordura Bruta*: por extracção de lípidos com éter de petróleo, durante cerca de 3 horas, segundo o método de Soxhlet, num aparelho de extracção automática “*Soxtherm Multista*” (Anexo III);
- *Proteína Bruta*: obtida por combustão completa da amostra num analisador de azoto, Leco FP-528 *Nitrogen/Protein*, na qual inicialmente se determina o teor de azoto existente na amostra e só depois o converte para proteína, multiplicando pelo factor 6,25 (Anexo IV);
- *Energia Bruta*: determinada por combustão completa da amostra numa bomba calorimétrica adiabática, IKA C2000 (Anexo V).

2.4.2. Análises dos Lípidos Totais e Ácidos Gordos

Para além da determinação do teor de humidade, proteína bruta e energia bruta em amostras de músculo e fígado, recolhidas nas amostragens inicial e final, também se determinaram os lípidos totais e o perfil de ácidos gordos. Estas análises também foram realizadas nas dietas utilizadas neste ensaio.

Os lípidos totais foram determinados segundo o método de Folch (Folch *et al.*, 1957), ligeiramente modificado. O método consiste na extracção dos lípidos totais pelo uso de solventes orgânicos (Anexo VI). Após a extracção dos lípidos, prepararam-se os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), por metilação combinada (Raes *et al.*, 2001) (Anexo VII). Os FAME foram analisados num cromatógrafo gasoso (*Varian CP 3800 – Walnut Creek*), equipado com um injector automático e um detector por ionização de chama (FID), mantidos a 250°C e a 220°C, respectivamente. A separação foi conseguida com

uma coluna capilar (*Omegawax 250*) de polietilenoglicol, com 30m×0,25mm×0,25µm, usando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,3mL/min. A temperatura do forno foi de 150°C durante 11min, aumentada 3°C/min até 210°C, mantendo-se nesta temperatura durante 25min. Finalmente, a temperatura subiu até aos 240°C a 10°C/min, mantendo-se durante 10min. O “*split ratio*” foi de 1:200 nas amostras de músculo, e de 1:70 nas amostras de fígado e dietas. A quantificação dos ácidos gordos foi feita usando a área do padrão interno C19:0 e as percentagens das áreas dos picos, apresentadas em cromatogramas (Figura 8), foram obtidas recorrendo à utilização do programa “*Interactive Graphics*” e os valores expressos em % normalizada.



2.4.3.1. Cortisol

Os níveis plasmáticos de cortisol foram determinados por RIA, utilizando meios de diagnóstico comerciais Coat-A-Count Cortisol (^{125}I) (*Diagnostic Products Corporation*), que consiste num radioimunoensaio concebido para medir quantitativamente o cortisol no plasma, sendo utilizado como meio de diagnóstico supra-renal e como um indicador de stress nos animais. A quantidade de hormona ligada foi determinada em contagens de 1 minuto num contador automático de raios γ (modelo 1275 MiniGamma – LKB) de acordo com a metodologia descrita no Anexo VIII.

2.4.3.2. Amónia

A concentração de amónia total no plasma foi determinada segundo o método descrito por Bergmeyer e Beutler (1983) mas modificado à posteriori (Anexo IX). Este método consiste na reacção enzimática da L-glutamato desidrogenase (GLDH), que cataliza a condensação de NH_3 e α -cetoglutarato a glutamato, com a concomitante oxidação do NADPH a NADP^+ . A medição dos níveis de amónia no plasma em teleósteos é utilizada como um indicador da condição nutricional do animal, bem como em testes de toxicidade à amónia e como meio de diagnóstico. A determinação da concentração plasmática de amónia foi realizada num leitor de Microplacas – Bio-Tek.

2.4.3.3. Osmolalidade

A osmolalidade no plasma foi medida usando um Micro-osmómetro automático (modelo 15 - Löser), a fim de determinar a pressão osmótica em solução (Anexo X). O princípio do método consiste na determinação do ponto de congelação de soluções aquosas. A descida do ponto de congelação em comparação com o da água pura é uma medida directa da concentração osmótica. A determinação da osmolalidade consiste em averiguar se os animais estão em equilíbrio homeostático.

2.5. Análise Estatística

Neste estudo, os dados obtidos e os gráficos foram processados no programa *Microsoft Office Excel 2003* e os resultados apresentados representam a média e o desvio padrão dos valores obtidos para cada um dos grupos estudados. O tratamento estatístico aplicado foi realizado no programa *Sigma Stat 3.1*.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) a dois factores (Ploidia e L-carnitina), “*Two Way ANOVA*”. Em todas as análises estatísticas realizadas os efeitos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Sempre que os testes revelaram significância ($p < 0,05$) as médias individuais foram comparadas através do teste de Tukey.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros Indicadores do Crescimento

Após 60 dias de experiência, verificou-se que o crescimento das trutas arco-íris não foi afectado significativamente ($p>0,05$) quer pela ploidia, quer pela suplementação de diferentes concentrações de L-carnitina na dieta, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na maioria dos parâmetros de crescimento analisados. As curvas de crescimento das trutas diplóides e triplóides dos diferentes tratamentos apresentaram uma evolução exponencial ao longo do tempo tendo-se mesmo constatado que as trutas triplicaram de peso no fim da experiência (Figura 9). Contudo, as diferenças de crescimento entre os diferentes tratamentos não foram significativas estatisticamente.

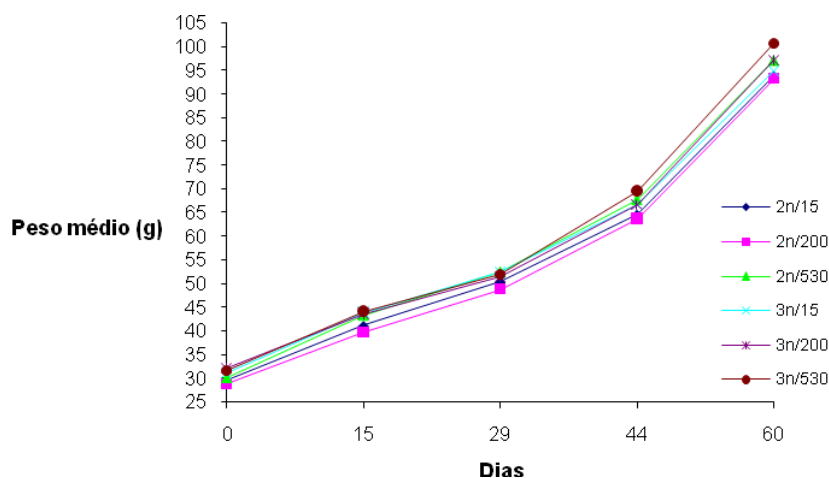


Figura 9: Curvas de crescimento de trutas arco-íris diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas com diferentes dietas experimentais que diferem entre si na concentração de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta) ao longo de 60 dias de ensaio. Os valores do gráfico representam valores médios $\pm$ desvio padrão. Os desvios padrões estão ocultos pelos símbolos.

Os diferentes parâmetros de crescimento analisados nos juvenis de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentados com as diferentes dietas experimentais (15, 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta), podem ser observados na Tabela III. Após os 60 dias de experiência (mas apenas 56 dias de alimentação), verificou-se que o índice de ingestão voluntário (IIV) foi o único parâmetro de crescimento afectado pela ploidia ($p<0,05$), tendo sido superior nas trutas diplóides (variando de $2,15\pm0,11$ a $2,20\pm0,00\%$). Enquanto que o único parâmetro de crescimento afectado pela suplementação de L-carnitina na dieta, foi o ganho de peso (GP), observando-se que, independentemente do tipo de ploidia, os animais alimentados com 530mg de L-carnitina/kg de dieta ganharam

mais peso (variando de 66,94±2,98 a 69,00±2,10g) do que os animais alimentados com 15mg de L-carnitina (variando de 63,61±1,76 a 64,41±0,62g).

Não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) para o consumo de alimento (CA), índice de conversão alimentar (ICA) e para o índice de crescimento diário (ICD), embora todos estes parâmetros tenham sido, em média, superiores nas trutas diplóides comparativamente com as triplóides. Relativamente ao ICD, que variou entre 2,52±0,06 e 2,65±0,12% dia⁻¹, apesar de não ter sido afectado estatisticamente pelo efeito da suplementação de L-carnitina dietética, verificou-se um aumento tendencial deste parâmetro de crescimento com o aumento da concentração de L-carnitina na dieta.

Embora o coeficiente de retenção proteica (CRP) não tenha sido afectado pelos diferentes tratamentos testados, constatou-se que as trutas triplóides apresentaram, em média, um CRP superior aos indivíduos diplóides.

Relativamente à mortalidade (M), também não foram observadas diferenças significativas quanto à ploidia nem quanto à suplementação de L-carnitina dietética. Contudo, verificou-se que as trutas diplóides apresentaram uma taxa de mortalidade inferior (entre 1 e 2%) comparativamente com os indivíduos triplóides (entre 2 e 7%).

Através da análise estatística, não se verificou qualquer interacção entre as diferentes dietas e a ploidia ($p>0,05$) em qualquer um dos parâmetros analisados.

Tabela III: Parâmetros indicadores de crescimento e utilização de alimento de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com dietas contendo diferentes teores de L-carnitina, após 60 dias de experiência.

	Diplóides			Triplóides			ANOVA		
	L-carnitina (mg/kg)			L-carnitina (mg/kg)			P	LC	P x LC
	LC-15	LC-200	LC-530	LC-15	LC-200	LC-530			
¹ GP (g)	64,41±0,62	64,37±3,82	66,94±2,98	63,61±1,76	65,07±2,26	69,00±2,10	NS	0,029	NS
² CA (g MS)	67,84±0,30	66,95±1,48	70,05±1,99	66,95±2,03	68,18±1,53	67,65±2,37	NS	NS	NS
³ ICD (% d ⁻¹)	2,60±0,02	2,62±0,13	2,65±0,12	2,52±0,06	2,53±0,08	2,65±0,04	NS	NS	NS
⁴ IIV (%)	2,17±0,04	2,20±0,00	2,15±0,11	2,10±0,04	2,12±0,06	1,99±0,02	0,004	NS	NS
⁵ ICA	1,05±0,01	1,04±0,04	1,05±0,07	1,05±0,03	1,05±0,06	0,98±0,01	NS	NS	NS
⁶ CRP (%)	38,03±1,98	36,57±1,53	36,41±3,16	36,82±1,69	38,25±0,61	40,98±1,81	NS	NS	NS
⁷ M (%)	2,00±3,46	1,50±2,12	1,00±1,73	2,00±1,73	7,00±7,55	4,00±1,73	NS	NS	NS

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Os valores a negrito indicam a existência de diferenças significativas relativamente aos factores em estudo ($p<0,05$) e NS indica as diferenças não significativas. (P: Ploidia, LC: L-carnitina, P x LC: Efeito de interacção).

¹GP: Ganho de Peso (g) = peso final–peso inicial

²CA: Consumo de alimento seco (g de Matéria Seca)

³ICD: Índice de Crescimento Diário (% d⁻¹) = 100×[(Peso médio final)^{1/3}–(Peso médio inicial)^{1/3}]/nº dias

⁴IIV: Índice de Ingestão Voluntário (%) = (Consumo de alimento/Peso médio corporal/nº dias)×100

⁵ICA: Índice de Conversão Alimentar = Consumo de alimento seco (g de Matéria Seca)/Ganho de peso (g)

⁶**CRP:** Coeficiente de Retenção Proteica (%) = $[(\text{Peso final} \times \text{Proteína corporal final (\%)}) - (\text{Peso inicial} \times \text{Proteína corporal inicial (\%)})] / \text{Proteína consumida (\% Matéria Seca)} \times 100$

⁷**M:** Mortalidade (%) = $(\text{N}^\circ \text{ mortos} / \text{N}^\circ \text{ inicial}) \times 100$

3.2. Composição Centesimal

Na Tabela IV são apresentados os valores médios da composição corporal e centesimal de diferentes tecidos de trutas arco-íris diplóides e triplóides no início e após conclusão da experiência.

Verificou-se que a composição corporal dos peixes se alterou durante o período experimental. Assim, à excepção da percentagem de humidade que diminuiu e da proteína que se manteve praticamente constante, houve um aumento no teor de cinzas, gordura e energia bruta, do início para o fim da experiência. No fim do período experimental, a composição corporal dos peixes não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre tratamentos, logo não foi afectada nem pela ploidia nem pela suplementação de L-carnitina na dieta.

Relativamente à composição centesimal do músculo e fígado das trutas diplóides e triplóides verificou-se que pouco alteraram durante o período experimental, ou seja, os vários parâmetros mantiveram-se relativamente constantes, à excepção do teor de lípidos que aumentou ao longo da experiência. Quanto à concentração final de carnitina, em ambos os tecidos, comparativamente com a concentração inicial, observou-se o seguinte: enquanto o valor de carnitina muscular inicial foi próximo do valor médio de carnitina muscular nos grupos alimentados com 15mg de L-carnitina/kg de dieta, o valor de carnitina hepática inicial foi próximo do valor médio de carnitina hepática no grupo de peixes triplóides alimentados com 200mg de L-carnitina/kg de dieta (Controlo).

Quanto à composição centesimal no músculo, no fim do ensaio, observou-se o efeito da ploidia ($p < 0,05$) sobre o teor de energia bruta, na qual a energia muscular presente nas trutas diplóides (variando entre $5,6 \pm 0,1$ a $5,8 \pm 0,3 \text{ kJ/g}$) foi superior à energia muscular das trutas triplóides (variando de $5,4 \pm 0,2$ a $5,5 \pm 0,2 \text{ kJ/g}$). Além disso, verificou-se que a suplementação de L-carnitina dietética, quer actuando isoladamente, quer em interacção com a ploidia, influenciou estatisticamente a concentração de carnitina no músculo das trutas, verificando-se uma relação directamente proporcional entre a concentração de carnitina muscular e a concentração de L-carnitina na dieta, ou seja, quanto maior a suplementação de L-carnitina dietética maior o conteúdo de carnitina presente no músculo dos peixes.

Relativamente à análise centesimal no fígado, no fim do ensaio, observou-se que a ploidia influenciou significativamente apenas a percentagem de humidade, sendo superior nas trutas triplóides (variando de $74,4 \pm 0,1$ a $74,6 \pm 0,1\%$) comparativamente com as

diplóides (72,8±0,7 a 73,8±0,8%), independentemente do tipo de dieta. Além disso, tal como no músculo, verificou-se uma relação directamente proporcional entre a concentração de L-carnitina na dieta e a concentração de carnitina presente no fígado dos peixes, tanto nos diplóides como nos triplóides.

Tabela IV: Análise da composição corporal e centesimal dos diferentes tecidos (músculo e fígado), em % de matéria fresca, de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes teores de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), no início e após 60 dias de experiência.

	Diplóides				Triplóides				ANOVA		
	L-carnitina (mg/kg)				L-carnitina (mg/kg)						
	Início	LC-15	LC-200	LC-530	Início	LC-15	LC-200	LC-530	P	LC	P×LC
Carcaça											
Humidade (%)	75,9	68,4±1,5	70,1±0,1	69,2±1,1	76,3	69,9±1,0	67,0±2,6	67,6±3,0	NS	NS	NS
Cinzas (%)	0,6	2,1±0,1	2,1±0,1	1,9±0,0	0,6	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	NS	NS	NS
Proteína (%)	15,4	16,9±0,5	16,2±0,1	16,4±0,2	15,3	16,4±0,4	16,6±0,4	17,0±0,6	NS	NS	NS
Gordura (%)	5,3	10,8±0,7	9,7±0,0	11,0±0,7	5,0	10,4±0,4	10,9±0,2	11,2±1,2	NS	NS	NS
Energia (kJ/g)	5,4	8,3±0,3	7,8±0,1	8,1±0,3	5,3	7,9±0,2	8,3±0,1	8,4±0,7	NS	NS	NS
Músculo											
Humidade (%)	77,4	75,9±0,6	75,8±0,1	76,2±0,5	76,4	76,4±0,8	76,6±0,6	76,7±0,5	NS	NS	NS
Proteína (%)	18,1	18,1±0,3	18,3±0,1	18,6±0,1	17,5	18,9±0,4	18,5±0,0	18,6±0,6	NS	NS	NS
Lípidos (%)	2,5	3,6±0,8	3,3±0,2	3,2±0,1	1,5	3,0±0,7	3,2±0,4	2,9±0,7	NS	NS	NS
Energia (kJ/g)	5,1	5,8±0,3	5,8±0,0	5,6±0,1	5,5	5,5±0,2	5,5±0,2	5,4±0,2	0,024	NS	NS
¹ Carnitina (mg/kg)	85,2	77,4±9,8	123,2±6,1	133,8±6,0	89,5	83,0±6,0	111,6±1,7	145,2±0,2	NS	<0,001	0,049
Fígado											
Humidade (%)	75,0	73,5±0,3	72,8±0,7	73,8±0,8	75,3	74,4±0,1	74,6±0,1	74,5±0,3	<0,001	NS	NS
Proteína (%)	15,4	15,6±0,4	15,8±1,3	15,4±0,2	15,0	15,9±0,5	15,8±0,6	16,6±0,4	NS	NS	NS
Lípidos (%)	3,7	5,3±0,2	5,3±0,1	5,3±0,6	3,8	4,8±0,3	5,3±0,2	4,8±0,1	NS	NS	NS
Energia (kJ/g)	6,6	6,6±0,2	6,3±0,1	6,0±0,2	5,7	6,1±0,5	6,7±0,5	6,2±0,0	NS	NS	NS
¹ Carnitina (mg/kg)	42,7	16,2±0,9	34,8±0,0	45,6±4,0	36,0	20,4±4,1	38,4±4,5	51,8±8,8	NS	<0,001	NS

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Os valores a negrito indicam a existência de diferenças significativas relativamente aos factores em estudo ($p<0,05$) e NS indica as diferenças não significativas. (P: Ploidia, LC: L-carnitina, P×LC: Efeito de interacção).

¹**Carnitina:** Carnitina total (mg/kg) = carnitina-livre + carnitina-esterificada

Ao analisar-se mais detalhadamente a concentração de carnitina-livre e de carnitina-esterificada no músculo (Figura 10 (A)) e no fígado (Figura 10 (B)) dos peixes, verificou-se igualmente a influência da suplementação de L-carnitina na dieta, existindo uma relação directa entre o nível de L-carnitina fornecida na dieta e a concentração de

carnitina-livre e esterificada presente nos tecidos analisados. Isto é, os peixes alimentados com uma dieta mais rica em L-carnitina possuíam mais carnitina-livre e esterificada nos seus tecidos. Além disso, é relevante referir que a carnitina-esterificada muscular também foi afectada pela ploidia, tendo sido superior nos peixes triplóides. Relativamente à forma como a carnitina se encontra nos tecidos, verificou-se que em ambos os tecidos analisados (músculo e fígado) a carnitina se encontrou, predominantemente, na forma livre.

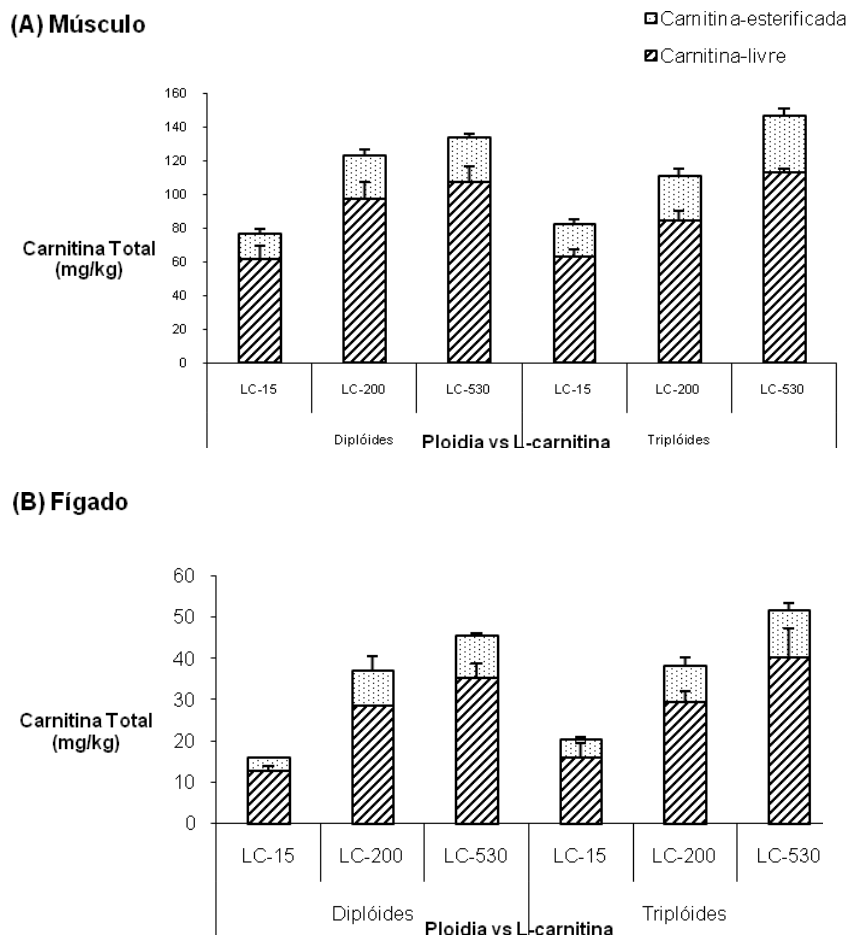


Figura 10: Valores médios $\pm$ desvio padrão ($n=3$) das concentrações de Carnitina total (mg/kg) no músculo **(A)** e fígado **(B)** de trutas diplóides e triplóides alimentadas com diferentes concentrações de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), no final do período experimental.

3.3. Análise da Composição de Ácidos Gordos

3.3.1. No Músculo

Na Tabela V apresenta-se o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do músculo (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes concentrações de L-carnitina no final de 60 dias de experiência.

O perfil de ácidos gordos no músculo traduziu, em termos gerais, o perfil de ácidos gordos das respectivas dietas. Os dois factores em estudo, ploidia e suplementação de L-carnitina na dieta, modificaram de forma significativa o perfil de alguns ácidos gordos após os 60 dias de ensaio experimental. Verificou-se que os ácidos gordos saturados (SFA) ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0) foram afectados apenas pela ploidia, sendo ambos estatisticamente inferiores no músculo das trutas triplóides (variando de $16,50 \pm 0,39$ a $16,89 \pm 0,16\%$ no 16:0 e de $3,78 \pm 0,07$ a $3,90 \pm 0,08\%$ no 18:0) comparativamente com as trutas diplóides (variando de $16,78 \pm 0,27$ a $17,13 \pm 0,21\%$ no 16:0 e de $3,93 \pm 0,06$ a $4,06 \pm 0,10\%$ no 18:0). Denote ainda que o 16:0 foi o ácido gordo com uma maior contribuição percentual no tecido muscular.

Os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), por sua vez, não foram influenciados nem pela ploidia nem pelos diferentes níveis de L-carnitina na dieta.

Nos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foi observado o efeito da ploidia e da suplementação de L-carnitina dietética, assim como o da interacção entre ambos os factores em estudo. Os PUFA ácido linoléico (18:2*n*-6) e ácido estearidónico (18:4*n*-3) foram apenas afectados pela suplementação de L-carnitina na dieta. Relativamente ao 18:2*n*-6 as diferenças estatísticas foram entre os grupos alimentados com a dieta contendo 200mg de L-carnitina (variando de $10,03 \pm 0,17$ a $10,14 \pm 0,05\%$) e a dieta contendo 530mg de L-carnitina (variando de $9,60 \pm 0,28$ a $9,84 \pm 0,19\%$). Enquanto que no 18:4*n*-3 as diferenças foram entre os grupos alimentados com a dieta de 15mg de L-carnitina (variando de $1,42 \pm 0,01$ a $1,42 \pm 0,06\%$) e a dieta de 530mg de L-carnitina (variando de $1,29 \pm 0,06$ a $1,34 \pm 0,05\%$), observando-se uma diminuição da percentagem deste ácido gordo com o aumento da concentração de L-carnitina na dieta. Os PUFA ácido linolénico (18:3*n*-3) e EPA (20:5*n*-3) foram afectados significativamente apenas pela ploidia, tendo sido os seus valores superiores no músculo das trutas triplóides (variando de $1,38 \pm 0,04$ a $1,39 \pm 0,02\%$ no 18:3*n*-3 e de $5,35 \pm 0,02$ a $5,68 \pm 0,33\%$ no EPA) comparativamente ao das trutas diplóides (variando de $1,34 \pm 0,03$ a $1,38 \pm 0,03\%$ no 18:3*n*-3 e de $5,05 \pm 0,08$ a $5,30 \pm 0,25\%$ no EPA).

Apenas se verificou a interacção entre os dois factores em estudo ($p < 0,05$) na percentagem do ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5*n*-3), observando-se que este ácido gordo polinsaturado foi estatisticamente inferior nas trutas triplóides ($1,72 \pm 0,01\%$),

comparativamente às diplóides ($1,82 \pm 0,03\%$), quando alimentadas com 530mg de L-carnitina/kg de dieta.

Por fim, no músculo, os somatórios dos principais grupos de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA) não foram afectados nem pela ploidia nem pela incorporação de L-carnitina na dieta ($p > 0,05$).

Tabela V: Perfil de ácidos gordos no músculo (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes concentrações de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg dieta) no final do ensaio.

Ácidos Gordos (%)	Diplóides			Triplóides			ANOVA		
	L-carnitina (mg/kg)			L-carnitina (mg/kg)					
	LC-15	LC-200	LC-530	LC-15	LC-200	LC-530	P	LC	P × LC
14:0	3,83±0,01	3,73±0,08	3,83±0,02	3,65±0,12	3,70±0,07	3,76±0,14	NS	NS	NS
16:0	16,78±0,27	17,10±0,03	17,13±0,21	16,50±0,39	16,65±0,10	16,89±0,16	0,016	NS	NS
18:0	3,98±0,13	3,93±0,06	4,06±0,10	3,90±0,08	3,78±0,08	3,78±0,07	<0,001	NS	NS
16:1	4,42±0,11	4,40±0,07	4,38±0,04	4,37±0,16	4,38±0,20	4,30±0,14	NS	NS	NS
18:1	16,32±0,05	16,25±0,15	16,20±0,05	16,07±0,47	16,12±0,57	15,98±0,36	NS	NS	NS
20:1	6,49±0,17	6,17±0,10	6,45±0,05	6,14±0,31	6,09±0,11	6,33±0,27	NS	NS	NS
22:1	6,50±0,12	6,46±0,05	6,48±0,14	6,18±0,49	6,26±0,26	6,33±0,38	NS	NS	NS
18:2n-6	9,95±0,20	10,14±0,05	9,60±0,28	9,91±0,06	10,03±0,17	9,84±0,19	NS	0,028	NS
20:2n-6	0,58±0,03	0,57±0,03	0,62±0,03	0,55±0,04	0,57±0,02	0,58±0,03	NS	NS	NS
20:4n-6	0,72±0,03	0,72±0,03	0,70±0,02	0,74±0,04	0,74±0,02	0,72±0,03	NS	NS	NS
18:3n-3	1,38±0,03	1,36±0,02	1,34±0,03	1,39±0,01	1,39±0,02	1,38±0,04	0,032	NS	NS
18:4n-3	1,42±0,01	1,34±0,00	1,29±0,06	1,42±0,06	1,37±0,03	1,34±0,05	NS	0,007	NS
20:5n-3	5,30±0,25	5,16±0,07	5,05±0,08	5,68±0,33	5,62±0,13	5,35±0,02	0,002	NS	NS
22:5n-3	1,78±0,01	1,85±0,04	1,82±0,03	1,85±0,11	1,83±0,03	1,72±0,01	NS	NS	0,041
22:6n-3	16,17±0,51	16,25±0,33	16,60±0,21	17,29±1,42	17,11±0,94	17,26±1,38	NS	NS	0,919
¹ Σ SFA	26,04±0,44	26,27±0,23	26,46±0,36	25,46±0,65	25,56±0,29	25,84±0,41	NS	NS	NS
² Σ MUFA	34,55±0,95	34,17±0,41	34,37±0,37	33,61±1,48	33,69±1,20	33,80±1,21	NS	NS	NS
³ Σ PUFA	39,17±1,18	39,33±0,63	38,95±0,82	40,73±2,20	40,56±1,41	40,13±1,87	NS	NS	NS
Σ n-3 PUFA	26,96±0,86	26,88±0,49	27,11±0,41	28,61±1,99	28,30±1,16	28,08±1,54	NS	NS	NS
Σ n-6 PUFA	12,22±0,32	12,45±0,14	11,85±0,40	12,12±0,21	12,27±0,24	12,06±0,33	NS	NS	NS
n-3/n-6	2,21±0,09	2,16±0,03	2,29±0,05	2,36±0,15	2,31±0,11	2,33±0,14	NS	NS	NS

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Os valores a negrito indicam a existência de diferenças significativas relativamente aos factores em estudo ($p < 0,05$) e NS indica as diferenças não significativas. (P: Ploidia, LC: L-carnitina, P×LC: Efeito de interacção).

¹Saturados: 14:0, i-C15:0, 15:0, 16:0, i-C17:0, a-C17:0, 17:0, i-C18:0, 18:0, 20:0, 22:0.

²Monoinsaturados: 16:1n-7, 17:1n-8, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:1, 20:1n-11, 20:1n-9, 20:1n-7, 22:1n-11, 22:1n-9, 24:1n-9.

³Polinsaturados: 18:2n-6, 18:3n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

3.3.2. No Fígado

Na Tabela VI apresenta-se o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do fígado (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes concentrações de L-carnitina ao fim de 60 dias de experiência.

A análise do perfil de ácidos gordos no fígado traduziu, em termos gerais, o perfil em ácidos gordos das respectivas dietas. Os dois factores em estudo, ploidia e suplementação de L-carnitina na dieta, alteraram significativamente o perfil de alguns ácidos gordos no final do período experimental. Verificou-se que as percentagens dos ácidos gordos saturados ácido mirístico (14:0) e ácido palmítico (16:0) no fígado foram ambas afectadas pela interacção entre os dois factores em estudo. Observando-se que ambos os ácidos gordos foram significativamente inferiores nas trutas triplóides, comparativamente com as diplóides, quando alimentadas com a dieta de 200mg de L-carnitina (no caso do 14:0) e com a dieta de 530mg de L-carnitina (no caso do 16:0). Além disso, constatou-se que a percentagem do 16:0 foi afectada também pela suplementação de L-carnitina na dieta (actuação individual do factor), observando-se que a quantidade de 16:0 no fígado foi superior nas trutas alimentadas com 15mg de L-carnitina (variando de $19,66 \pm 1,09$ a $22,92 \pm 2,60\%$) em comparação com as trutas alimentadas com 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta.

As percentagens dos MUFA ácido palmitoleico (16:1), ácido oleico (18:1) e ácido erucico (22:1) foram influenciadas unicamente pela ploidia, sendo todos eles estatisticamente inferiores no fígado das trutas triplóides (variando de $1,98 \pm 0,54$ a $2,37 \pm 0,15\%$ no 16:1, de $10,85 \pm 1,83$ a $12,10 \pm 0,40\%$ no 18:1 e de $1,03 \pm 0,49$ a $1,25 \pm 0,09\%$ no 22:1) em comparação com as diplóides (variando de $2,78 \pm 0,46$ a $3,91 \pm 0,13\%$ no 16:1, de $12,79 \pm 1,38$ a $15,27 \pm 0,30\%$ no 18:1 e de $1,35 \pm 0,35$ a $3,63 \pm 0,08\%$ no 22:1).

Observou-se o efeito da ploidia, da suplementação de L-carnitina na dieta assim como da interacção entre ambos, em alguns dos PUFA analisados no fígado. As percentagens hepáticas do 20:2*n*-6 e do ácido araquidónico (20:4*n*-6) apenas foram afectadas pela ploidia, sendo em média superior no fígado das trutas triplóides (variando de $1,37 \pm 0,22$ a $1,46 \pm 0,05\%$ no 20:2*n*-6 e de $2,44 \pm 0,09$ a $2,77 \pm 0,41\%$ no 20:4*n*-6) comparativamente com o fígado das trutas diplóides (variando de $1,05 \pm 0,03$ a $1,16 \pm 0,16\%$ no 20:2*n*-6 e de $1,97 \pm 0,11$ a $2,36 \pm 0,21\%$ no 20:4*n*-6). A percentagem hepática de DHA (22:6*n*-3), o principal componente de ácidos gordos dos lípidos totais hepáticos, foi afectada ($p < 0,05$) pela ploidia isoladamente, assim como pela interacção entre a ploidia e a suplementação de L-carnitina dietética. Tendo em consideração apenas a ploidia, verificou-se que a percentagem de DHA no fígado foi superior nos peixes triplóides (variando de $26,66 \pm 4,44$ a $35,63 \pm 3,81\%$) comparativamente aos diplóides (variando de $24,17 \pm 0,81$ a

28,72±1,39%). Na interacção dos dois factores, as diferenças significativas na percentagem de DHA hepática entre trutas diplóides e triplóides foram observadas quando se forneceu as dietas contendo 200 e 530mg de L-carnitina, tendo sido superior nas trutas triplóides. A percentagem hepática em DPA (22:5n-3) foi afectada apenas pelo efeito da suplementação de L-carnitina na dieta, observando-se que este ácido gordo foi significativamente superior nas trutas alimentadas com a dieta de 200mg de L-carnitina (variando de 1,45±0,03 a 1,50±0,12%) do que nas trutas alimentadas com 15mg de L-carnitina (variando de 1,15±0,13 a 1,37±0,06%).

Por fim, no fígado, os somatórios dos principais grupos de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA) não foram afectados significativamente nem pela ploidia nem pela incorporação de L-carnitina na dieta.

Tabela VI: Perfil de ácidos gordos no fígado (% de ácidos gordos totais) de trutas arco-íris diplóides e triplóides alimentadas com diferentes concentrações de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg dieta), no final do ensaio.

Ácidos Gordos (%)	Diplóides			Triplóides			ANOVA		
	L-carnitina (mg/kg)			L-carnitina (mg/kg)			P	LC	P × LC
	LC-15	LC-200	LC-530	LC-15	LC-200	LC-530			
14:0	1,69±0,15	2,07±0,35	1,74±0,22	2,01±0,10	1,61±0,15	1,60±0,14	NS	NS	0,015
16:0	19,66±1,09	19,65±0,92	20,26±0,37	21,44±0,59	18,24±0,78	17,86±0,49	NS	0,018	0,007
18:0	7,90±0,39	6,92±0,49	7,63±0,58	7,57±0,23	6,95±0,58	7,12±0,43	NS	NS	NS
16:1	2,78±0,46	3,91±0,13	3,17±0,72	2,37±0,15	2,11±0,22	1,98±0,54	<0,001	NS	NS
18:1	12,79±1,38	15,27±0,30	14,00±2,32	12,10±0,40	11,08±1,10	10,85±1,83	0,003	NS	NS
20:1	4,65±0,36	5,04±0,40	4,90±0,18	4,92±0,61	4,60±0,26	4,77±0,57	NS	NS	NS
22:1	3,21±1,69	3,63±0,08	1,35±0,35	1,25±0,09	1,06±0,06	1,03±0,49	0,001	NS	NS
18:2n-6	4,43±0,13	5,69±1,018	4,61±0,37	4,59±0,34	5,02±0,61	4,56±0,79	NS	NS	NS
20:2n-6	1,13±0,07	1,05±0,03	1,16±0,16	1,37±0,22	1,44±0,12	1,46±0,05	<0,001	NS	NS
20:4n-6	2,36±0,21	1,97±0,11	2,23±0,29	2,44±0,09	2,67±0,05	2,77±0,41	0,003	NS	NS
18:3n-3	0,35±0,01	0,52±0,18	0,36±0,04	0,37±0,04	0,40±0,05	0,40±0,09	NS	NS	NS
18:4n-3	0,22±0,02	0,39±0,24	0,23±0,04	0,26±0,06	0,23±0,03	0,25±0,07	NS	NS	NS
20:5n-3	4,65±0,24	4,34±0,28	4,39±0,27	4,29±0,65	4,78±0,09	4,84±0,14	NS	NS	NS
22:5n-3	1,37±0,06	1,45±0,03	1,39±0,02	1,15±0,13	1,50±0,12	1,29±0,12	NS	0,010	NS
22:6n-3	28,72±1,39	24,17±0,81	28,67±2,96	26,66±4,44	34,69±1,13	35,63±3,81	0,004	NS	0,011
¹ Σ SFA	30,03±1,72	29,40±1,81	30,34±1,22	34,03±3,90	27,65±1,60	27,40±1,12	NS	NS	NS
² Σ MUFA	23,64±3,96	28,03±0,91	23,58±3,60	20,80±1,30	19,01±1,69	18,77±3,46	NS	NS	NS
³ Σ PUFA	44,75±2,24	40,15±3,01	44,67±4,24	42,45±6,22	52,31±2,40	52,81±5,63	NS	NS	NS
Σ n-3 PUFA	35,59±1,75	31,24±1,60	35,36±3,35	32,97±5,34	41,92±1,47	42,71±4,30	NS	NS	NS
Σ n-6 PUFA	9,16±0,49	9,91±1,40	9,31±0,89	9,48±0,88	10,40±0,93	10,10±1,33	NS	NS	NS
n-3/n-6	3,89±0,15	3,39±0,00	3,80±0,28	3,47±0,47	4,05±0,33	4,24±0,48	NS	NS	NS

Valores médios ± desvio padrão (n=3). Os valores a negrito indicam a existência de diferenças significativas relativamente aos factores em estudo ($p<0,05$) e NS indica as diferenças não significativas. (P: Ploidia, LC: L-carnitina, P×LC: Efeito de interacção).

¹ Saturados: 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0.

² Monoinsaturados: 16:1n-7, 17:1n-8, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-11, 20:1n-9, 20:1n-7, 22:1n-11.

³ Polinsaturados: 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-6, 22:5n-3, 22:6n-3.

3.4. Análises Plasmáticas

3.4.1. Concentração de Cortisol

Relativamente à análise de cortisol plasmático dos peixes analisados, verificou-se um ligeiro aumento nos níveis de cortisol do início ($4,8 \pm 1,6 \text{ ng/mL}$ em diplóides e $6,5 \pm 0,4 \text{ ng/mL}$ em triplóides) para o fim do período experimental (variando de $5,1 \pm 0,6$ a $7,4 \pm 2,3 \text{ ng/mL}$ em diplóides e de $6,6 \pm 0,9$ a $7,8 \pm 3,3 \text{ ng/mL}$ em triplóides), contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Após os 60 dias de experiência, não se observaram diferenças significativas nos níveis de cortisol entre os diferentes tratamentos (Figura 11), ou seja, a concentração de cortisol plasmático não foi afectada nem pela ploidia nem pela suplementação de L-carnitina na dieta.

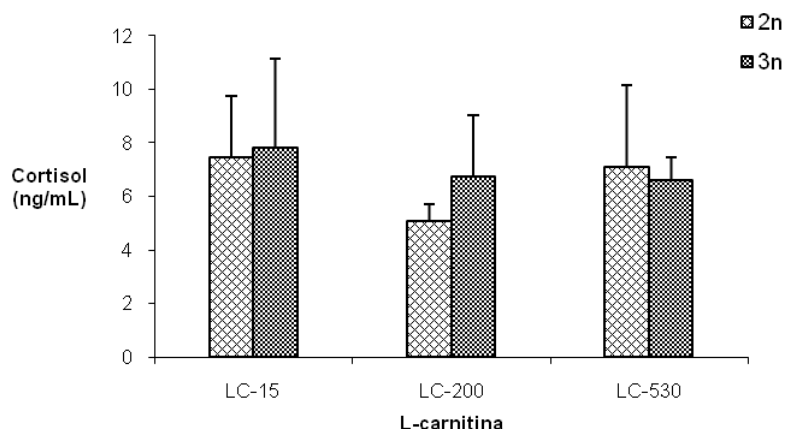


Figura 11: Níveis de cortisol no plasma (ng/mL) de *Oncorhynchus mykiss* diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas com diferentes dietas experimentais (15, 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta), após 60 dias de experiência. Os valores apresentados são médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

3.4.2. Concentração de Amónia

A concentração de amónia plasmática analisada no final do ensaio é apresentada na Figura 12. A ploidia afectou significativamente os níveis de amónia plasmática ($p < 0,05$), apresentando as trutas triplóides, alimentadas com qualquer uma das três dietas experimentais, uma concentração inferior (variando de $8,9 \pm 0,6$ a $11,0 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) à das trutas diplóides (variando de $12,2 \pm 1,5$ a $12,3 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$). Contrariamente à ploidia, os diferentes níveis de L-carnitina na dieta, não tiveram qualquer efeito estatístico sobre os níveis de amónia plasmática.

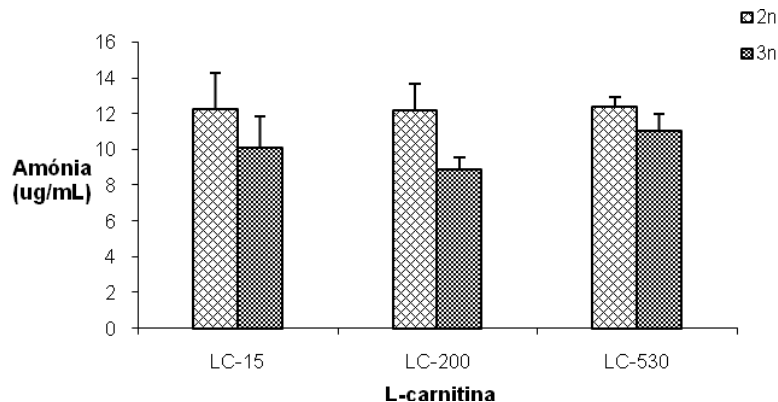


Figura 12: Concentração de amônia no plasma em $\mu\text{mol/L}$ (valores médios $\pm$ desvio padrão, $n=3$) de *Oncorhynchus mykiss* diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas com três dietas experimentais que diferem entre si na concentração de L-carnitina (15, 200 e 530mg/kg de dieta), durante 60 dias de ensaio.

3.4.3. Osmolalidade

Relativamente à análise de osmolalidade plasmática, verificou-se uma ligeira diminuição nos níveis de osmolalidade do início ($312,4 \pm 10,3 \text{ mOsm}$ em diplóides e $308,6 \pm 8,5 \text{ mOsm}$ em triplóides) para o fim do período experimental, contudo estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Todavia, no final da experiência a ploidia afectou significativamente ($p < 0,05$) a osmolalidade plasmática (Figura 13), apresentando as trutas triplóides uma osmolalidade sempre inferior (variando de $285,4 \pm 13,5$ a $290,8 \pm 12,9 \text{ mOsm}$) à das trutas diplóides (variando de $298,2 \pm 7,1$ a $303,5 \pm 3,3 \text{ mOsm}$). Relativamente à suplementação de L-carnitina dietética, não foi observado nenhum efeito significativo sobre a osmolalidade plasmática.

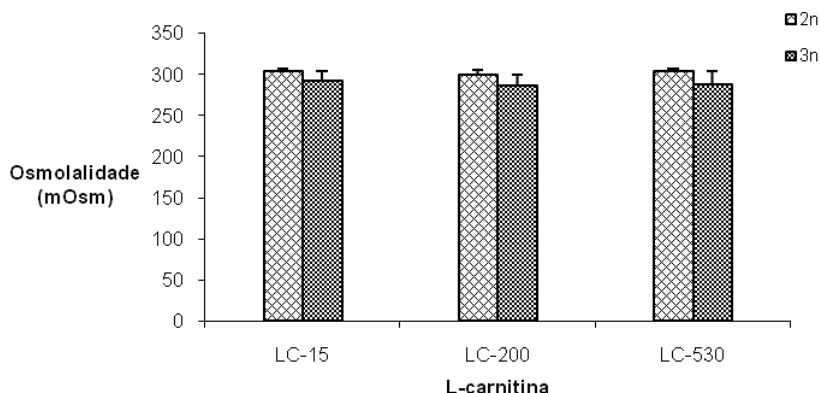


Figura 13: Níveis de osmolalidade no plasma (mOsm) de *Oncorhynchus mykiss* diplóides (2n) e triplóides (3n) alimentadas por diferentes dietas experimentais (15, 200 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta), após 60 dias de experiência. Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

4. DISCUSSÃO

4.1. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia no Crescimento

4.1.1. Efeito da L-carnitina

À semelhança do que já havia sido descrito no salmão do Atlântico (Ji *et al.*, 1996), na truta arco-íris (Rodehutscord, 1995; Chatzifotis *et al.*, 1997), no ciclídeo ornamental (Harpaz *et al.*, 1999), em híbridos de robalo-muge (Gaylord e Gatlin, 2000a, b), no robalo Europeu (Dias *et al.*, 2001), em guppys (Dzikowski *et al.*, 2001), no peixe-gato Africano (Ozório, 2001; Ozório *et al.*, 2001a, b) e na tilápia híbrida (Schlechtriem *et al.*, 2004), os resultados deste estudo mostraram que a suplementação de L-carnitina na dieta não teve efeito significativo sobre o crescimento e eficiência alimentar em juvenis de trutas arco-íris diplóides e triplóides, ou seja, não houve diferenças estatísticas entre tratamentos nos índices de crescimento diário (ICD) e conversão alimentar (ICA). Contudo, verificou-se um aumento tendencial do ICD dos peixes com o aumento dos níveis de L-carnitina na dieta. Além disso, contrariamente aos estudos anteriormente citados, neste ensaio a suplementação de L-carnitina afectou o ganho de peso (GP) dos peixes, tendo-se verificado o aumento de peso com o aumento do nível de L-carnitina na dieta, sendo este aumento significativo entre as trutas alimentadas com 15mg de L-carnitina/kg de dieta e as trutas alimentadas com 530mg/kg. Esta diferença pode ter origem num aumento (embora não significativo) do consumo de alimento (CA), ou seja, a L-carnitina poderá ter influência no apetite das trutas. Assim, os resultados sugerem que se o período experimental fosse superior (acima de 60 dias) poder-se-ia ter observado um efeito mais evidente da suplementação de L-carnitina sobre o crescimento das trutas, como constatado em muitas experiências conduzidas por longos períodos de tempo (Santulli e D'Amelio, 1986a; Jayaprakas *et al.*, 1996; Keshavanath e Renuka, 1998; Becker *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2008).

Independentemente da duração do período experimental, foi também verificado noutros trabalhos (Santulli e d'Amelio, 1986b; Torreele *et al.*, 1993; Chatzifotis *et al.*, 1995, 1996; Twibell e Brown, 2000) o efeito da promoção do crescimento pela suplementação de L-carnitina em várias espécies marinhas e de água doce. Como observado por Becker *et al.* (1999), em alguns estudos onde os efeitos positivos da suplementação de L-carnitina na dieta foram encontrados, uma relação linear dose/resposta pode ser estabelecida (Torreele *et al.*, 1993; Focken *et al.*, 1997), enquanto noutros estudos essa relação parece não ser linear, com uma dose muito eficiente combinada com respostas neutras ou mesmo negativas com o aumento do nível de L-carnitina na dieta (Chatzifotis *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1997; Keshavanath e

Renuka, 1998; Becker *et al.*, 1999). Neste estudo, apesar de não se ter observado um efeito claro da suplementação de L-carnitina na dieta sobre o crescimento, parece haver uma relação linear entre o desempenho do crescimento e os níveis de L-carnitina na dieta. Os mecanismos pelos quais a suplementação de L-carnitina dietética pode exercer tais efeitos benéficos, em termos de desempenho no crescimento, são ainda pouco compreendidos em peixes. Uma das explicações mais comuns para o efeito de promover o crescimento é uma utilização mais eficiente da energia dos ácidos gordos, como resultado do aumento da oxidação lipídica pela mitocôndria. Bilinski e Jonas (1970) demonstraram *in vitro* que a oxidação dos ácidos gordos de cadeia longa em mitocôndrias isoladas do músculo vermelho de trutas foi aumentada após a administração de L-carnitina.

É difícil fazer uma comparação dos resultados quanto à suplementação de L-carnitina dietética na sobrevivência, crescimento e metabolismo lipídico dos peixes, entre os diversos trabalhos publicados, pois os efeitos benéficos da L-carnitina diferem entre espécies, estágio de desenvolvimento dos peixes, condições ambientais e de cultivo (por exemplo, situações de stress) e a composição da dieta (ou seja, teores de gordura, lisina ou mesmo o nível adicional de L-carnitina) (Dias *et al.*, 2001; Harpaz, 2005). Além disso, a eficácia da suplementação de L-carnitina dietética pode também ser afectada pelas variações nas actividades bioquímicas, metabólicas e fisiológicas, como no caso das distintas fases de vida do peixe (Dias *et al.*, 2001). Em seres humanos, Feller e Rudman (1988) concluíram que a exigência de L-carnitina é mais elevada durante um período de rápido crescimento. Uma tendência semelhante também foi registada nas aves (Rabie e Szilágyi, 1998). Nos peixes, muitos dos estudos que concluem que a dieta com L-carnitina se revelou benéfica para o desempenho do crescimento foram realizados com formas larvares e com juvenis muito pequenos (Santulli e D'Amelio, 1986b; Torreele *et al.*, 1993; Chatzifotis *et al.*, 1995, 1996; Keshavanath e Renuka, 1998). No entanto, em estudos realizados em animais maiores (15-45g) os efeitos positivos da alimentação com L-carnitina tornam-se menos evidentes, como confirmam alguns estudos (Santulli e D'Amelio, 1986a; Chatzifotis *et al.*, 1996). Isto acontece provavelmente porque o tamanho inicial do peixe testado desempenha um papel importante no resultado do crescimento, uma vez que a taxa de crescimento diminui (em percentagem de massa corporal) com o aumento de tamanho (Harpaz, 2005), ou seja, os animais pequenos crescem mais rápido do que os animais mais velhos, apresentando necessidades energéticas relativamente maiores (Ozório, 2009). Para sustentar essas taxas de crescimento elevadas uma quantidade relativamente maior de carnitina é necessária, de forma a transportar os ácidos gordos mais rapidamente para o local da β -oxidação. Acresce que, uma vez que a síntese endógena de carnitina está menos desenvolvida durante a fase inicial de vida, os

requisitos de carnitina destes animais podem exceder a sua capacidade de síntese, levando a uma exigência adicional de suplementação de carnitina dietética (Ozório, 2009). Assim, a deficiência em carnitina poderia ser mais facilmente expressa em juvenis que também requerem mais alimento por unidade de peso corporal (Harpaz, 2005). Isto pode provavelmente explicar a contradição nos resultados obtidos por Torreele *et al.* (1993), que mostraram os efeitos positivos no crescimento de juvenis de peixe-gato Africano de peso inicial de 5g, enquanto tal efeito não foi detectado por Ozório (2001) que analisou a mesma espécie de peixe mas com um peso médio inicial de 23g. Deste modo, o mesmo pode ter sucedido no trabalho realizado, uma vez que os peixes utilizados tinham um peso médio inicial de 30g, o que poderá explicar o motivo pelo qual a suplementação de L-carnitina dietética não teve um efeito conciso sobre o crescimento.

Outra possível explicação para o sucedido são os níveis de L-carnitina utilizados, ou seja, se tivesse sido utilizado um nível de suplementação superior a 530mg de L-carnitina/kg de dieta, poderia ter-se obtido um resultado mais claro no crescimento. Como no caso dos estudos realizados em juvenis de dourada Japonesa por Chatzifotis *et al.* (1995) e em tilápia Moçambicana por Jayaprakas *et al.* (1996), cujas concentrações de L-carnitina que resultaram num crescimento significativamente melhor foram de 1087, 2088 e de 900mg/kg, respectivamente. Registe-se contudo que nem sempre uma concentração superior de L-carnitina resulta num melhor crescimento, como ocorreu no caso dos testes realizados por Burtle e Liu (1994) no peixe-gato-do-canal e por Keshavanath e Renuka (1998) no “rohu”. Além disso, a questão custo-benefício deve ser considerada, uma vez que se trata de uma substância com importante custo económico. Assim, em alguns casos em que a suplementação de L-carnitina tem mostrado efeitos benéficos, o nível requerido desta substância pode não justificar o crescimento adicional obtido. Não obstante, de acordo com Becker *et al.* (1999) o piscicultor continuaria a beneficiar da suplementação de L-carnitina na dieta, daí que a utilização de concentrações intermediárias pode ser mais rentável do que os níveis de L-carnitina exigidos para uma taxa de crescimento máxima (Torreele *et al.*, 1993). Assim, segundo Lonza Ltd (CH-4002 Basel, Switzerland), empresa líder na produção de L-carnitina sintética, a suplementação de L-carnitina nas dietas que é recomendada para a truta é cerca de 500mg e por este motivo foi utilizado um valor relativamente próximo (530mg) como nível superior de suplementação.

4.1.2. Efeito da Ploidia

A produção de triploídes é geralmente reconhecida como o método mais prático, económico e eficaz para a produção em grande escala de peixes estéreis, uma vez que a esterilidade protege o crescimento somático, a sobrevivência e a qualidade da carne dos

efeitos negativos da maturação sexual (Maxime, 2008). Contudo, nenhum estudo até à data foi realizado sobre o efeito que a suplementação de L-carnitina na dieta poderia ter na sobrevivência, crescimento e metabolismo lipídico de animais triplóides. Assim, este trabalho foi o pioneiro no estudo dos possíveis efeitos que uma alimentação com carnitina pode ter no desenvolvimento dos peixes triplóides, o que dificulta a comparação com outros trabalhos.

Estudos que avaliaram a sobrevivência, o crescimento e o desempenho fisiológico dos peixes diplóides e triplóides obtiveram resultados bastante variados, o que pode ser um efeito, sobretudo, das diferenças apresentadas entre espécies, idade, sexo e condições de cultivo (Benfey, 1999). Além disso, existem estudos que mostraram que, dentro de uma mesma espécie, o desempenho entre diplóides e triplóides é muito variável (Ihssen *et al.*, 1990; Galbreath *et al.*, 1994; McGeachy *et al.*, 1995). Assim, o crescimento dos triplóides comparativamente aos diplóides tem gerado uma certa controvérsia.

Segundo um estudo de Toledo-Filho *et al.* (1996), os triplóides possuem nas suas células uma quantidade superior de informação genética comparativamente com os diplóides, possuindo assim um maior número de genes e núcleos e células com uma dimensão superior (Benfey, 1999; Maxime, 2008), o que pode levar a pensar que os animais triplóides cresçam mais rapidamente do que os diplóides. Contudo, o facto dos triplóides possuírem menor número de células por tecido ou órgão do que os diplóides (Suresh e Sheehan 1998a; Benfey, 1999; Johnston *et al.*, 1999), faz com que eles se desenvolvam e cresçam de uma forma “normal”, ou seja, semelhante aos diplóides (Maxime, 2008). O presente estudo está de acordo com o descrito anteriormente, ou seja, não foram observadas diferenças significativas no desempenho do crescimento entre trutas triplóides e diplóides, apesar de se ter verificado diferenças significativas no índice de ingestão voluntário (IIV), o qual foi superior nas trutas diplóides em comparação com as triplóides. Este resultado pode dever-se ao facto das trutas diplóides terem consumido mais alimento (embora não significativamente) do que as triplóides. Assim, conclui-se que a ploidia não teve efeito sobre o crescimento dos juvenis de trutas arco-íris. No entanto, é importante mencionar que nas primeiras fases de desenvolvimento a sobrevivência e o crescimento são consideravelmente mais baixos nos animais triplóides (Thorgaard, 1986; Sutterlin *et al.*, 1987; Malison *et al.*, 1993; Withler *et al.*, 1995) e que estes animais parecem apresentar mais stress crítico (Benfey, 1999; Segato *et al.*, 2006) dos que os indivíduos diplóides. Contudo estas diferenças diminuem com o tempo, uma vez que os triplóides superam eventualmente os diplóides no crescimento, devido à sua esterilidade (Chourrout *et al.*, 1986; Thorgaard, 1986; Boulanger, 1991).

As condições experimentais utilizadas também influenciam o desempenho do crescimento (Guo *et al.*, 1990; Myers, 1991), observando-se que, quando os peixes triplóides e diplóides são produzidos em conjunto, os triplóides exibem geralmente desempenhos de crescimento inferiores comparativamente com os diplóides (Cassani e Caton, 1986; Benfey *et al.*, 1989; Quillet e Gaignon, 1990; Galbreath *et al.*, 1994; Galbreath e Thorgaard, 1995; McCarthy *et al.*, 1996; Bonnet *et al.*, 1999; Peruzzi *et al.*, 2004). De acordo com Boulanger (1987) e Carter *et al.* (1994), tal facto pode dever-se à menor agressividade e capacidade competitiva dos indivíduos triplóides. Quando os peixes triplóides e diplóides são produzidos separadamente, como é o caso do estudo realizado, nem a sobrevivência nem o crescimento são afectados pela ploidia, tal como foi verificado em numerosos estudos (Oliva-Teles e Kaushik, 1990a; Wolters *et al.*, 1991; Sugama *et al.*, 1992; Na-Nakorn e Lakhaanantakun, 1993; Mol *et al.*, 1994; O'Flynn *et al.*, 1997; Withler *et al.*, 1998; Lilyestrom *et al.*, 1999; O'Keefe e Benfey, 1999; Felip *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004).

4.2. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia na Composição Centesimal

4.2.1. Efeito da L-carnitina

É sabido que a principal função da carnitina é o transporte dos ácidos gordos de cadeia longa para o interior da mitocôndria para serem oxidados e convertidos em energia. Deste modo, segundo Bilinski e Jonas (1970), a oxidação dos ácidos gordos seria aumentada pela administração de L-carnitina, reduzindo a acumulação de lípidos nos tecidos. Assim, os animais alimentados com maiores quantidades de carnitina, em dietas com um teor de gordura considerável, beneficiariam desta função e passariam a direccionar a energia proveniente da proteína para o crescimento (Harpaz, 2005). Contudo, existe uma grande variabilidade de respostas quanto ao efeito que a administração de L-carnitina pode ter no metabolismo lipídico dos peixes. Alguns trabalhos realizados, como por exemplo no robalo Europeu (Santulli e D'Amelio, 1986a; Santulli *et al.*, 1988, 1990), no peixe-gato Africano (Torreele *et al.*, 1993; Ozório *et al.*, 2001a, b), no peixe-gato-do-canal (Burtle e Liu, 1994), no salmão do Atlântico (Ji *et al.*, 1996) e no “rohu” (Keshavanath e Renuka, 1998) comprovaram o efeito benéfico da suplementação de L-carnitina dietética na redução do teor lipídico corporal, bem como no músculo, fígado e vísceras. Em contrapartida, existem trabalhos em que a suplementação de L-carnitina não reduziu o índice lipídico na composição corporal e centesimal de diversos tecidos (músculo, fígado, vísceras e gónadas), como descrito para a dourada Japonesa (Chatzifotis *et al.*, 1995, 1996; Chatzifotis e Takeuchi, 1997), a truta arco-íris (Rodehutscord, 1995; Chatzifotis *et al.*, 1997), a carpa (Focken *et al.*, 1997), a

tilápia híbrida (Becker *et al.*, 1999), o robalo híbrido (Twibell e Brown, 2000) e o robalo Europeu (Dias *et al.*, 2001). Acresce que estes trabalhos também demonstraram que a suplementação de L-carnitina não afectou significativamente os restantes parâmetros avaliados na composição corporal e centesimal dos diversos tecidos, o que está de acordo com os resultados do presente trabalho, no qual não se observou qualquer efeito da suplementação de L-carnitina dietética no teor lipídico, humidade, cinzas, proteína e energia, quer na composição corporal, quer na composição centesimal do músculo e fígado nos juvenis de trutas arco-íris diplóides e triplóides.

A concentração de carnitina nos tecidos que pode ser influenciada por factores bióticos e abióticos, bem como a sua interacção, tem sido analisada em várias espécies alimentadas com dietas suplementadas de carnitina, como no ser humano (Bremer, 1983), no rato (Rodrigues *et al.*, 1990), no coelho (Bell *et al.*, 1992), na truta arco-íris (Miyasaki *et al.*, 1994), na dourada Japonesa (Chatzifotis *et al.*, 1996), no peixe-gato Africano (Ozório, 2001) e no salmão do Atlântico (Ji *et al.*, 1996), uma vez que varia numa ampla escala entre diferentes espécies e tecidos (Chatzifotis e Takeuchi, 1997; Harpaz, 2005). Após 60 dias de experiência, a suplementação de L-carnitina na dieta teve efeito sobre a concentração de carnitina existente nos tecidos, podendo concluir-se que existe uma relação linear entre os níveis de L-carnitina nos tecidos dos animais e os níveis de L-carnitina na dieta. Isto significa que a concentração de carnitina nos tecidos pode ser influenciada pela formulação da dieta, ou seja, embora a carnitina seja biosintetizada pelo organismo, a suplementação da mesma pode beneficiar o seu metabolismo. Estes resultados estão em conformidade com o estudo descrito por Ozório (2001), que demonstrou que a concentração de carnitina no músculo aumentou moderadamente quando os peixes foram alimentados entre 40 e 600mg de L-carnitina/kg de dieta. Com incorporações superiores a 600mg de L-carnitina na dieta verificou-se um forte incremento na concentração de carnitina muscular, o que segundo Ozório (2001) pode ser explicado por um aumento da deposição de carnitina no músculo, como reserva de carnitina, uma vez que nos peixes a exigência de carnitina sob condições fisiológicas normais seria inferior a 500-600mg de carnitina/kg de dieta. Deste modo, Ozório *et al.* (2001) sugerem que a administração de carnitina dietética seja altamente eficaz para aumentar as concentrações corporais de carnitina, o que implica que os suplementos de carnitina sejam absorvidos e eventualmente utilizados no metabolismo intermediário. A deposição de carnitina na truta arco-íris em todos os tratamentos foi sempre superior no músculo, em comparação com o fígado, o que está de acordo com a bibliografia (Miyasaki *et al.*, 1994; Ozório *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 1996), uma vez que o músculo é o principal tecido de armazenamento de L-carnitina.

A suplementação de L-carnitina na dieta também influenciou estatisticamente a concentração de carnitina-livre e de carnitina-esterificada no músculo e fígado. Os peixes alimentados com um nível de carnitina superior aumentaram significativamente as concentrações de carnitina-livre e esterificada no músculo e fígado. Estes resultados também foram verificados no peixe-gato Africano no estudo de Ozório *et al.* (2001) o que leva a concluir que também existe uma relação directamente proporcional entre a concentração de L-carnitina fornecida na dieta e a concentração de carnitina-livre e esterificada presente nos tecidos. O mecanismo pelo qual isto ocorre não é claro para muitos investigadores, no entanto é razoável postular, tal como advogam Gaylord e Gatlin (2000a), que a carnitina dietética foi absorvida e entrou no metabolismo. Acresce que o aumento no conteúdo de carnitina-esterificada no fígado indica provavelmente um aumento da mobilização da carnitina para a oxidação lipídica. Contudo, como não se observou uma redução significativa de lípidos no fígado, pode-se inferir que a oxidação dos ácidos gordos pode ter estado envolvida noutras funções.

4.2.2. Efeito da Ploidia

Como referido anteriormente, é a primeira vez que se estuda o efeito que uma dieta suplementada em L-carnitina pode ter na composição corporal e centesimal de vários tecidos em peixes triplóides, logo não existem meios de comparação com outros estudos sobre este tema em concreto. Além disso, os dados comparativos sobre a composição corporal e centesimal de vários tecidos em peixes diplóides e triplóides disponíveis na bibliografia são escassos e controversos.

Neste estudo verificou-se que, tal como a suplementação de L-carnitina na dieta, a ploidia também não teve efeito sobre a composição corporal, ou seja, o teor em humidade, cinzas, proteína, gordura e energia entre os juvenis de trutas arco-íris diplóides e triplóides não diferiu estatisticamente. No entanto, existem dois trabalhos que registaram diferenças na composição corporal entre peixes diplóides e triplóides (Quin *et al.*, 1998; Segato *et al.*, 2006).

Relativamente à composição centesimal do músculo, observou-se que a ploidia apenas afectou o teor energético, tendo sido superior nas trutas diplóides. O facto dos peixes triplóides terem uma eficiência respiratória mais baixa e serem mais susceptíveis ao stress do que os peixes diplóides pode explicar este resultado. Estes peixes possuem menor número de eritrócitos o que provavelmente afecta as trocas de oxigénio e diminui a capacidade de transporte de oxigénio no sangue (Benfey, 1999; Benfey e Biron, 2000; Tiwary e Ray, 2004), sendo provável a necessidade de dispender mais energia para manter o equilíbrio interno. Os restantes parâmetros avaliados no músculo não foram afectados pela ploidia, o que está de acordo com os trabalhos realizados no peixe-

dourado, *Carassius auratus* (Sezaki *et al.*, 1983), na truta arco-íris (Oliva-Teles e Kaushik, 1990a) e na tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* L. (Hussain *et al.*, 1995), na qual também não foram observadas diferenças na percentagem de humidade, cinzas, proteína e gordura no músculo de diplóides e triplóides. Adicionalmente, no presente estudo também não se verificou qualquer diferença na concentração de carnitina muscular entre as trutas diplóides e triplóides, daí a quantidade de lípidos a nível muscular ter sido semelhante entre os diferentes juvenis de trutas arco-íris, mesmo alimentados com dietas suplementadas com carnitina. É provável que, se este estudo decorresse num estado de desenvolvimento mais avançado, por exemplo durante a fase de maturação sexual, poderia ter-se observado quantidades de lípidos musculares e viscerais significativamente diferentes entre os animais diplóides e triplóides, podendo até ser superiores nestes últimos, devido à redução do desenvolvimento gonadal exibido pelos triplóides, pelo facto de serem estéreis como foi verificado por Hussain *et al.* (1995) e Kerby *et al.* (2002).

Quanto à composição centesimal do fígado, observou-se que a ploidia apenas afectou a percentagem de humidade, que foi superior nas trutas triplóides. Isto poderá ter origem numa maior concentração de carnitina no fígado destas trutas, comparativamente com os indivíduos diplóides, que pode ter contribuído para uma redução (embora não significativa) lipídica neste órgão. Contudo, este resultado não está de acordo com o descrito por Segato *et al.* (2006), que observaram exactamente o oposto relativamente à percentagem de humidade e gordura hepática entre peixes triplóides e diplóides, embora noutra espécie.

Relativamente à forma como a carnitina se encontra nos tecidos, verificou-se que a ploidia apenas afectou a carnitina-esterificada presente no músculo, sendo a concentração de carnitina-esterificada significativamente superior nas trutas triplóides em comparação com as diplóides. Isto poderia indicar que as trutas triplóides estão a mobilizar uma quantidade superior de carnitina para a oxidação lipídica. Contudo, como não se observou a redução dos PUFA neste tecido nos peixes triplóides não se pode tirar esta conclusão. Assim, surge a necessidade de se realizar mais estudos para averiguar o sucedido.

Em resumo, em juvenis de trutas arco-íris foi observado apenas o efeito de interacção entre a suplementação de L-carnitina na dieta e a ploidia na concentração de carnitina a nível muscular, verificando-se que tanto em diplóides como em triplóides, o aumento da carnitina fornecida na alimentação contribuiu efectivamente para o aumento da carnitina no tecido muscular, uma vez que o músculo é o principal tecido de armazenamento de L-carnitina nos animais.

4.3. O Efeito da L-carnitina e da Ploidia na Composição de Ácidos Gordos

4.3.1. Efeito da L-carnitina

A composição em ácidos gordos nos tecidos dos peixes reflecte geralmente a composição em ácidos gordos da dieta (Yu *et al.*, 1977; Cowey *et al.*, 1979; Mugrditchian *et al.*, 1981; Yu e Sinnhuber, 1981; Boggio *et al.*, 1985; Thomassen e Rosjo, 1989; Skonberg *et al.*, 1994; Dosanjh *et al.*, 1998). Neste ensaio constatou-se este facto, existindo uma correlação linear entre a concentração de ácidos gordos das dietas e a concentração de ácidos gordos no músculo e fígado das trutas. A necessidade de determinados ácidos gordos depende da espécie considerada e da fase de desenvolvimento do peixe (Izquierdo, 1996). Em geral, os peixes de água doce requerem fontes dietéticas de PUFA das famílias *n*-3 (por exemplo o ácido linolénico, 18:3*n*-3) e *n*-6 (por exemplo o ácido linoléico, 18:2*n*-6) para um crescimento óptimo (Henderson e Tocher, 1987; Sargent *et al.*, 1989). Enquanto que os peixes marinhos requerem fontes dietéticas de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA), particularmente o EPA (20:5*n*-3) e o DHA (22:6*n*-3) para promover o crescimento (Bell *et al.*, 1986). No entanto, estes ácidos gordos essenciais só podem ser obtidos através da dieta, uma vez que à semelhança de outros animais, os peixes também não são capazes de os sintetizar de novo. Em trutas e ratos, a L-carnitina suplementar facilita o transporte de ácidos gordos de cadeia longa na mitocôndria, resultando em mais energia a partir da β -oxidação (Bilinski e Jonas, 1970; Rebouche, 1983).

De todos os grupos de ácidos gordos analisados no músculo, a suplementação de L-carnitina na dieta apenas afectou o grupo dos PUFA, mais concretamente o 18:2*n*-6 e o 18:4*n*-3, observando-se que ambos os ácidos gordos foram estatisticamente inferiores nas trutas alimentadas com 530mg de L-carnitina/kg de dieta. Esta diminuição leva a pressupor que a concentração mais elevada de L-carnitina contribuiu para a oxidação destes ácidos gordos no músculo. Todavia, ao observar-se o somatório dos PUFA no tecido muscular, verificou-se que apesar de ter ocorrido uma diminuição tendencial no somatório dos ácidos gordos polisaturados, com o aumento da concentração de L-carnitina na dieta, essa diminuição não foi significativa. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Chatzifotis *et al.* (1996). Deste modo, pode-se especular que se o período experimental fosse superior a 60 dias poderia ter-se constatado um efeito mais evidente da suplementação de L-carnitina dietética, sobre a oxidação dos PUFA, o que resultaria numa redução do teor lipídico muscular e numa melhoria da taxa de crescimento das trutas produzidas.

Relativamente aos grupos de ácidos gordos analisados no fígado, observou-se que a suplementação de L-carnitina na dieta influenciou estatisticamente o 16:0, SFA, que

diminuiu com o aumento da concentração de L-carnitina na dieta. As diferenças observadas podem dever-se ao uso preferencial deste ácido gordo como substrato para a β -oxidação lípidica ao nível do fígado, como demonstrado por Henderson e Sargent (1985). Foi também observada a influência de L-carnitina dietética na percentagem do ácido gordo polinsaturado 22:5 n -3 que foi estatisticamente superior no fígado dos peixes alimentados com a dieta contendo 200mg de L-carnitina. Contudo, uma vez que as concentrações de 15 e 530mg de L-carnitina/kg de dieta foram semelhantes, pode-se considerar que a carnitina não teve efeito sobre este ácido gordo, do ponto de vista biológico. É importante mencionar que, apesar de não se ter verificado diferenças estatísticas no somatório dos PUFA, entre as diferentes concentrações de L-carnitina, verificou-se um aumento tendencial na percentagem destes ácidos gordos. Este resultado pode ser explicado pelo baixo teor lipídico utilizado nas dietas experimentais (cerca de 20% de gordura bruta). O facto de se ter utilizado na dieta um nível lipídico inferior ao que é aconselhável para se obter um crescimento óptimo na truta arco-íris (Lee e Putnam, 1973) pode ter potenciado a biossíntese de PUFA nas mitocôndrias do fígado, pelas enzimas dessaturases, em que a carnitina é um co-factor essencial, como foi demonstrado por Infante e Huszagh (1999) e por Wynn e Ratledge (2000). Uma vez que os PUFA são preferencialmente utilizados pela L-carnitina para a oxidação lípidica, estes resultados estão de acordo com os resultados de Ozório (2001), na qual verificou um aumento na percentagem de PUFA no tecido hepático, de peixes-gatos Africanos, quando alimentados com uma dieta rica em L-carnitina e com baixo teor de gordura e lisina.

É importante salientar que o efeito da suplementação de L-carnitina na dieta no aumento das concentrações de determinados PUFA (como EPA e DHA) no fígado, pode gerar controvérsia sobre a aplicação da carnitina dietética como uma ferramenta nutracêutica. Registe-se ainda que não está claro se o aumento do crescimento dos peixes, observado em diversos estudos, é o resultado do aumento da oxidação dos ácidos gordos devido ao aumento do transporte das acilcarnitinas na mitocôndria, ou o resultado de outras acções da carnitina. Está bem documentado o papel da carnitina na oxidação peroxissomal e microssomal dos ácidos gordos de cadeia longa (Markwell e Bieber, 1976; Bieber *et al.*, 1981), no catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (Bremer e Davis, 1978) e na modulação da relação CoA/acilCoA (Lysiak *et al.*, 1988), sendo esta última de primordial importância no controlo do catabolismo de lípidos e hidratos de carbono na taxa do ciclo de Krebs (Chatzifotis *et al.*, 1996).

4.3.2. Efeito da Ploidia

Quanto ao possível efeito da ploidia sobre a composição de ácidos gordos no músculo, observou-se que este factor tanto afectou alguns SFA como PUFA. Os SFA influenciados pela ploidia foram o 16:0 e o 18:0 e as suas concentrações foram estatisticamente inferiores no músculo das trutas triplóides comparativamente com as diplóides. Os PUFA influenciados pela ploidia, nomeadamente o 18:3 n -3 e o EPA, foram estatisticamente superiores no músculo das trutas triplóides comparativamente com as diplóides. Contudo, essas diferenças observadas não foram significativas do ponto de vista biológico, uma vez que não influenciaram o crescimento. Acresce ainda que não foram detectadas diferenças significativas quanto ao somatório de SFA e PUFA no músculo dos dois tipos de truta.

Relativamente ao efeito da ploidia na composição de ácidos gordos no fígado, observou-se que este factor tanto afectou alguns MUFA como PUFA. Os MUFA influenciados pela ploidia foram os 16:1, 18:1 e 22:1, sendo todos eles estatisticamente inferiores no fígado das trutas triplóides comparativamente com as diplóides. No entanto, apesar de não se ter observado diferenças significativas no somatório dos MUFA, presenciou-se um decréscimo tendencial nos indivíduos triplóides. Isto pode dever-se ao facto dos MUFA, nomeadamente o 18:1, ser uma das principais fontes de energia lipídica em situações de grande exigência energética. Assim, numa situação de eventual stress causado pelas condições de cultivo, os peixes triplóides que são mais susceptíveis ao stress (Benfey, 1999; Benfey e Biron, 2000) e com uma eficiência respiratória inferior (Tiwary e Ray, 2004), comparativamente aos indivíduos diplóides, necessitam de mais energia para suprir o elevado gasto energético utilizado para manter o equilíbrio homeostático. Adicionalmente, observou-se o efeito de interacção entre os dois factores em estudo, principalmente no 16:0, verificando-se teores inferiores nos triplóides alimentados com a dieta contendo 530mg de L-carnitina. Quando o nível energético do organismo é superior àquele que é necessário para o cumprimento das funções metabólicas, parte dessa energia pode ser direccionada para a síntese de ácidos gordos (Nelson e Cox, 2000), sendo o produto final o 16:0. Como os indivíduos triplóides necessitam dessa energia para suprir os gastos metabólicos, como referido anteriormente, a síntese de 16:0 no tecido hepático pode ter sido inferior.

Os PUFA influenciados pela ploidia no fígado foram os 20:2 n -6, 20:4 n -6 e DHA, os quais foram todos estatisticamente superiores nas trutas triplóides comparativamente com as diplóides. No entanto, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas no somatório dos PUFA, verificou-se um aumento tendencial no seu teor nos indivíduos triplóides. Tal como referido anteriormente, devido a uma necessidade energética superior os peixes triplóides poderão hipoteticamente oxidar mais ácidos gordos que os

diplóides. De forma a suprir as necessidades em ácidos gordos essenciais, é provável que os peixes triplóides biossintetizem mais PUFA para equilibrar o gasto energético superior (Ozório, 2001). Além disso, também se observou o efeito de interacção entre os dois factores estudados no DHA, tendo-se constatado que este ácido gordo essencial foi significativamente superior nas trutas triplóides, comparativamente com as diplóides, quando alimentadas com as dietas de 200 e de 530mg de L-carnitina.

4.4. Efeito da L-carnitina e da Ploidia ao Nível do Stress

4.4.1. Efeito da L-carnitina

As práticas de cultivo ocasionam stress fisiológico, que pode perturbar o sistema osmorregulador, acarretando um aumento nos níveis de iões e de cortisol plasmático nos peixes. Este é o indicador de stress mais amplamente utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (Wendeelar Bonga, 1997). Deste modo, para atenuar eventuais problemas gerados pelos sistemas de cultivo intensivo, administrou-se L-carnitina na dieta com o objectivo de aumentar a resistência dos peixes cultivados a eventual stress. Os peixes originalmente produzidos a 15-20kg/m³ passaram para 50kg/m³, todavia a suplementação de L-carnitina na dieta não afectou a osmolalidade e as concentrações de cortisol e amónia no plasma das trutas arco-íris.

Relativamente à concentração de cortisol plasmático das trutas, mantidas a uma densidade de cultivo de 50kg/m³ e sujeitas a possível stress adicional por manuseamento, a suplementação de L-carnitina na dieta não baixou os níveis de cortisol plasmático dos peixes, mesmo nos peixes alimentados com níveis superiores de L-carnitina. Os resultados mostram níveis de cortisol plasmáticos no fim do ensaio semelhantes aos níveis basais para esta espécie (< 20ng/ml) (Taylor *et al.*, 2007). Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por Kebus *et al.* (1992) e Procarione *et al.* (1999), na qual a truta arco-íris, numa densidade de cultivo relativamente elevada, não exibiu qualquer alteração nos níveis de cortisol plasmático. Estes resultados sugerem então duas possíveis explicações para o sucedido: 1º) a densidade de cultivo de 50kg/m³ provavelmente não é um agente de stress crónico em trutas arco-íris, uma vez que os peixes produzidos nesta densidade não experimentaram alterações nos parâmetros fisiológicos que normalmente seriam esperados sob condições de stress, como o aumento dos níveis de glucose e cortisol no plasma, como sugerido por Procarione *et al.* (1999)); 2º) o uso de cortisol plasmático como um indicador de stress crónico, nesta espécie, pode não ser muito elucidativo, devido à aclimação das glândulas inter-renais durante o stress crónico e à influência de mecanismos de feedback negativo sobre o eixo HPI (Rotllant *et al.*, 2000). Além disso, alguns

investigadores defendem que na truta arco-íris a resposta do cortisol plasmático é uma marca individual que é muito consistente ao longo do tempo (Pottinger *et al.*, 1992; Pottinger e Carrick, 1999).

Quanto à concentração de amónia no plasma das trutas, não foi registada qualquer redução nos peixes alimentados com níveis superiores de L-carnitina, tal como tinha sido observado em trabalhos anteriores (Deshmukh e Rusk, 1988; Tremblay e Bradley, 1992), verificando-se no final da experiência valores de concentrações de amónia plasmática idênticos aos valores basais para esta espécie ($\approx 11\mu\text{g/mL}$) (Wicks e Randall, 2002). Isto pode ter ocorrido por três razões: 1^o) pelo facto da colheita de sangue na amostragem final (após 60 dias de ensaio) ter sido efectuada após 24 horas da última refeição, o que faz com que a amónia em circulação tenha já retomado aos seus valores basais. De acordo com Wicks e Randall (2002), este procedimento deve ocorrer durante um período de pelo menos 12 horas após a última refeição, para que deste modo seja possível apanhar o pico pós-pandrial (por volta das 4-8 horas após a alimentação) nesta espécie, uma vez que a amónia e a ureia são os produtos nitrogenados mais importantes do catabolismo proteico, em quase todos os teleósteos, incluindo os salmonídeos (Mommensen e Walsh, 1992; Wood, 1993), observando-se um aumento destas substâncias após 4-8 horas de ingestão proteica; 2^o) os níveis de amónia na água nunca registaram valores elevados ao ponto de se tornarem tóxicos para os peixes; 3^o) neste trabalho, a carnitina foi fornecida através da dieta e não por injeção nos peixes, como havia sido realizado nos trabalhos anteriormente referidos (Deshmukh e Rusk, 1988; Tremblay e Bradley, 1992), o que provavelmente tornou a sua acção menos eficaz. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por Ozório (2001) em peixe-gato Africano, onde a suplementação de L-carnitina dietética não afectou a concentração de amónia plasmática.

A osmolalidade plasmática das trutas arco-íris obtida neste trabalho está próxima dos valores esperados para esta espécie em água doce ($\approx 320\text{mOsm}$) (Taylor *et al.*, 2007), não tendo sido influenciada pela suplementação de L-carnitina na dieta, uma vez que o equilíbrio homeostático das trutas provavelmente não foi perturbado pelas condições de cultivo. Logo, as condições de cultivo não potenciaram o efeito da carnitina como protectora das membranas celulares, como observado no trabalho realizado por Schreiber *et al.* (1997), não permitindo melhorar a eficiência metabólica global dos peixes suplementados, uma vez que a redução nos gastos metabólicos para a manutenção da homeostasia permitiria uma maior conservação de energia (Focken *et al.*, 1997).

4.4.2. Efeito da Ploidia

Para além de se ter analisado o possível efeito da carnitina frente a determinadas situações de stress, com o objectivo de se tornar os peixes cultivados mais resistentes, também se averiguou o efeito da ploidia, ou seja, pretendeu-se avaliar se as trutas triplóides eram mais ou menos resistentes ao stress, causado por certas situações de cultivo, comparativamente com os indivíduos diplóides. Dos vários parâmetros fisiológicos analisados no plasma das trutas arco-íris diplóides e triplóides, apenas se constatarem diferenças estatísticas em termos de ploidia na concentração de amónia e osmolalidade.

Relativamente à concentração de cortisol plasmático das trutas, não se verificou qualquer efeito da ploidia sobre as concentrações de cortisol, ou seja, não houve diferenças significativas entre a concentração de cortisol plasmático das trutas diplóides e triplóides, registando-se em ambas níveis de cortisol próximos dos níveis basais ($< 20\text{ng/ml}$) (Taylor *et al.*, 2007). Quanto à semelhança dos valores de cortisol plasmático em ambas as estirpes de trutas, facto também observado noutros estudos para esta espécie (Benfey e Biron, 2000; Taylor *et al.*, 2007), pode-se inferir que os dois tipos de ploidia experimentaram o mesmo grau de stress fisiológico, que foi muito atenuado neste ensaio.

Quanto à concentração de amónia no plasma das trutas, observou-se que houve diferenças significativas entre as trutas diplóides e triplóides, sendo inferior nestas últimas. Contudo, em ambas as trutas, os valores plasmáticos de amónia no final da experiência foram próximos dos valores basais ($\approx 11\mu\text{g/mL}$) (Wicks e Randall, 2002), como se referiu e explicou anteriormente. Assim, não se pode interpretar essa diferença como sendo um possível efeito da ploidia.

A osmolalidade plasmática das trutas arco-íris diplóides e triplóides ($\approx 300\text{mOsm}$) foi estatisticamente inferior nas trutas triplóides, tal como tinha sido observado nos valores plasmáticos de amónia. Contudo, esta pequena diferença, apesar de significativa, não deve ser entendida como um possível efeito da ploidia sobre o sistema osmorregulador, uma vez que estes valores são próximos dos valores basais para esta espécie (Taylor *et al.*, 2007). Assim, mais estudos são necessários para esclarecer estas diferenças, que também se verificaram no arranque da experiência.

Não foi observado nenhum efeito de interacção entre a suplementação de L-carnitina na dieta e a ploidia quanto à resistência dos juvenis de trutas arco-íris, em função das condições experimentais, como densidade de cultivo de 50kg/m^3 e manuseamento, o que leva a especular que estas condições experimentais não foram suficientes para induzir stress nos peixes cultivados, apesar de originalmente estarem a uma densidade de cultivo de $15\text{-}20\text{kg/m}^3$. Logo, não foi possível observar o eventual efeito que os dois

factores em estudo teriam sobre a adaptação dos peixes a condições de cultivo intensivo. É importante também referir que a qualidade da água foi mantida nos níveis exigidos pela espécie durante toda a experiência e nenhuma doença ou infecção clínica foi observada, pelo que nenhum factor externo à experiência influenciou os resultados.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho vêm confirmar que tanto o crescimento como a sobrevivência de juvenis de trutas arco-íris, mantidos numa densidade de cultivo de 50kg/m³ e sujeitos a stress por manuseamento frequente durante 60 dias, não foi afectado significativamente nem pela ploidia nem pela suplementação de L-carnitina na dieta. Contudo, verificou-se um aumento tendencial do crescimento dos peixes com o aumento dos níveis de L-carnitina na dieta, o que sugere que se o período experimental fosse mais longo e os peixes fossem mais pequenos poderia ter-se observado o efeito potenciador da carnitina sobre o crescimento das trutas diplóides e triplóides.

De igual modo, os dois factores em estudo não exerceram efeito na composição corporal, bem como na composição centesimal do músculo e fígado, nomeadamente no que diz respeito ao teor lipídico, ou seja, não foi observada uma redução lipídica, principalmente nos grupos alimentados com níveis superiores de L-carnitina, como seria de esperar. Mas observou-se que a suplementação de L-carnitina na dieta influenciou a concentração de carnitina total, bem como de carnitina-livre e esterificada no tecido muscular e hepático, constatando-se que existe uma relação directamente proporcional entre o nível de L-carnitina que é fornecida na dieta e a concentração de carnitina que é depositada nos tecidos.

No que diz respeito ao perfil de ácidos gordos analisado nos diferentes tecidos, verificou-se que o somatório de todos os grupos de ácidos gordos (SFA, MUFA e PUFA) não foi afectado estatisticamente por ambos os factores em estudo. No entanto, concretamente em relação aos PUFA analisados, verificou-se que concentrações superiores de L-carnitina contribuíram para uma diminuição tendencial dos PUFA no tecido muscular. No fígado, estas concentrações aumentaram a percentagem de PUFA, o que pode dever-se ao baixo teor lipídico utilizado nas dietas experimentais que potenciaram a biossíntese destes ácidos gordos neste tecido. Quanto à ploidia, verificou-se que, em ambos os tecidos, os peixes triplóides apresentaram uma percentagem de PUFA superior, o que no tecido hepático pode ser explicado pela biossíntese destes ácidos gordos para equilibrar o gasto energético superior nestes animais.

Quanto ao possível efeito da ploidia como da suplementação de L-carnitina na dieta, testado para averiguar a adaptação e/ou resistência dos peixes, quando sujeitos a determinadas condições de cultivo, como densidades relativamente elevadas (50kg/m³) e manuseamento frequente, constatou-se que ambos os factores em estudo não tiveram influência sobre os peixes cultivados, o que pode dever-se ao facto das condições experimentais não terem sido verdadeiros agentes de stress que pusessem em causa o desenvolvimento normal dos peixes.

Por fim, com este trabalho, foi possível concluir que os juvenis de trutas arco-íris triplóides têm um crescimento semelhante aos diplóides e que uma densidade de stock relativamente elevada e manuseamento frequente, aplicados num sistema de cultivo intensivo, não são causadores de stress ao ponto de prejudicar o crescimento e aumentar a mortalidade destes peixes. Além disso, nas condições experimentais aplicadas, a suplementação de L-carnitina na dieta não teve um efeito evidente na promoção do crescimento, bem como na redução da gordura corporal em ambos os tipos de truta. Todavia, concentrações superiores de L-carnitina, contribuíram para uma diminuição tendencial dos PUFA no tecido muscular dos peixes produzidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksnes A, Gjerd B, Roald SO. 1986. **Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*.** *Aquaculture*. **53**: 7-20.

Aliah RS, Yamaoka K, Inada Y, Taniguchi N. 1990. **Effects of triploidy on tissue structure of some organs of ayu.** *Nippon Suisan Gakkaishi*. **56**: 569-575.

Allen Jr SK and Stanley JG. 1979. **Polyploid mosaics induced by cytochalasin B in landlocked salmon *Salmo salar*.** *Transactions of the American Fisheries Society*. **108**: 462-466.

Arai K. 2000. **Chromosome Manipulation in Aquaculture: Recent Progress and Perspective.** *Suisan Zoshoku*. **48**: 295-303.

Arai K, Matsubara K, Suzuki R. 1993. **Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*.** *Aquaculture*. **117**: 227-235.

Arrigoni-Martelli E and Caso V. 2001. **Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics.** *Drugs under experimental and clinical research*. **27(1)**: 27-49.

Barton BA. 2002. **Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.** *Integrative and Comparative Biology*. **42**: 517-525.

Barton B and Iwama GK. 1991. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** *Annual Review of Fish Diseases*. **1**: 3-26.

Beardmore JA, Mair GC, Lewis RI. 2001. **Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems and prospects.** *Aquaculture*. **197**: 283-301.

Becker K, Schreiber S, Angoni C, Blum R. 1999. **Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions.** *Aquaculture*. **174**: 313-322.

Behnke RJ. 1992. **Native Trout of Western North America. (American Fisheries Society Monograph 6).** American Fisheries Society, Bethesda, MA. USA.

Bell FP, Vidmar TJ, Raymond TL. 1992. **L-carnitine administration and withdrawal affect plasma and hepatic carnitine concentrations, plasma lipid lipoprotein composition, and in**

- vitro hepatic lipogenesis from labelled mevalonate and oleate in normal rabbits.** *Journal Nutrition.* **122:** 959-966.
- Bell MV, Henderson RJ, Sargent JR. 1986. **The role of polyunsaturated fatty acids in fish.** *Comparative Biochemistry and Physiology.* **83B:** 711-719.
- Benfey TJ. 1999. **The physiology and behavior of triploid fishes.** *Reviews in Fisheries Science.* **7:** 39-67.
- Benfey TJ and Donaldson EM. 1987. **Current status of induced sex manipulation.** In: Idler DR, Crim LW, Walsh JM, (Eds), *Reproductive Physiology of Fish.* Univ. Newfoundland. p. 108-119.
- Benfey TJ, Dye HM, Solar II, Donaldson EM. 1989. **The growth and reproductive endocrinology of adult triploid Pacific salmonids.** *Fish Physiology and Biochemistry.* **6:** 113-120.
- Benfey TJ and Biron M. 2000. **Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*).** *Aquaculture.* **184:** 167-176.
- Bernardino FNV. 2000. **Review of aquaculture development in Portugal.** *Journal of Applied Ichthyology.*
- Bieber LL, Krahling JB, Clarke PRH, Valkner KJ, Tolbert NE. 1981. **Carnitine acyltransferases in rat liver peroxisomes.** *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **211:** 599-604.
- Bilinski E and Jonas REE. 1970. **Effect of coenzyme A and carnitine on fatty acid oxidation by rainbow trout mitochondrial.** *Journal of the Fisheries Research Board of Canada.* **27:** 857-864.
- Biron M and Benfey TJ. 1994. **Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell).** *Fish Physiology and Biochemistry.* **13:** 153-160.
- Bjornsson B. 1994. **Effects of stocking density on growth rate of Halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. reared in large circular tanks for three years.** *Aquaculture.* **123:** 259-270.
- Blanc JM, Poisson H, Vallee F. 1992. **Survival, growth and sexual maturation of the triploid hybrid between rainbow trout and arctic char.** *Aquatic Living Resources.* **5:** 15-21.
- Boggio SM, Hardy RW, Babbit JK, Brannon EL. 1985. **The influence of dietary lipid source and alphanatocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Aquaculture.* **51:** 13-24.

- Bonnet S, Haffray P, Blanc JM, Vallée F, Vauchez C, Fauré A, Fauconneau B. 1999. **Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*).** *Aquaculture*. **173**: 359-375.
- Børge D, Jon-Erik J, Bjarne OB. 2006. **Welfare in farmed fish.** Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Research. Norway. p. 103.
- Borum PR. 1983. **Carnitine.** *Annual Review of Nutrition*. **3**: 233-259.
- Boulanger Y. 1987. **Preliminary results on the growth of sterile rainbow trout (triploidy induced by a pressure shock) in fish culture.** *Proceedings of the Annual Meeting Aquaculture Association Canada*. **1**: 55-58.
- Brecka BJ, Wahl DH, Hooe ML. 1996. **Growth, survival and body composition of largemouth bass fed various commercial diets and protein concentrations.** *The Progressive Fish Culturist*. **58**: 104-110.
- Breet JR. 1979. **Environmental factors and growth.** In: Hoar WS, Randall DJ, Breet JR, (Eds), *Fish Physiology*. Academic Press, New York. **8**: 599-675.
- Bremer I and Davis EJ. 1978. **The effect of acylcarnitines on the oxidation of branched chain-keto acids in mitochondria.** *Biochemistry and Biophysics Acta*. **528**: 269-275.
- Bremer J. 1983. **Carnitine-metabolism and functions.** *Physiological Reviews*. **63**: 1420-1480.
- Bromage N, Porter M, Randall C. 2001. **The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin.** *Aquaculture*. **197**: 63-98.
- Broquist HP. 1994. **Carnitine.** In: Shils ME, Olson JA, Shike M, (Eds), *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Bruno DW and Johnstone R. 1990. **Susceptibility of diploid and triploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. to challenge by *Renibacterium salmoninarum*.** *Bulletin of the European Association of Fish Pathology*. **10**: 45-47.
- Burtle GJ and Liu Q. 1994. **Dietary carnitine and lysine affect channel catfish lipid and protein composition.** *Journal World Aquaculture Society*. **25**: 169-174.

Bye VJ and Lincoln RF. 1986. **Commercial methods for the control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.).** *Aquaculture*. **57**: 299-309.

Carmichael GJ. 1984. **Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass.** *The Progressive Fish-Culturist*. **46**: 11-115.

Carr WES and Chaney TB. 1976. **Chemical stimulation of feeding behavior in the pinfish, *Lagodon rhomboides*: characterization and identification of stimulatory substances extracted from shrimp.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. **54A**: 437-441.

Carrasco L, Doroshov S, Penman DJ, Bromage N. 1998. **Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Journal of Reproduction and Fertility*. **113**: 197-210.

Carrillo M, Bayarri J, Zanuy S. 2007. **El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control de los ciclos sexuales y de la pubertad en la lubina.** In: Carrillo M, (Ed), La Reproducción de los peces: Aspectos básicos y su aplicación en Acuicultura. Observatorio Español de Acuicultura. Madrid.

Carter CG, McCarthy ID, Houlihan DF. 1994. **Food consumption, feeding behavior and growth of triploid and diploid Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr.** *Canadian Journal of Zoology*. **72**: 609-617.

Cassani JR, Caton WE. 1986. **Growth comparisons of diploid and triploid grass carp under varying conditions.** *The Progressive Fish Culturist*. **48**: 184-187.

Chatzifotis S, Takeuchi T, Seikai T. 1995. **The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea beam fingerlings.** *Fisheries Science*. **61**: 1004-1008.

Chatzifotis S, Takeuchi T, Seikai T. 1996. **The effect of dietary carnitine supplementation on growth of red sea bream (*Pagrus major*) fingerlings at two levels of dietary lysine.** *Aquaculture*. **147**: 235-248.

Chatzifotis S and Takeuchi T. 1997. **Effect of supplemental carnitine on body weight loss, proximate and lipid compositions and carnitine content of Red Sea bream (*Pagrus major*) during starvation.** *Aquaculture*. **158**: 129-140.

Chatzifotis S, Takeuchi T, Watanabe T, Satoh S. 1997 : **The effect of dietary carnitine supplementation on growth of rainbow trout fingerlings.** *Fisheries Science*. **63**: 321-322.

- Cherfas NB and Ilyasova VA. 1980. **Induced gynogenesis in hybrids of silver crucian carp with carp.** *Genetica*. **16**: 1260-1269.
- Chourrout D. 1982. **La gynogenèse chez les vertébrés.** *Reproduction Nutrition Development*. **22**: 713-734.
- Chourrout D, Chevassus B, Krieg F, Happe A, Burger G, Renard P. 1986. **Production of second generation of triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females: potential of tetraploid fish.** *Theoretical and Applied Genetics*. **72**: 193-206.
- Cotter D, O'Donovan V, O'Maoileidigh N, Rogan G, Roche N, Wilkins NP. 2000. **An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations.** *Aquaculture*. **186**: 61-75.
- Coulibaly A, Ouattara IN, Koné T, N'Douba V, Snoeks J, Gooré BiG, Kouamélan EP. 2007. **First results of floating cage culture of the African catfish *Heterobranchus longifilis*** Valenciennes, 1840: Effect of stocking density on survival and growth rates. *Aquaculture*. **263**: 61-67.
- Cowey CB, Adron JW, Hardy R, Smith JGM, Walton MJ. 1979. **Utilization by rainbow trout of diets containing partially rendered hide fleshings.** *Aquaculture*. **16**: 199-209.
- Crayhon R, 1998. In: Crayhon R, (Ed), *The Carnitine Miracle*. Evans and Company. New York. p. 240.
- Deshmukh DR and Rusk CD. 1988. **Failure of L-carnitine to protect mice against ammonia toxicity.** *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. **39**: 126-130.
- Dias J, Arzel J, Corraze G, Kaushik SJ. 2001: **Effects of dietary l-carnitine supplementation on growth and lipid metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*).** *Aquaculture Research*. **32**: 206-215.
- Donaldson EM and Hunter GA. 1982. **Sex control in fish with particular reference to salmonids.** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **39**: 99-110.
- Dorson M, Chevassus B, Torphy C. 1991. **Comparative susceptibility of three species of char and of rainbow trout x char triploid hybrids to several pathogenic salmonid viruses.** *Diseases of Aquatic Organisms*. **11**: 217-224.

- Dosanjh BS, Higgs DA, McKenzie DJ, Randall DJ, Eales JG, Rowshandeli N, Rowshandeli M, Deacon G. 1998. **Influence of dietary blends of menhaden oil and canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water.** *Fish Physiology and Biochemistry*. **19**: 123-134.
- Dunham RA. 1990. **Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture.** *Reviews in Aquatic Sciences*. **2**: 1-17.
- Dyer AR, Upton Z, Stone D, Thomas PM, Soole KL, Higgs N, Quinn K, Carragher JF. 2004. **Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effects of aquaculture stressors on circulating IGF-I levels.** *General and Comparative Endocrinology*. **135**: 268-275.
- Dzikowski R, Hulata G, Karplus I, Harpaz S. 2001: **Effect of temperature and dietary l-carnitine supplementation on reproductive performance of female guppy (*Poecilia reticulata*).** *Aquaculture*. **199**: 323-332.
- Ellis T, North B, Scott AP, Bromage NR, Porter M, Gadd D. 2002. **The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout.** *Journal of Fish Biology*. **61**: 493-531.
- Fagerlund UHM, McBride JR, Stone ET. 1981. **Stress-related effects of hatchery rearing density on coho salmon.** *Transactions of the American Fisheries Society*. **110**: 644-649.
- FAO, 2006. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2006.** FAO. Rome, Italy.
- FAO, 2008. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2008.** FAO. Rome, Italy.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. **Cultured Aquatic Species Information Programme *Oncorhynchus mykiss*.** [[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus mykiss](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus%20mykiss)] (acedido a 23/05/2009).
- Felip A, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M. 2001. **Comparative growth performance of diploid and triploid European sea bass over the first four spawning seasons.** *Journal of Fish Biology*. **58**: 76-88.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. 2001a. **Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species.** *Genetica*. **111**: 175-195.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M. 2006. **Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.).** *Aquaculture*. **256**: 570- 578.

- Feller AG and Rudman D. 1988. **Role of carnitine in human nutrition.** *Journal of Nutrition.* **118:** 541-547.
- FishBase, 2008. **A Global Information System on Fishes. *Oncorhynchus mykiss*.** [http://www.fishbase.org/home.htm] (acedido a 23/05/2008).
- Focken U, Becker K, Lawrence P. 1997. **A note on the effects of L-carnitine on the energy metabolism of individually reared carp, *Cyprinus carpio* L..** *Aquaculture Nutrition.* **3:** 261-264.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *Journal of Biological Chemistry.* **226:** 497-509.
- Fritz IB and Yue KTN. 1963. **Long chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine.** *Journal of Lipid Research.* **4:** 288-297.
- Froyland L, Madsen L, Eckhoff KM, Lie O, Berge RK. 1998. **Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltrans-ferase II, and acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*).** *Lipids.* **33:** 923-930.
- Galbreath PF, St Jean W, Anderson V, Thorgaard GH. 1994. **Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon.** *Aquaculture.* **128:** 41-49.
- Galbreath PF and Thorgaard GH. 1995. **Saltwater performance of all-female triploid Atlantic salmon.** *Aquaculture.* **138:** 77-85.
- Gaylord TG and Gatlin DM. 2000a: **Effects of dietary carnitine and lipid on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂).** *Fish Physiology and Biochemistry.* **22:** 297-302.
- Gaylord TG and Gatlin DM. 2000b: **Dietary lipid level but not l-carnitine affects growth performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*).** *Aquaculture.* **190:** 237-246.
- Gonçalves JF. 1998. **Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).** In: Maria Armanda Reis Henriques (Ed), Manual de Aquacultura. Porto. p. 96-114.
- Gulçin I. 2006. **Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine.** *Life Sciences.* **78:** 803-811.

- Gulewitsch W and Krimberg R. 1905. **Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung Über das Carnitin.** *Hoppe-Seyler's Z. Physiological Chemistry.* **45:** 326-330.
- Guo X, Hershberger WK, Myers JM. 1990. **Growth and survival of intrastrain and interstrain rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) triploids.** *Journal of the World Aquaculture Society.* **21:** 250-256.
- Habicht C, Seeb JE, Gates RB, Brock IR, Olito CA. 1994. **Triploid coho salmon outperform diploid and triploid hybrids between coho salmon and chinook salmon during their first year.** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* **51:** 31-37.
- Hanley F. 1991. **Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.).** *Aquaculture.* **93:** 323-334.
- Harpaz S. 2005. **L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition – A Review.** *Aquaculture.* **249:** 3-21.
- Harpaz S, Becker K, Blum R. 1999: **The effect of dietary l carnitine supplementation on cold tolerance and growth of ornamental cichlid fish (*Pelvicachromis pulcher*).** *Journal of Thermal Biology.* **24:** 57-62.
- Harrel RM, Van Heukelem W, Kerby JH. 1998. **A comparison of triploid induction validation techniques.** *The Progressive Fish Culturist.* **60:** 221-226.
- Hathcock JN and Shao A. 2006. **Risk assessment for carnitine.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **46:** 23-28.
- Henderson RJ and Tocher DR. 1987. **The lipid composition and biochemistry of freshwater fish.** *Progressive Lipid Research.* **26:** 281-347.
- Henderson RJ and Sargent JR. 1985. **Chain length specificities of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Comparative Biochemistry and Physiology.* **82(B):** 79-85.
- Hussain MG, Chatterji A, McAndrew BJ, Johnstone R. 1991. **Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks.** *Theoretical and Applied Genetics.* **81:** 6-12.

- Hussain MG, Rao GSP, Humayun NM, Randall CF, Penman DJ, Kime D, Bromage NR, Myers JM, McAndrew BJ. 1995. **Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L.** *Aquaculture*. **138**: 87-97.
- Igarashi MA. 2008. **Cultivo de truta. Centro de Tecnologia em Aquicultura.** [<http://www.geocities.com/ctaufc/>] (acedido a 23/05/2008).
- Ihssen PE, McKay LR, McMillan I, Phillips RB. 1990. **Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes: cytogenetic and fisheries applications.** *Transactions of the American Fisheries Society*. **119**: 698-717.
- Inada Y, Yoshimura K, Tangushi N. 1990. **Study of the resistance to vibriosis in induced triploid ayu *Plecoglossus altivelis*.** *Nippon Suisan Gakkaishi*. **56**: 1587-1591.
- Infante JP and Huszagh VA. 2000. **Secondary carnitine deficiency and impaired docosahexaenoic (22:6n-3) acid synthesis: a common denominator in the pathophysiology of diseases of oxidative phosphorylation and beta-oxidation.** *FEBS Letters*. **469**: 1-5.
- Izquierdo MS. 1996. **Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae.** *Aquaculture Nutrition*. **2**: 183-191.
- Jayaprakas V, Sambhu C, Sunil kumar S. 1996. **Effect of dietary L-carnitine on growth and reproductive performance of male *Oreochromis mossambicus* (Peters).** *Fishery Technology*. **33**: 84-90.
- Ji H, Bradley TM, Tremblay GC. 1996: **Atlantic salmon (*Salmo solar*) fed L-carnitine exhibit altered intermediary metabolism and reduced tissue lipid, but no change in growth rate.** *Journal of Nutrition*. **126**: 1937-1950.
- Johnson RM, Shrimpton JM, Heath JW, Heath DD. 2004. **Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Aquaculture*. **234**: 123-142.
- Johnston IA, Strugnell G, McCracken ML, Johnstone R. 1999. **Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon.** *The Journal of Experimental Biology*. **202**: 1991-2016.
- Johnstone R, Knott RM, McDonald AG, Walsingham V. 1989. **Triploidy induction in recently fertilized Atlantic salmon ova using anaesthetics.** *Aquaculture*. **78**: 229-236.

- Johnstone R, Simpson TH, Yougson AF. 1978. **Sex reversal in salmonid culture.** *Aquaculture*. **13**: 115-34.
- Jorgensen EH, Christiansen JS, Jobling M. 1993. **Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr *Salvelinus alpinus*.** *Aquaculture*. **110**: 191-204.
- Juliet PA, Balasubramaniam D, Balasubramaniam N, Panneerselvam C. 2003. **Carnitine: a neuromodulator in aged rats.** *Journals of Gerontology Series A: Biological and Medical Sciences*. **58**: 970-4.
- Jungalwalla PJ. 1991. **Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania.** *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. **1789**: 47-57.
- Jurado GA. 1987. **Genética en acuicultura**, CAYCIT.
- Kebus MJ, Collins MT, Brownfield MS, Kayes TB, Malison JA. 1992. **Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout.** *Journal of Aquatic Animal Health*. **4**: 1-6.
- Kerby JH, Everson JM, Harrel RM, Geiger JG, Starling CC, Revels H. 2002. **Performance comparisons between diploid and triploid sunshine bass in fresh water ponds.** *Aquaculture*. **211**: 91-108.
- Keshavanath P and Renuka P. 1998. **Effect of dietary l-carnitine on growth and body composition of fingerling rohu, *Labeo rohita* (Hamilton).** *Aquaculture Nutrition*. **4**: 83-87.
- Kiessling KH and Kiessling A. 1993. **Selective utilization of fatty-acids in rainbow-trout (*Oncorhynchus-mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria.** *Canadian Journal of Zoology*. **71**: 248-251.
- Kime DE. 1987. **The steroids.** In: Chester-Jones I, Ingleton P, Phillips JG, (Eds), *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*. Plenum Press. New York. p. 3-56.
- Kusuda RK, Salati F, Hamaguchi M, Kawai K. 1991. **The effect of triploidy on phagocytosis, leucocyte migration, antibody and complement levels of ayu, *Plecoglossus altivelis*.** *Fish and Shellfish Immunology*. **1**: 243-249.
- Lawson TB. 1995. **Fundamentals of aquacultural engineering.** New York: Chapman & Hall, p. 355.

- Lazo JP, Davis DA, Arnold CR. 1998. **The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*).** *Aquaculture*. **169**: 225-232.
- Lee DJ, Putnam GB. 1973. **The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet.** *Journal Nutrition*. **103**, 916-922.
- Leggatt RA and Iwama GK. 2003. **Occurrence of polyploidy in the fishes.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **13**: 237-246
- Li BUK, Lloyd ML, Gudjonsson H, Shug AL, Olsen WA. 1992. **The effect of enteral carnitine administration in humans.** *American Journal of Clinical Nutrition*. **55**: 838-845.
- Liebert AM and Shreck CB. 2006. **Effect of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-I, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation.** *General and Comparative Endocrinology*. **148**: 195-202.
- Lilyestrom CG, Wolters WR, Bury D, Rezk M, Dunham RA. 1999. **Growth, carcass traits, and oxygen tolerance of diploid and triploid catfish hybrids.** *North American Journal of Aquaculture*. **61**: 293-303.
- Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, Melo DC. 2006. **Stress in fishes.** *Revista brasileira de reprodução animal*. **30**: 113-117.
- Lincoln RF and Scott AP. 1983. **Production of all-female rainbow trout.** *Aquaculture*. **30**: 375-380.
- Linhart O, Flajshans M, Kvasnicka P. 1991. **Induced triploidy in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): a comparison of two methods.** *Aquatic Living Resources*. **4**: 139-145.
- Liu S, Sezaki K, Hashimoto K, Kobayasi H, Nakamura M. 1978. **Simplified techniques for determination of polyploidy in *Ginbuna Carassius auratus langsdorffii*.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **44**: 601-606.
- Lohninger A, Kaiser E, Legenstein E, Staniek H. 1987. **Carnitine, metabolism and function.** In: Kaiser E, Lohninger A, (Eds), *Carnitine-Its Role in Lung and Heart Disorders*. Karger Press. Basel. p. 1-25.
- Lou YD and Purdom CE. 1984. **Polyploidy induced by hydrostatic pressure in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.** *Journal of Fish Biology*. **25**: 345-351.

- Luckenbach JA, Godwin J, Daniels HV, Beasley JM, Sullivan CV, Borski RJ. 2004. **Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm.** *Aquaculture*. **237**: 499-516.
- Lysiak W, Lilly K, DiLisa F, Totb PP, Bieber L. 1988. **Quantification of the effect of L-carnitine on the levels of acid-soluble short-chain acyl-CoA and CoASH in rat heart and liver mitochondria.** *Journal of Biological Chemistry*. **263**: 1151-1156.
- Ma JJ, Xu ZR, Shao QJ, Xu JZ, Hung SilasSO, Hu WL, Zhuo LY. 2008: **Effect of dietary supplemental L-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*.** *Aquaculture Nutrition*. **14(5)**: 464-471.
- Maccrimm Hr. 1971. **World distribution of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. **28**: 663–704.
- Machado TM, Rigolino MG, Tabata YA. 2007. **Manejo reprodutivo da truta arco-íris.** Estação Experimental de Salmonicultura de Campos do Jordão. Brasil.
- Malison JA, Procarione LS, Held JA, Kayes TB, Amudson CH. 1993. **The influence of triploidy and heat and hydrostatic shocks on the growth and reproductive development of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*).** *Aquaculture*. **116**: 121-133.
- Markwell MKA and Bieber LL. 1976. **Localization and solubilization of a rat liver microsomal carnitine acetyltransferase.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **172**: 502-509.
- Maxime V. 2008. **The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish.** *Fish and Fisheries*. **9**: 67-78.
- McCarthy ID, Carter CG, Houlihan DF, Johnstone R, Mitchell AI. 1996. **The performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon smolts on transfer together to sea water.** *Journal of Fish Biology*. **48**: 545-548.
- McCormick SD, Shrimpton JM, Carey JB, O'Dea MF, Sloan KE, Moriyama S, Björnsson BTh. 1998. **Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol.** *Aquaculture*. **168**: 221–235.
- McDowell LR. 1989. **Vitamin-like substances.** In: McDowell LR, (Ed), *Vitamins in Animal Nutrition Comparative Aspects to Human Nutrition*. Academic Press Inc. New York. p. 388-399.

- McGeachy SA, Benfey TJ, Friars GW. 1995. **Freshwater performance of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) in New Brunswick aquaculture.** *Aquaculture*. **137**: 333-341.
- McGeachy SA, O'Flynn FM, Benfey TJ, Friars GW. 1996. **Seawater performance of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) in New Brunswick.** *Bulletin of the Aquaculture Association Canada*. **96**: 24-28.
- Miyasaki T, Sato M, Yoshinaka R, Sakaguchi M. 1994. **Determination of free and esterified carnitine in tissues of rainbow trout by high-performance liquid chromatography.** *Fisheries Science*. **60**: 225-227.
- Mol K, Byamungu N, Cuisset B, Yaron Z, Ofir M, Mélard C, Castelli M, Kühn ER. 1994. **Hormonal profile of growing male and female diploids and triploids of the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, reared in intensive culture.** *Fish Physiology and Biochemistry*. **13**: 209-218.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. 1999. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **9**: 211-268.
- Mommsen TP and Walsh PJ. 1992. **Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes.** *Experientia*. **48**, 583-593.
- Montero D, Izquierdo MS, Tort L, Robaina L, Vergara JM. 1999. **High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles.** *Fish Physiology and Biochemistry*. **20**: 53-60.
- Mugrditchian DS, Hardy RW, Iwaoka WT. 1981. **Linseed oil and animal fat as alternative lipid sources in dry diets for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Aquaculture*. **25**: 161-172.
- Myers JM. 1991. **Triploid incubation and growth performance: a comparison of meiotic and interploid triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inter- and intrastain crosses.** Dissertation Abstracts International, Part B, Sciences and Engineering. **51**: 151.
- Myers JM and Hershberger WK. 1991. **Early growth and survival of heat-shocked and tetraploid-derived triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.** *Aquaculture*. **96**: 97-107.
- Na-Nakorn U and Lakhaanantakun A. 1993. **Comparison between the performance of diploid and triploid *Clarias macrocephalus*.** *Fish Genetics*. **52**: 79-86.

- Nelson DL and Cox MM. 2000. **Lipids**. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York. p. 363-375. Worth Publishers.
- North BP, Ellis T, Turnbull JF, Davis J, Bromage NR. 2006. **Stocking density practices of commercial UK rainbow trout farms**. *Aquaculture*. **259**: 260-267.
- O'Connor JE, Costell M, Grisolia S. 1984. **Protective effect of L-carnitine on hyperammonemia**. *FEBS Letter*. **166**: 331-334.
- O'Flynn FM, McGeachy SA, Friars GW, Benfey TJ, Bailey JK. 1997. **Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. *ICES Journal of Marine Science*. **54**: 1160-1165.
- Ojolick EJ, Cusack R, Benfey TJ, Kerr SR. 1995. **Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature**. *Aquaculture*. **131**: 177-187.
- O'Keefe RA and Benfey TJ. 1999. **Comparative growth and food consumption of diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*) monitored by radiography**. *Aquaculture*. **175**: 111-120.
- Oliva-Teles A and Kaushik SJ. 1990a. **Effect of temperature on utilization of endogenous energy reserves during embryonic development of diploid and triploid rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)**. *Aquaculture*. **84**: 373-382.
- Oppedal F, Taranger GL, Hansen T. 2003. **Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod**. *Aquaculture*. **215**: 145-162.
- Ozório ROA. 2001: **Dietary L-carnitine and energy and lipid metabolism in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles**. PhD thesis nº 3092. Wageningen University, Hollanda.
- Ozório ROA. 2009. **Dietary L-Carnitine Supplementation to Cultivated Fish: A Mini-Review**. *Current Nutrition & Food Science*. **5(1)**: 40-48.
- Ozório ROA, Booms GHR, Huisman EA, Verreth JAJ. 2002. **Changes in amino acid composition in the tissues of African catfish (*Clarias gariepinus*) as a consequence of dietary L-carnitine supplements**. *Journal of Applied Ichthyology*. **18**: 140-147.

Ozório ROA, Uktoseja JLA, Huisman EA, Verreth JAJ. 2001b. **Changes in fatty acid concentrations in tissues of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell), as a consequence of dietary carnitine, fat and lysine supplementation.** *British Journal of Nutrition*. **86**: 623-636.

Ozório ROA, Van Eekeren THB, Huisman EA, Verreth JAJ. 2001a. **Effects of dietary carnitine and protein energy: nonprotein energy ratios on growth, ammonia excretion and respiratory quotient in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) juveniles.** *Aquaculture Research*. **32**: 406-414.

Ozório ROA, Verreth JAJ, Aragão CR, Vermeulen CJ, Schrama JW, Verstegen MWA, Huisman EA. 2003. **Dietary carnitine supplements increased lipid metabolism and decreased protein oxidation in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles fed high fat levels.** *Journal Aquaculture in the Tropics* **18**: 225-238.

Pankhursts N and Kraak G. 1997. **Effects of stress on reproduction and growth of fish.** In: Iwama G, Pickering A, Sumpter C, Schreck C (Ed), *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 278. (Society for Experimental Biology Seminar Series; 62).

Pankhurst NW and Van Der Kraak G. 1997. **Effects of stress on growth and reproduction.** In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB (Eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 73-93.

Paspatis M, Boujard T, Maragoudaki D, Blanchard G, Kentouri M. 2003. **The stocking density and feed reward level affect growth and feeding of self-fed juvenile European sea bass?** *Aquaculture*. **216**: 103-113.

Peruzzi S and Chatain B. 2000. **Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability.** *Aquaculture*. **189**: 23-37.

Peruzzi S, Chatain B, Saillant E, Haffray P, Menu B, Falguière JC. 2004. **Production of meiotic gynogenetic and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Performances, maturation and carcass quality.** *Aquaculture*. **230**: 41-64.

Pickering AD. 1981. **Stress and fish.** Academic Press. London. GB. p. 365.

Pickering AD. 1993. **Growth and stress in fish production.** *Aquaculture*. **111**: 51-63

- Pickering AD and Pottinger TG. 1989. **Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol.** *Fish Physiology and Biochemistry*. **7**: 253-258.
- Pickering AD and Pottinger TG. 1995. **Biochemical effects of stress.** In: Hochachka PW, Mommsen TP (Eds), *Environmental and ecological biochemistry*. Elsevier. Amsterdam. p. 349-379.
- Piferrer F. 2001. **Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish.** *Aquaculture*. **197**: 229-281.
- Piferrer F. 2007. **Determinación y diferenciación sexual de los peces y su control en acuicultura.** In: Carrillo M, (Ed), *La Reproducción de los peces: Aspectos básicos y su aplicación en Acuicultura*. Observatorio Español de Acuicultura. Madrid.
- Piferrer F, Benfey TJ, Donaldson EM. 1994a. **Production of female triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by pressure shock and direct estrogen treatment.** *Aquatic Living Resources*. **7**: 127-131.
- Piferrer F, Cal RM, Gómez C, Bouza C, Martínez P. 2003. **Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*). II. Effects of cold shock timing and induction of triploidy in a large volume of eggs.** *Aquaculture*. **220**: 821-831.
- Piferrer F and Donaldson EM. 1988. **Progress in the development of sex control techniques for the culture of Pacific salmon.** In: *Aquaculture International Congress e Exposition, Vancouver, Proceedings*. Vancouver. p. 316-26.
- Pottinger TG and Carrick TR. 1999. **Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding.** *General and Comparative Endocrinology*. **116**: 122-132.
- Pottinger TG, Pickering AD, Hurley MA. 1992. **Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Aquaculture*. **103**: 275-289.
- Procarione L, Barry TP, Malison JA. 1999. **Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout.** *North American Journal of Aquaculture*. **61**: 91-96.
- Pulsford AL, Lemaire-Gony S, Tomlinson M, Collingwood N, Glynn PJ. 1994. **Effects of acute stress on the immune system of the dab (*Limanda limanda*).** *Comparative Biochemistry and Physiology*. **109(C)**: 129-139.

- Quillet E and Gaignon JL. 1990. **Thermal induction of gynogenesis and triploidy in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their potential interest for aquaculture.** *Aquaculture*. **89**: 351-364.
- Quin JG, Fast AW, Ako H. 1998. **Growth performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*.** *Aquaculture*. **89**: 351-364.
- Rabie MH and Szilágyi M. 1998. **Effects of L-carnitine supplementation of diets differing in energy levels on performance, abdominal fat content, and yield and composition of edible meat of broilers.** *British Journal of Nutrition*. **80**: 391-400.
- Raes K, Smet S, Demeyer D. 2001. **Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids.** *Animal Science*. **73**: 253-260.
- Rasmussen RS and Morrissey MT. 2007. **Biotechnology in aquaculture: transgenics and Polyploidy.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **6**: 2-16.
- Rebouche CJ. 1983. **Effect of dietary carnitine isomers and gamma-butyrobetaine on L-carnitine biosynthesis and metabolism in the rat.** *Journal of Nutrition*. **113**: 1906-1913.
- Rebouche CJ. 1998. **Carnitine.** In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, (Eds), *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th edition. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. p. 505-512.
- Rebouche CJ and Seim H. 1998. **Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals.** *Annual Review of Nutrition*. **18**: 39-61.
- Refstie T. 1977. **Effect of density on growth and survival of rainbow trout.** *Aquaculture*. **11**: 329-334.
- Refstie T and Kittelsen A. 1976. **Effect of density on growth and survival of artificially reared Atlantic salmon.** *Aquaculture*. **8**: 319-326.
- Refstie T, Vassvik V, Gjerdem T. 1977. **Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B.** *Aquaculture*. **10**: 65-74.
- Rodehutscord M. 1995. **Effects of supplemental dietary L-carnitine on the growth and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high-fat diets.** *Journal Animal Physiology Animal Nutrition*. **73**: 276-279.

- Rodrigues B, Seccombe D, McNeill JH. 1990. **Lack of effect of oral L-carnitine treatment on lipid metabolism and cardiac function in chronically diabetic rats.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **68**: 1601-1608.
- Rotllant J, Balm PHM, Ruane NM, Pérez-Sánchez J, Wendelaar Bonga SE, Tort L. 2000. **Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and α -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropinreleasing hormone.** *General and Comparative Endocrinology*. **119**: 152-163.
- Rotzsch W. 1996. **Carnitine: Pathobiochemical Basics and Clinical Application.** In: Seim H, Löster H, (Ed), Ponte Press. Bochum. p. 111-121.
- Sadler J, Pankhurst NW, Pankhurst PM, King HR. 2000a. **Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon.** *Journal of Fish Biology*. **56**: 506-518.
- Sadler J, Pankhurst PM, King HR. 2001. **High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Aquaculture*. **198**: 369-386.
- Sadler J, Wells RMG, Pankhurst PM, Pankhurst NW. 2000b. **Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*.** *Aquaculture*. **184**: 349-361.
- Santulli A and D'Amelio V. 1986a. **Effects of supplemental dietary carnitine on growth and lipid metabolism of hatchery-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.).** *Aquaculture*. **59**: 177-186.
- Santulli A and D'Amelio V. 1986b. **The effects of carnitine on the growth of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. fry.** *Journal of Fish Biology*. **28**: 81-86.
- Santulli A, Modica A, Curatolo A, D'Amelio V. 1988. **Carnitine administration to sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during feeding on a fat diet: modification of plasma lipid levels and lipoprotein pattern.** *Aquaculture* **68**: 345-351.
- Santulli A, Puccia E, D'Amelio V. 1990. **Preliminary study on the effect of short-term carnitine treatment on nucleic acids and protein metabolism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fry.** *Aquaculture*. **87**: 85-89.

- Sargent JR, Henderson RJ, Tocher DR. 1989. **The lipids**. In: Halve JE, (Ed), Fish Nutrition. Academic Press. San Diego, CA. p. 153-219.
- Schlechtriem C, Bresler V, Fishelson L, Rosenfeld M, Becker K. 2004. **Protective effects of dietary l-carnitine on tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) reared under intensive pond-culture conditions**. *Aquaculture Nutrition*. **10**: 55-63.
- Schreck CB. 1981. **Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors**. In: Pickering AD, (Ed), Stress and fish. Academic Press. London. p. 295-321.
- Schreck CB. 1990. **Physiological, behavioural, and performance indicators of stress**. *American Fisheries Society*. **8**: 29-37.
- Schreck CB. 1997. **Immunomodulation: endogenous factors**. In: Iwama GK, Nakanishi T, (Eds), The fish Immune System; Organism, Pathogen and Environment. Academic Press. San Diego. p. 311-317.
- Schreck CB, Olla BL, Davis MW. 1997. **Behavioral responses to stress**. In: Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP, Schreck CB, (Eds), Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge. p. 145-170.
- Schreiber S, Becker K, Bressler V, Fishelson L. 1997. **Dietary L-carnitine protects the gills and skin of guppies (*Poecilia reticulata*) against anionic xenobiotics**. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **117C**: 99-102.
- Segato S, Bertotto D, Fasolato L, Francescon A, Barbaro A, Corato A. 2006. **Effects of triploidy on feed efficiency, morphometric indexes and chemical composition of shi drum, *Umbrina cirrosa* L.** *Aquaculture Research*. **37**: 71-77.
- Sezaki K, Watabe S, Hashimoto K. 1983. **A comparison of chemical composition between diploids and triploids of “Ginbuna” *Carassius auratus* Langsdorfi**. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*. **49**: 97-101.
- Sinatra ST and Sinatra J. 1999. **L-Carnitine and the Heart**. McGraw Hill. New York. p. 64.
- Skonberg DI, Rasco BA, Dong FM. 1994. **Fatty acid composition of salmonid muscle changes in response to high oleic acid diet**. *Journal Nutrition*. **124**: 1628-1638.
- Smith LT and Lemoine HL. 1979. **Colchicine induced polyploidy in brook trout**. *The Progressive Fish Culturist*. **41**: 311-319.

- Solar II, Donaldson EM, Hunter A. 1984. **Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by heat shock, and investigation of early growth.** *Aquaculture*. **84**(2): 57-67.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. **Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*).** *Nature*. **291**: 293-296.
- Sugama K, Tanigushi N, Seki S, Nabeshima H. 1992. **Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *Pagrus major* (Temminck and Schlegel): use of allozyme markers for ploidy and family identification.** *Aquaculture and Fisheries Management*. **23**: 149-159.
- Sumpter JP, Dye HM, Benfey TJ. 1986. **The effects of stress on plasma ACTH, α -MSH, and cortisol levels in salmoid fishes.** *General and Comparative Endocrinology*. **62**: 377-385.
- Suresh AV and Sheehan RJ. 1998a. **Muscle fibre growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout.** *Journal of Fish Biology*. **52**: 570-587.
- Sutterlin AM, Holder J, Benfey TJ. 1987. **Early survival and subsequent morphological deformities in landlocked, anadromous, and hybrid (landlocked x anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon.** *Aquaculture*. **64**: 157-164.
- Swarup H. 1959a. **Production of triploidy in *Gasterosteus aculeatus* (L).** *Journal of Genetics*. **56**: 129-141.
- Swarup H. 1959b. **Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L.).** *Journal of Genetics*. **56**: 141-155.
- Tabata YA, Rigolino MG, Tsukamoto RY. 1999. **Produção de lotes monossexos femininos triplóides de Truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Salmonidae). III – Crescimento até idade de primeira maturação sexual.** Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo. **25**: 67-76.
- Taylor JF, Needham MP, North BP, Morgan A, Thompson K, Migaud H. 2007. **The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout.** *General and Comparative Endocrinology*. **152**: 314-325.
- Thangasamy T, Subathra M, Sittadjody S, Jeyakumar P, Joyee AG, Mendoza E, Chinnakkanu P. 2007. **Role of L-carnitine in the modulation of immune response in aged rats.** *Clinica Chimica Acta*. **389**: 19-24.

- Thompson I, White A, Fletcher TC, Houlihan DF, Secombes CJ. 1993. **The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C.** *Aquaculture*. **114**: 1-18.
- Thorgaard GH. 1983. **Chromosome set manipulation and sex control in fish.** In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM, (Eds), *Fish Physiology*, Vol. IX, Part B. Academic Press. New York. p. 405-434.
- Thorgaard GH. 1986. **Ploidy manipulation and performance.** *Aquaculture*. **57**: 57-64.
- Thorgaard GH and Gall GAE. 1979. **Adult triploids in a rainbow trout family.** *Genetics*. **93**: 961-973.
- Thorgaard GH, Rabinovitch PS, Wentang SM, Gall GA, Propp J, Utter FM. 1982. **Triploid rainbow trout identified by flow cytometry.** *Aquaculture*. **29**: 305-309.
- Thorpe JE. 2004. **Life history responses of fishes to culture.** *Journal of Fish Biology*. **65**: 263-285.
- Tiwarý BK, Kirubaran R, Ray AK. 2004. **The biology of triploid fish.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. **14**: 391-402.
- Tiwarý BK and Ray AK. 2004. **Alterations in air-sac and skeleton of triploid *Heteropneustes fossilis*.** *Journal of Fish Biology*. **64**: 268-272.
- Toledo-Filho SA, Foresti F, Almeida-Toledo LF. 1996. **Biotechnologia Genética Aplicada à Piscicultura.** *Caderno de Ictiogenética*. **3**: 1-30.
- Torreele E, Van Der Sluiszen A, Verreth J. 1993. **The effect of dietary L-carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid.** *British Journal of Nutrition*. **69**: 289-299.
- Tremblay GC and Bradley TM. 1992. **L-Carnitine protects fish against acute ammonia toxicity.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. **101C**: 349-351.
- Twibell RG and Brown PB. 2000. **Effects of dietary carnitine on growth rates and body composition of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* male x *M. chrysops* female).** *Aquaculture*. **187**: 153-161.

- Varadaraj K and Pandian TJ. 1988. **Induction of triploids in *Oreochromis mossambicus* by thermal, hydrostatic pressure and chemical shocks.** Proceedings of the Aquaculture International Congress Expo. p. 531-535.
- Vazzana M, Cammarata M, Cooper EL, Parrinello N. 2002. **Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity.** *Aquaculture*. **210**: 231-243.
- Ueda T, Sato R, Kobayashi J. 1988. **Triploid rainbow trout induced by high pH multiplied by high calcium.** *Nippon Suisan Gakkaishi*. **54**: 20-45.
- Urbitali EC, Baccarin AE, Pezzato LE. 2000. **Efeito da alimentação com levedura desidratada de álcool na glicemia e nos níveis de glicogênio e lípidos totais hepáticos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Boletim do Instituto de Pesca. **26**: 163-167.
- Wedemeyer GA. 1976. **Physiological response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture.** *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. **33**: 2699-2702.
- Wedemeyer GA, Barton B, Mc Leay D. 1990. **Stress and acclimation.** In: Schreck C, Moyle P. (Ed), *Methods for fish biology*. MD: American Fisheries Society. Bethesda. p. 451-489.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. **The stress response in fish.** *Physiological Reviews*. **77**: 591-625.
- Wicks BJ and Randall DJ. 2002. **The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Aquatic Toxicology*. **59**: 71-82.
- Wilson RP. 2002. **Amino acids and proteins.** In: Halver JE, Hardy RW, (Eds), *Fish Nutrition*, 3th edition. Academic Press. San Diego, CA. p. 143-179.
- Withler RE, Beacham TD, Solar II, Donaldson EM. 1995. **Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).** *Aquaculture*. **136**: 91-107.
- Withler RE, Clarke WC, Blackburn J, Baker I. 1998. **Effect of triploidy on growth and survival of pre-smolt and post-smolt coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).** *Aquaculture*. **168**: 413-422.
- Wolters WR, Lilyerstrom CG, Craig RJ. 1991. **Growth, yield, and dress-out percentage of diploid and triploid channel catfish in earthen ponds.** *The Progressive Fish Culturist*. **53**: 33-36.

- Wood CM. 1993. **Ammonia and urea metabolism and excretion**. In: Evans DH, (Ed), *The Physiology of Fishes*. CRC Press. Boca Raton, FL. p. 379-425.
- Wynn JP and Ratledge C. 2000. **Evidence that the rate-limiting step for the biosynthesis of arachidonic acid in *Mortierella alpina* is at the level of the 18:3 to 20:3 elongase**. *Microbiology.UK*. **146**: 2325-2331.
- Yamamoto A and Iida T. 1994. **Oxygen consumption and hypoxic tolerance of triploid rainbow trout**. *Fish Pathology*. **29**: 245-251.
- Yamamoto A and Iida T., 1995a. **Non-specific activities of triploid rainbow trout**. *Fish Pathology*. **30**: 107-110.
- Yamamoto A and Iida T. 1995b. **Susceptibility of triploid rainbow trout to IHN, furunculosis and vibriosis**. *Fish Pathology*. **30**: 69-70.
- Yamamoto A and Iida T. 1995c. **Bactericidal activity of serum of all-female triploid rainbow trout**. *Fish Pathology*. **30**: 123-124.
- Yu TC and Sinnhuber RO. 1981. **Use of beef tallow as an energy source in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) rations**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **38**: 367-370.
- Yu TC, Sinnhuber RO, Putnam GB. 1977. **Effect of dietary lipids on fatty acid composition of body lipid in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)**. *Lipids*. **12**: 495-499.

7. ANEXOS

Anexo I – Determinação da Matéria Seca

Princípio: O teor em matéria seca de uma amostra é calculado pela variação de peso antes e após secagem numa estufa a 105°C, até obtenção de um peso constante.

Aparelhos:

Estufa - *Binder*

Excicador

Balança analítica

Material:

Cadinhos de porcelana/formas de alumínio (2 por amostra).

Número e quantidade de amostra:

Capacidade: 10-15 amostras por dia (incluindo os duplicados);

Amostra necessária: 1g de amostra (0,5-1g, no mínimo).

Procedimento:

- 1) Após a identificação dos cadinhos/formas de alumínio, secar na estufa durante 24 horas a 105°C e deixar arrefecer num excicador (cerca de 30min);
- 2) Pesar os cadinhos/formas de alumínio e registar os seus pesos;
- 3) Tarar os cadinhos/formas de alumínio e pesar 1g de amostra (0,5-1g, no mínimo);
- 4) De seguida, colocar os cadinhos/formas de alumínio com a amostra a secar na estufa, a 105°C durante 24h;
- 5) Após 24 horas na estufa, colocar os cadinhos/formas de alumínio no excicador durante cerca de 30min para arrefecer;
- 6) Pesar os cadinhos/formas de alumínio com amostra e registar os pesos (g);
- 7) Calcular:

$$\% \text{ MS} = \frac{\left[\text{Peso final do cadinho com amostra (após 24h a 105°C)} \right] - \left[\text{Peso do cadinho vazio} \right]}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

Anexo II – Determinação das Cinzas

Princípio: O teor em cinzas de uma amostra é calculado pela variação de peso antes e após incineração numa mufla a 500°C, até obtenção de um peso constante.

Aparelhos:

Mufla - Nabertherm

Excicador

Estufa

Balança analítica

Material:

Cadinhos de porcelana/formas de alumínio (2 por amostra).

Quantidade de amostra:

Capacidade: 10 amostras por dia (com duplicados);

Amostra necessária: 0,5-1g de material liofilizado.

Procedimento:

- 1) Identificar os cadinhos/formas de alumínio e colocar a incinerar na mufla durante 30min a 500°C. Esperar que a temperatura da mufla atinja os 100°C e nessa altura retirar para o excicador até arrefecerem (± 30 min);
- 2) Pesar os cadinhos/formas de alumínio e registar os seus pesos;
- 3) Tarar os cadinhos/formas de alumínio e pesar 1g de amostra (0,5-1g, no mínimo); tentar homogeneizar bem a amostra antes de pesar; cada amostra é analisada em duplicado;
- 4) Colocar os cadinhos/formas de alumínio com a amostra a incinerar na mufla a 500°C durante pelo menos 5h; desligar a mufla;
- 5) Manter os cadinhos 24 horas na mufla desligada ou aguardar que esta atinja os 100°C e então colocar os cadinhos/formas de alumínio no excicador durante cerca de 30min;
- 6) Pesar os cadinhos/formas de alumínio com amostra e registar os pesos;
- 7) Calcular:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{Peso final do cadinho com a amostra} \\ \text{(após 5h a 500°C)} \end{array} \right] - \left[\text{Peso do cadinho vazio} \right]}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

Anexo III – Determinação da Gordura Bruta

Princípio: Quantificação dos lípidos totais de uma amostra através da sua extracção por um solvente orgânico (éter de petróleo).

Aparelhos:

Modelo: Soxtherm Multistat / SX PC
Marca: Gerhardt, Königswinter, Germany
Estufa - *Binder*
Excicador
Balança analítica

Material:

Copos de extracção e suporte
Cartuchos de filtro
Algodão hidrófilo

Reagentes:

Éter de petróleo (40-60°C) (Panreac 1.31315.1612)

Quantidade e número de amostras:

Capacidade: 4 amostras por dia (incluindo duplicados)

Amostra necessária: 1-1,5g de amostra liofilizada ou, se impossível, 0,5-1g de fezes liofilizadas.

Reagentes gastos por cada 10 amostras analisadas em duplicado:

Éter de petróleo – 2 litros

Procedimento:

- 1) Colocar os copos de extracção na estufa a 150°C durante cerca de 1 hora; Arrefecer no excicador durante 30min e pesar;
- 2) Ligar o aparelho “*Soxtherm Multistat*”, o compressor (para a posição 1) e a água e esperar até atingir a temperatura de 150°C;
- 3) Pesar cerca de 1-1,5g de amostra (0,5-1g de fezes) para os cartuchos de filtro, colocando por cima algodão hidrófilo;
- 4) Colocar os cartuchos devidamente, dentro dos copos de extracção;
- 5) Adicionar o éter de petróleo aos copos de extracção até ao colarinho dos copos ou até submergir completamente os cartuchos;

- 6) Colocar os copos no aparelho e fazer correr o programa já inserido;
- 7) No final da extracção (após 3 horas), retirar os copos e os cartuchos do aparelho;
- 8) Retirar o éter recuperado do aparelho usando a mangueira;
- 9) Colocar os copos de extracção na estufa a 105°C e deixar secar durante 1 hora;
- 10) Colocar os copos de extracção no excicador durante 30min e pesar;
- 11) Calcular:

$$\text{GB (\%MS)} = \frac{[(\text{Peso final do copo com a gordura}) \text{ após } 105^{\circ}\text{C} - \text{Peso do copo vazio}]}{\text{Amostra} \times \text{MS}} \times 100$$

Anexo IV – Determinação da Proteína Bruta por Combustão

Princípio: A determinação de nitrogénio total na forma de N₂ efectua-se através da combustão de uma pequena quantidade de amostra em oxigénio puro a altas temperaturas. O N₂ total é quantificado através de uma célula de condutividade térmica para nitrogénio, controlado por um microprocessador Leco FP-528 e convertido em proteína equivalente.

Aparelhos e Material:

Analizador de Azoto modelo FP-528, Leco, St. Joseph, USA;

Balança analítica;

Cápsulas de papel de estanho;

O₂ He e ar comprimido.

Quantidade e número de amostras:

Capacidade: Inúmeras amostras por dia (com duplicados ou triplicados);

Amostra necessária: 100 a 150mg de alimento ou carcaça; 80mg de fezes (neste caso usar a recta padrão definida para as fezes).

Procedimento:

- 1) Antes de proceder à análise de uma amostra, fazer um número elevado de brancos (± 10) até o valor estabilizar. No decorrer da análise, sempre que o instrumento fique parado mais de 10 minutos, proceder novamente à leitura de 1 ou 2 brancos;
- 2) Seleccionar os últimos 2 brancos e analisar o desvio padrão (STD) até este não afectar as amostras. Um desvio de 0,01 da % de nitrogénio corresponde aproximadamente a um desvio de 0,07 da % de proteína, sendo considerado um desvio aceitável para as amostras em causa;
- 3) Após estabilizar, calcular um novo branco: seleccionar esta última célula que apresenta o valor de branco mais estável e clicar em Menu – “Configuration – Blank – OK”. Esta correcção dos brancos deve ser feita sempre que se inicia um dia de trabalho, não é necessário fazer mais que uma por dia;
- 4) Pesar duas tomas com cerca de 100mg e outras duas com cerca de 150mg do padrão EDTA para copos de papel de estanho e enrolar;
- 5) De forma semelhante, pesar também entre 100 a 150mg das amostras de alimento ou carcaça. O peso só deverá ser anotado depois de se enrolar a cápsula;

- 6) Colocar a primeira cápsula com o EDTA no suporte próprio da FP-528 e primir o ícone “*F5 Analyse*” do programa para iniciar o processo de combustão, que dura cerca de 3min;
- 7) Seleccionar no programa as 4 amostras do padrão EDTA analisadas e verificar se a média e desvio da % de nitrogénio destas se encontram dentro dos limites recomendados ($9,57 \pm 0,03$). Se tal não se verificar, dever-se-à recorrer à ferramenta “drift” no Menu “Configuration – Drift – OK” para se executar a calibração;
- 8) De seguida, colocar as amostras encapsuladas que se pretendem analisar no suporte próprio da FP-528 e anotar os resultados (% Proteína);
- 9) Não esquecer de corrigir os valores para 100% de matéria seca.

$$\% \text{ Proteína (MS)} = \frac{\text{valor \% Proteína obtido no Leco}}{\% \text{ MS da amostra analisada}} \times 100$$

Anexo V – Determinação da Energia Bruta

Princípio: A energia libertada na combustão de 1g de alimento ou combustível é o seu poder calórico que pode ser determinado através de uma bomba calorimétrica adiabática.

Quantidade e número de amostras:

Capacidade: 10 amostras por dia (com duplicado);

Amostra necessária: 500mg de dietas, 500-700mg de fezes ou 100-150mg de fezes usando cápsulas de gelatina. Usar sempre a maior massa possível de amostra.

Aparelhos e Material:

- Sistema de calorimetria IKA C2000, IKA-Werke GMBH & CO.KG, Staufen, Germany;
- Prensa, IKA C21 e Balança analítica;
- Fio de algodão, Crisol de quartzo/aço e O₂.

Procedimento:

1) Ligar os aparelhos:

- a. Abrir registo da garrafa de O₂ (não mexer no registo do redutor);
- b. Ligar IKA K600 (unidade de aquecimento/arrefecimento de água);
- c. Ligar IKA C2000, esperar alguns minutos até aparecer no canto inferior esquerdo: waiting Ok for tests".

2) Preparação do recipiente de combustão

- d. Prensar a amostra na prensa IKA C21;
- e. Pesar a amostra dentro do crisol de quartzo/aço;
 - i. Se utilizar a cápsula de gelatina, esta deve ser primeiro pesada vazia e colocada no crisol para determinação da sua energia (passo c);
 - ii. Seguidamente pesar outra cápsula vazia e registar o seu peso; encher a cápsula com 100-500mg de amostra e registar o peso final (amostra + cápsula); colocar no crisol;
- f. Amarrar um fio de algodão no aro de ignição;
- g. Posicionar o crisol no aparador do crisol ("crucible holder");
- h. Posicionar o fio de algodão dentro do crisol de modo a contactar com a amostra para permitir a combustão desta. A colocação indevida do fio causará a falha da ignição e total combustão da amostra;

- i. Fechar o recipiente de combustão.

3) Combustão

- j. Premir o 2º botão “sample”, canto inferior do ecrã (Botão F2);
- k. Digitar peso da amostra (no caso da cápsula, introduzir o valor da energia desta, deduzido a partir do valor obtido com a cápsula vazia; registar em energia estranha 2);
- l. Premir a tecla OKAY, canto inferior direito (Botão nº 5);
- m. Colocar o recipiente de combustão com amostra na cabeça da tampa da bomba (opção 2 “filling head”);
- n. Premir “Start” (Botão F3), para iniciar o processo de combustão;
- o. Após aproximadamente 7min, a combustão está concluída;
- p. O resultado (J/g) apresentar-se-á no canto superior esquerdo do ecrã;
- q. Retirar o recipiente e purgar os gases de dentro do recipiente de combustão;
- r. Secar o recipiente de combustão utilizando papel absorvente e prepará-lo para reutilização com uma nova amostra.

**Anexo VI – Dosagem dos Lípidos Totais pelo Método de Folch
(Folch *et al.*, 1957)**

Princípio: Extracção dos lípidos totais pela trituração da amostra em solvente orgânico. O método aqui descrito serve para amostras de 2g, para amostras de tamanho superiores adaptar os volumes. Apesar de se poder usar os mesmos volumes, não é preciso usar proporções de amostra:solução superiores a 1:20.

Material:

- Triturador
- Bomba de vácuo
- Rotavapor-Buchi 461 Water Bath
- Centrífuga
- Excicador
- Balões de fundo redondo
- Provetas
- Pipetas de pasteur com tetina
- Filtros Whatmann GF/A
- Espátula e Funis
- Tubos de centrifuga de 50mL

Reagentes:

- Líquido de Folch (Diclorometano/Metanol (2V/1V) + 0,01% BHT)
- Diclorometano (VWR Prolabo N 1593)
- Metanol (MERCK 1.06009.2511)
- Solução de NaCl 0,73% (Dissolver em 1000mL de água destilada e desionizada 7,3g de NaCl)
- NaCl (MERCK 1.06404.0500)
- BHT (Sigma B-1378)
- Água destilada e desionizada

Procedimento:**1) Trituração da amostra em presença do líquido de Folch:**

- Pesar cerca de 2g de amostra (PA) e colocar no tubo de centrifuga;
- Adicionar 20mL de líquido de Folch;
- Triturar a mistura com o líquido de Folch com a ajuda de um triturador, durante 3min;
- Colocar os tubos num agitador durante cerca de 15min;
- Para separar o material sólido da solução de Folch, centrifugar os tubos a 2600rpm durante 10min;
- Filtrar a solução de Folch para outro tubo de centrifuga com a ajuda de um funil, com um filtro de Whatmman GF/A;
- Com a fracção sólida do primeiro tubo de centrifuga, repetir a extracção. Após repetição dos passos, no tubo de centrifuga onde se realizou a filtração deve estar cerca de 40mL de solução com o extracto lipídico, obedecendo à proporção de 1:20 de amostra para solução de Folch.

2) Separação em duas fases:

- Adicionar 20% do volume final de solução salina de NaCl 0,73% (8mL);
- Agitar e colocar na centrífuga durante cerca 15min a 2600rpm para separar as fases.

3) Separação, eliminação dos solventes:

- Pesar um balão de 50mL, P0;
- Rejeitar a fase superior com a ajuda de uma pipeta de pasteur e passar a fase inferior para o balão de fundo redondo;
- Eliminar o solvente com a ajuda de um rotavapor a 45Cº, utilizando o vácuo para eliminação de qualquer resíduo de solvente. Muito cuidado com a pressão do vácuo para não perder a amostra;
- Colocar os balões 24h no excicador;
- Pesar os balões contendo os lípidos, P1.

Cálculo da percentagem dos Lípidos:

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{(\text{Peso final do balão com os lípidos} - \text{Peso do balão vazio})}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

Anexo VII – Extracção de Ácidos gordos – Metilação Combinada
(Raes *et al.*, 2001)

Princípio: Transesterificação dos lípidos por acção do metanol na presença de um catalisador e por acção do calor para formação de ésteres metílicos. A análise dos ácidos gordos é realizada por cromatografia em fase gasosa após saponificação dos ácidos gordos e conversão destes sabões em ésteres metílicos voláteis. Os resultados normalmente são expressos em % de ácidos gordos totais. Podem também ser expressos em % de amostra mediante a utilização de um padrão interno.

Aparelhos:

Cromatógrafo gasoso (*Varian CP 3800 – Walnut Creek*)
Incubadora
Vórtex
Centrífuga
Corrente de azoto

Material:

Tubos de ensaio
Viais (1,5mL)
Pipetas de Pasteur
Pipetas graduadas

Reagentes e soluções:

Tolueno seco
Metóxido de sódio 0,5M (Solução 0,5mol/L em Metanol anidro)
Solução de ácido clorídrico 37%/Metanol (1V/1V)
n-Hexano com adição de 25mg/mL de BHT
n-Hexano para cromatografia gasosa
Sulfato de sódio anidro
Água ultrapura
Padrão interno, éster metílico C19:0 (1mg/mL em n-Hexano)

Procedimento:

- 1) Diluir a amostra (até 50mg de lípidos) em 1mL de Tolueno;
- 2) Adicionar 1mL de Padrão interno (1mg/mL) e 3mL de solução de Metóxido de sódio em Metanol anidro 0,5M e levar ao vórtex (10seg);
- 3) Colocar em banho de água a 50°C, durante 30min, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- 4) Adicionar 2mL de HCl/Metanol (1:1) e agitar no vórtex (10seg);
- 5) Colocar novamente em banho de água a 50°C, durante 10min, e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
- 6) No final da reacção, adicionar 2mL de água ultrapura;

- 7) Adicionar 3mL de n-Hexano, agitar no vórtex (10seg) e centrifugar durante 5min (2500rpm);
- 8) Recolher o sobrenadante para um novo tubo de ensaio, que já contenha 0,5g de sulfato de sódio anidro;
- 9) Repetir o passo 7, recolhendo o sobrenadante para o mesmo tubo do passo 8;
- 10) Agitar no vórtex (10seg) e centrifugar durante 5min (2500rpm) para separar a fase de hexano do sulfato de sódio anidro;
- 11) Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um novo tubo de ensaio e evaporar em corrente de azoto a 37°C;
- 12) Adicionar 1,5mL de n-Hexano para cromatografia gasosa, agitar no vórtex (10seg) e colocar num vial para levar ao cromatógrafo gasoso.

Anexo VIII – Determinação da Concentração de Cortisol (por RIA - Radioimunoensaio)

Aparelhos:

Contador 1275 MiniGamma – LKB

Incubadora

Vórtex

Kit:

Coat-A-Count Cortisol (100 tubos)

Procedimento:

Todos os componentes do Kit devem estar à temperatura ambiente (15-28°C) antes da sua utilização.

- 1) **Tubos lisos:** Rotular quatro tubos de polipropileno lisos (não revestidos) de 12×75mm com contagens totais (T) e ligação não-específica (NSB), em duplicado;

Tubos revestidos: Rotular doze tubos revestidos com anticorpos de cortisol com A (ligação máxima) e com B a F, em duplicado. Rotular, também em duplicado, mais tubos revestidos com anticorpos de cortisol para as amostras;

Calibradores	µg/dL	nmol/L
A	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1380

- 2) Pipetar 25µL do calibrador zero (A) para os tubos NSB e A, 25µL de cada calibrador restante para os tubos correspondentes a esses calibradores e 25µL de amostra para o respectivo tubo;
- 3) Adicionar 1mL de Cortisol ¹²⁵I a cada tubo e agitar no vórtex;
- 4) Incubar os tubos durante 45min a 37°C;
- 5) Decantar completamente o conteúdo de todos os tubos (à excepção dos tubos T), usando um dispositivo de decantação de espuma, e deixá-los drenar 2 ou 3min. De seguida, sacudir os tubos vigorosamente contra papel absorvente para eliminar todas as gotas residuais;
- 6) Colocar os tubos em suportes próprios e levar a contar, durante 1min por amostra, no Contador MiniGama.

Anexo IX – Ensaio de Amónia no Plasma

Aparelhos:

Leitor de Microplacas, Bio-Tek

Centrífuga

Vórtex

Agitador

Reagentes e soluções:

Ácido perclórico (PCA 8%)

TRIS saturado

Tampão TEA, 0,5mol/L/ADP, 1,82mmol/L/Ácido α -cetoglutárico, 35mmol/L; pH 8,0

β -NADH, 6mmol/L

Solução Reagente

Glutamato desidrogenase (GLDH)

TEA-HCl (0,5M)

NH₄Cl (0,1mol/L)

Padrões:

[Amónia] (mM)	Vol. de Solução Stock de amónia (10 mM) μ L	PCA 8% mL	TRIS saturado mL	Água MiliQ mL
P1 – 0	0	5	2,5	2,50
P2 – 0,05	50	5	2,5	2,45
P3 – 0,1	100	5	2,5	2,40
P4 – 0,15	150	5	2,5	2,35
P5 – 0,2	200	5	2,5	2,30
P6 – 0,25	250	5	2,5	2,25
P7 – 0,3	300	5	2,5	2,20
P8 – 0,35	350	5	2,5	2,15

Nota: A Solução Stock de amónia é 10x diluída da NH₄Cl (0,1 mol/L).

Procedimento:

Colheita e preparação da amostra

- 1) Adicionar em eppendorfs (1,5mL), 200 μ L de PCA 8% e 200 μ L de amostra de plasma (1:1), vórtexar, esperar 10min em gelo e vórtexar novamente;
- 2) Centrifugar durante 15min a 4°C e a 10000g, e pipetar cerca de 350 μ L de sobrenadante para um novo eppendorf (1,5mL);

- 3) Neutralizar o sobrenadante com cerca de 66,5µL de TRIS saturado a pH 7 e vórtexar;
- 4) Armazenar as amostras a -20°C, caso não sejam logo utilizadas.

Medição:

- 1) Após descongelar a amostra deve vórtexar muito bem;
- 2) Adicionar 100µL de cada Padrão, em triplicado, a cada poço da microplaca;
- 3) Adicionar 100µL de cada amostra, também em triplicado, a cada poço da microplaca;

Nota: A microplaca deve estar sobre gelo quando se adiciona os padrões e as amostras.

- 4) Adicionar 100µL da Solução Reagente anteriormente preparada a todos os poços e misturar vigorosamente a placa (2min);

Nota: Colocar a temperatura do laboratório a 25°C, pois é a temperatura óptima de reacção da enzima glutamato desidrogenase (GLDH).

- 5) Manter a placa durante 10min à temperatura da sala, posteriormente levar a vórtexar vigorosamente (1min) e, por fim, colocar a placa num leitor de microplacas e ler a absorvância a 340nm;
- 6) Depois retirar a placa do leitor de microplacas e adicionar 5µL da enzima diluída previamente, a todos os poços. Misturar a placa vigorosamente (2min), de seguida esperar durante 15min, à temperatura da sala. Por fim, colocar a placa novamente no leitor de microplacas e ler a absorvância a 340nm.

Anexo X – Determinação da Osmolalidade

Aparelho:

Micro-Osmómetro, automático tipo 15, Löser

Vórtex

Procedimento:

- 1) Inicialmente, calibrar o aparelho com os calibradores 0 (usar 100µL de água destilada) e 300 (usar 100µL de Padrão 300), uma vez que está-se a medir a osmolalidade em animais de água doce;
- 2) Após descongelar a amostra deve vórtex muito bem;
- 3) Medir a osmolalidade da amostra (em replicados), na qual deve colocar 100µL da respectiva amostra de plasma num eppendorf (1,5mL) e colocar este no Micro-Osmómetro;
- 4) Clicar no botão “Enter” e aguardar uns segundos pela medição da osmolalidade;
- 5) Anotar o resultado (mOsm).