

Tac. D/45

António Paulo Alves Ferreira de Carvalho

UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADÓS PROTEICOS
EM DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LARVAS DE
CARPA (*Cyprinus carpio*) E ROBALO (*Dicentrarchus labrax*)



Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

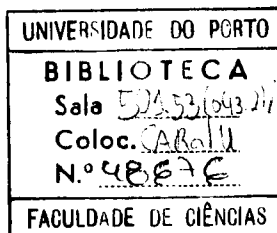
2000

António Paulo Alves Ferreira de Carvalho

UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS
EM DIETAS MICROPARTICULADAS PARA LARVAS DE
CARPA (*Cyprinus carpio*) E ROBALO (*Dicentrarchus labrax*)



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
para obtenção do grau de Doutor em Biologia*



Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2000

À minha esposa e à minha filha
Aos meus pais e aos meus irmãos

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas e instituições contribuíram, de algum modo, para a realização deste trabalho. A todos gostaria de expressar o meu sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Aires Oliva Teles, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela sua disponibilidade para orientar este trabalho e por todo o apoio que me concedeu ao longo da sua realização. Agradeço ainda particularmente o rigor com que sempre me procurou esclarecer, bem como a frontalidade e objectividade das suas críticas, que foram fundamentais para a forma final do trabalho.

Ao Dr. Pierre Bergot, da *Unité INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons* do *Institute National de la Recherche Agronomique* (INRA), em St. Pée-sur-Nivelle (França), por ter aceite co-orientar este trabalho. A total disponibilidade e inexcedível gentileza com que me recebeu nas frequentes estadias no seu laboratório, e com que sempre atendeu às minhas questões via fax e *e-mail*, constituem motivo de profundo reconhecimento. Agradeço ainda os ensinamentos práticos sobre a cultura de larvas de peixes, assim como as sugestões e críticas com as quais o trabalho foi tomando forma.

No que diz respeito aos ensinamentos práticos sobre a cultura de larvas de peixes, o meu agradecimento é ainda extensível a Anne-Marie Escaffre e a Didier Bazin, do INRA de St. Pée-sur-Nivelle (França), pelo auxílio prestado durante a experiência aí realizada.

Ao Eng.^o Irineu Batista, do Instituto Português de Investigação Marinha (IPIMAR), Lisboa, pelos conhecimentos teóricos e práticos que me transmitiu relativamente à preparação dos hidrolisados proteicos.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia e Antropologia e da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" que me auxiliaram em partes deste trabalho. Um agradecimento especial é devido ao Sr. Pedro Correia pela dedicada colaboração prestada ao longo dos anos em que decorreram os trabalhos, sobretudo no que diz respeito aos sucessivos melhoramentos do sistema experimental e a algumas análises químicas. À Eng.^a Maria de Lurdes Faria agradeço a disponibilidade com que sempre atendeu aos meus pedidos de ajuda em algumas análises químicas. Ao Sr. Rogério Freitas e à D. Adosinda Macedo

agradeço as numerosas vezes em que se prontificaram para me ajudar, mesmo fora das suas horas de serviço, inclusivamente à noite e aos fins-de-semana.

A todos os colegas da Faculdade que me incentivaram e que em várias ocasiões, e de várias formas, me auxiliaram desinteressadamente. Ao Professor Doutor António Gouveia pela sua constante disponibilidade. Ao Vítor Vasconcelos pela excelente camaradagem nos dias passados na Foz e pela facilidade e ajuda concedidas na utilização do HPLC. Ao Filipe Oliva Teles e ao António Múrias pela paciência e pelo tempo que despenderam sempre que solicitei os seus conhecimentos de estatística, e igualmente pela camaradagem nos dias na Foz. À Cristina Cruz e à Maria João Santos (que também passou pela Foz) por me terem "facilitado a vida" em alguns momentos de maior aperto.

Ao António Paulo Viana e ao Rui Sá, então estagiários da licenciatura em Biologia, pelo abnegado auxílio em fases cruciais do trabalho. A dedicação de ambos foi decisiva, respectivamente no arranque e na parte final dos ensaios zootécnicos. Agradeço ainda ao Álvaro Amorim por me ter ensinado o funcionamento do HPLC.

Ao Isidro Blanquet, a quem devo a obtenção das larvas de robalo utilizadas neste trabalho e numerosos conselhos sobre a melhor maneira de as cuidar.

Ao Paulo Rema, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, pela confiança depositada, que possibilitou que trocássemos conhecimentos, materiais e peixes, com um simples telefonema em cima da hora.

À Lydie Presteux-Santos e ao Abílio Santos pela gentileza de terem traduzido parte desta tese para francês e pelo extremo cuidado com que o fizeram.

À Comissão Científica do Departamento de Zoologia e Antropologia pela possibilidade de concessão da situação de equiparado a bolseiro no país e no estrangeiro.

À Embaixada de França em Portugal, à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, ao Instituto de Cooperação Científica e Tecnológica Internacional e ao IFREMER (França), pelas facilidades concedidas no âmbito dos acordos de cooperação luso-franceses, que me permitiram várias deslocações ao laboratório do INRA em St. Pée-sur-Nivelle (França).

A todos os familiares e amigos que sempre me têm apoiado. De forma muito especial agradeço à minha esposa e à minha filha, que nos últimos tempos ficaram privadas algumas vezes da minha companhia e muitas vezes da minha melhor disposição e paciência, continuando, apesar de tudo, a gostar de mim como antes. Um agradecimento muito especial também para os meus pais, por tudo o que têm feito para tornar possível o meu percurso, e para os meus irmãos, que o têm acompanhado solidariamente.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	17
RÉSUMÉ.....	21
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	27
1.1. A utilização de alimento artificial na produção larvar de peixes.....	27
1.1.1. Alimento vivo e alimento artificial.....	27
1.1.2. Aspectos da ontogenia larvar e particularidades do alimento artificial.....	28
1.1.3. Estudos sobre as necessidades nutricionais das larvas.....	35
1.1.4. Progressos na utilização de alimento artificial em larvicultura – casos particulares da carpa (<i>Cyprinus carpio</i>) e do robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	38
1.2. Objectivos do trabalho.....	41
2. MATERIAL E METODOLOGIA GERAL.....	45
2.1. Material animal.....	45
2.1.1. Larvas de robalo (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....	45
2.1.1.1 Transporte e aclimação dos ovos e das larvas.....	45
2.1.1.2. Incubação dos ovos.....	45
2.1.1.3. Cultura das larvas com alimento vivo.....	46
2.1.2. Larvas de carpa (<i>Cyprinus carpio</i>).....	46
2.1.2.1. Reprodução artificial da carpa e incubação dos ovos.....	46
2.1.3. Rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i>) e náuplios de <i>Artemia</i>	47
2.1.3.1. Produção de microalgas.....	48
2.1.3.2. Produção de rotíferos.....	48
2.1.3.3. Obtenção dos náuplios de <i>Artemia</i>	48
2.2. Ensaio zootécnicos.....	49
2.2.1. Sistema experimental.....	49
2.2.2. Protocolo experimental.....	51
2.3. Preparação das dietas experimentais.....	52
2.4. Preparação de hidrolisados de farinha de peixe.....	53
2.5. Métodos analíticos.....	54
2.5.1. Determinação da matéria seca.....	54
2.5.2. Determinação das cinzas.....	54

2.5.3. Determinação da gordura bruta.....	54
2.5.4. Determinação da proteína bruta.....	54
2.5.5. Determinação da energia bruta.....	55
2.5.6. Determinação do azoto solúvel.....	55
2.5.7. Análise cromatográfica (HPLC) da fracção azotada solúvel.....	55
2.6. Análise estatística.....	56
2.7. Definição de termos utilizados.....	56
 1ª PARTE – EXPERIÊNCIAS ZOOTÉCNICAS.....	 57
 3. UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADOS COMO ÚNICA FONTE PROTEICA DA DIETA.....	 59
3.1. Introdução.....	59
3.2. Material e métodos.....	59
3.3. Resultados.....	60
3.4. Discussão.....	65
 4. EFEITO DO NÍVEL DE INCLUSÃO DE UM HIDROLISADO PROTEICO EM DIETAS À BASE DE LEVEDURA.....	 69
4.1. Introdução.....	69
4.2. Material e métodos.....	69
4.3. Resultados.....	72
4.4. Discussão.....	75
 5. EFEITO DO GRAU DE HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DA DIETA.....	 81
5.1. Introdução.....	81
5.2. Material e métodos.....	82
5.3. Resultados.....	87
5.4. Discussão.....	94
 6. IMPORTÂNCIA DA SOLUBILIDADE E DA HIDRÓLISE NA UTILIZAÇÃO DA CASEÍNA DA DIETA.....	 101
6.1. Introdução.....	101
6.2. Material e métodos.....	102
6.3. Resultados.....	107
6.4. Discussão.....	112
 2ª PARTE – CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO AZOTADA DO ALIMENTO.....	 123
 7. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO AZOTADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS E DO ALIMENTO VIVO PARA LARVAS.....	 125

7.1. Introdução.....	125
7.2. Material e métodos.....	125
7.3. Resultados.....	127
7.4. Discussão.....	140
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

RESUMO

O conhecimento do tipo de ingredientes que as larvas terão capacidade de digerir e da forma como os nutrientes deverão ser fornecidos é considerado uma das questões chave para a formulação de uma dieta larvar adequada. Este aspecto parece ser particularmente importante no que diz respeito à proteína, na medida em que tem sido atribuído à sua deficiente utilização pelas larvas grande parte do insucesso do alimento artificial na promoção de um rendimento zootécnico satisfatório. Neste contexto, no presente trabalho procurou contribuir-se para o esclarecimento do efeito da forma como é fornecida a fracção azotada da dieta no rendimento zootécnico larvar. Com esse objectivo, foi efectuada uma série de experiências zootécnicas com larvas de carpa (*Cyprinus carpio*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) em que se testaram dietas microparticuladas contendo diferentes hidrolisados proteicos, incorporados em vários níveis, verificando-se os efeitos produzidos na sobrevivência e no crescimento. As dietas experimentais foram caracterizadas quanto ao respectivo perfil de distribuição do azoto, procurando clarificar-se a sua relação com os resultados zootécnicos obtidos, bem como compreender a importância relativa das várias fracções azotadas na expressão desses resultados. Foi igualmente estabelecido o perfil de distribuição do azoto dos organismos (*Brachionus plicatilis* e *Artemia*) utilizados de forma generalizada como alimento vivo na produção de larvas de peixes, os quais serviram como referência de uma dieta larvar adequada.

Na experiência 1 comparou-se o rendimento zootécnico de larvas de carpa alimentadas com dietas contendo diferentes hidrolisados como única fonte proteica e com uma dieta incluindo uma fonte proteica hidrolisada e outra não hidrolisada (em partes iguais). Os resultados mostraram um efeito negativo da incorporação de hidrolisados como única fonte proteica da dieta, que se reflectiu de forma acentuada sobretudo ao nível do crescimento.

Nas experiências 2 e 3 (respectivamente com larvas de carpa e pós-larvas de robalo) comparou-se, relativamente a uma dieta com levedura como única fonte proteica, o efeito da substituição da levedura por níveis crescentes (30, 50, 70 e 100%) de um hidrolisado comercial de farinha de peixe. Para ambas as espécies, verificou-se um nível óptimo de incorporação do hidrolisado, que correspondeu a 50-70% de substituição da levedura.

Nas experiências 4, 5, 6 e 7 utilizaram-se dietas contendo farinha de peixe como única fonte proteica. Os hidrolisados foram obtidos através da digestão da farinha de peixe pela pepsina (hidrolisado P), pela pepsina/tripsina (hidrolisado PT) e pela pepsina/pancreatina (hidrolisado PP).

A experiência 4 foi realizada com pós-larvas de robalo. A dieta controle era constituída por farinha de peixe não hidrolisada como única fonte proteica. Em três das restantes dietas respectivamente 25, 50 e 75% do azoto total foi fornecido pelo hidrolisado P e na outra 50% do azoto total foi fornecido pelo hidrolisado PP. Quando 25% do azoto da dieta foi fornecida pelo hidrolisado P o rendimento zootécnico não foi afectado. No entanto, níveis mais elevados (50 e 75%) fizeram diminuir significativamente o crescimento. Além disso, para o mesmo nível de incorporação de hidrolisado (50% do azoto total) os resultados foram significativamente piores com o hidrolisado PP do que com o hidrolisado P.

A experiência 5 foi realizada com larvas de robalo. A dieta controle era constituída por farinha de peixe não hidrolisada como única fonte proteica. Nas restantes quatro dietas 10 e 30% do azoto total foi fornecido pelo hidrolisado P ou pelo hidrolisado PP. Não se observaram diferenças zootécnicas quando 10% do azoto dietário foi fornecido sob a forma hidrolisada, qualquer que fosse o hidrolisado utilizado. Porém, para o nível de 30%, o hidrolisado PP afectou negativamente a sobrevivência, enquanto que com o hidrolisado P não se verificaram efeitos significativos.

A experiência 6 foi realizada também com larvas de robalo. A dieta controle era constituída por farinha de peixe não hidrolisada como única fonte proteica. Nas restantes duas dietas 30% do azoto total foi fornecido pelo hidrolisado P ou pelo hidrolisado PT. A inclusão de qualquer um dos hidrolisados resultou numa melhor sobrevivência relativamente ao controle.

A experiência 7 foi realizada com larvas de carpa. A dieta controle era constituída por farinha de peixe não hidrolisada como única fonte proteica. Nas restantes três dietas 30% do azoto total foi fornecido pelo hidrolisado P, pelo hidrolisado PT ou pelo hidrolisado PP. A inclusão dos hidrolisados P ou PT não resultou em alterações significativas na performance zootécnica. No entanto, tanto o crescimento como a sobrevivência foram afectados negativamente quando se usou o hidrolisado PP.

Na experiência 8, com larvas de carpa, utilizou-se caseína como única fonte proteica das dietas, fornecida sob três formas: caseína insolúvel em água (caseína nativa), caseína solúvel em água, não hidrolisada (caseinato de sódio), e caseína hidrolisada. A dieta controle continha caseína nativa como única fonte proteica. Nas restantes dietas a caseína nativa foi parcial (25, 50, 75%) ou totalmente substituída por caseína solúvel. Nas dietas em que 25% da caseína era solúvel a percentagem de caseína hidrolisada relativamente ao caseinato de sódio foi de 0, 25, 50 ou 100%. Nas dietas em que 50 e 75% da caseína era solúvel essa percentagem foi de 0, 50 ou 100%. A dieta em que 100% da caseína era solúvel continha apenas caseinato de sódio como fonte proteica. Procurou verificar-se, assim, a importância relativa da solubilidade e da hidrólise na utilização desta proteína. Os resultados evidenciaram uma deficiente utilização da caseína nativa pelas larvas sobretudo durante a primeira semana de alimentação exógena, após a qual esta proteína era eficazmente utilizada. Verificou-se que tanto a solubilidade como a hidrólise afectavam o crescimento e a sobrevivência das larvas, sendo os melhores resultados obtidos com uma dieta em que 25% da caseína era solúvel, e desta 25% era hidrolisada.

Na experiência 9, também com larvas de carpa, utilizaram-se três dietas semelhantes àquela que conduziu aos melhores resultados na experiência 8. Estas dietas distinguíam-se apenas quanto aos hidrolisados de caseína utilizados, os quais se diferenciavam unicamente quanto ao perfil de distribuição do azoto. Os resultados obtidos não diferiram estatisticamente qualquer que tivesse sido o hidrolisado incorporado.

Na experiência 10 (igualmente com larvas de carpa), utilizando os mesmos hidrolisados mas aumentando o seu teor na dieta, observaram-se os melhores resultados com o hidrolisado contendo menor teor de aminoácidos livres e teor elevado da fracção correspondente aos di/tripéptidos.

Considerando o perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais, a fracção correspondente aos di-/tripéptidos e, principalmente, a fracção constituída pelos aminoácidos livres foram as que maior influência tiveram nos resultados zotécnicos obtidos. A inclusão destas fracções nas dietas será vantajosa quando em níveis relativamente baixos, mas prejudicial para níveis acima de um determinado valor. De acordo com a gama de concentrações no conjunto das dietas utilizadas, o limite a partir do qual estas fracções tiveram um efeito negativo evidente situou-se entre 15% do azoto total para a fracção constituída por di-

/tripéptidos e cerca de 7% do azoto total para a fracção constituída pelos aminoácidos livres. Relativamente às restantes fracções azotadas, a fracção insolúvel a pH 8 (o pH do intestino das larvas) e a fracção insolúvel em água deverão igualmente ser tomadas em consideração na formulação das dietas, visto que tiveram também alguma influência nos resultados zootécnicos.

Ambos os organismos usados de forma generalizada como alimento vivo para as larvas dos peixes apresentam um perfil de distribuição de azoto muito semelhante. De acordo com o perfil determinado, 50-60% do azoto será solúvel a pH 8, do qual 84-89% será constituído por proteínas, poli- e oligopéptidos, 4-11% por di- e tripéptidos e 3-6% por aminoácidos livres.

De um modo geral, quanto mais semelhantes os perfis de distribuição do azoto das dietas experimentais e do alimento vivo, melhores foram os resultados zootécnicos obtidos com essas dietas. Esta constatação parece confirmar a importância da existência de um equilíbrio adequado entre as várias fracções azotadas da dieta, o qual deverá ser idêntico ao do alimento vivo.

ABSTRACT

The knowledge about the kind of ingredients that fish larvae are able to digest and the form under which nutrients must be fed is considered a fundamental step towards the formulation of an appropriate larval diet. This seems to be particularly important concerning dietary protein, since the inefficient utilisation of protein by fish larvae has been suggested as the main cause of the limited success of artificial diets to promote a satisfactory zootechnical performance. The aim of the present work was to contribute for a better understanding about the effect of the form of dietary nitrogen supply on larval zootechnical performance. With that purpose, several trials were carried out with carp (*Cyprinus carpio*) and seabass larvae (*Dicentrarchus labrax*) fed microparticulate diets containing protein hydrolysates at different levels, and the effects on growth and survival were registered. Experimental diets were characterised concerning the profile of nitrogen distribution, and a relationship between that profile and the zootechnical results was investigated, as well as the importance of each nitrogen fraction on those results. The profile of nitrogen distribution was also determined for the organisms (*Brachionus plicatilis* and *Artemia*) used as live food in the production of fish larvae, which served as a reference of a good larval diet.

In the experiment 1 it was compared the zootechnical performance of carp larvae fed diets containing different protein hydrolysates as the only nitrogen source and a diet including both a hydrolysed and a non-hydrolysed protein source. The results showed a negative effect of the dietary incorporation of hydrolysates as the only protein source, which was strongly reflected on larval growth.

In the experiments 2 and 3 (respectively with carp larvae and seabass post-larvae) it was studied the effect of the replacement of yeast by increasing levels (30, 50 70 and 100%) of a commercial fish meal hydrolysate, comparatively to a diet containing yeast as the sole protein source. In both species, it was observed an optimum dietary level of the hydrolysate, corresponding to 50-70% of yeast replacement.

In the experiments 4, 5, 6 and 7, diets contained fish meal as the only protein source. Hydrolysates were obtained through digestion of fish meal by pepsin (hydrolysate P), pepsin/trypsin (hydrolysate PT) and pepsin/pancreatin (hydrolysate PP).

The experiment 4 was carried out with seabass post-larvae. The control diet incorporated non-hydrolysed fish meal as the only protein source. In the other diets respectively 25, 50 and 75% of total nitrogen was supplied by the hydrolysate P or 50% of total nitrogen was supplied by the hydrolysate PP. When 25% of dietary nitrogen was supplied by the hydrolysate P the performance was not affected. However, with higher levels (50 and 75%) growth was significantly depressed. Moreover, for the same dietary level of hydrolysate (50% of total nitrogen) the results were significantly worst with the hydrolysate PP than with the hydrolysate P.

The experiment 5 was carried out with seabass larvae. The control diet incorporated non-hydrolysed fish meal as the only protein source. In the other diets 10 and 30% of total nitrogen was supplied by the hydrolysate P or by the hydrolysate PP. No differences were observed when 10% of dietary nitrogen was supplied by the hydrolysates, whatever the hydrolysate used. However, at the level of 30% the hydrolysate PP led to a significant worst survival, while the hydrolysate P did not affect the results.

The experiment 6 was carried out with seabass larvae, as in the previous experiment. The control diet incorporated non-hydrolysed fish meal as the only protein source. In the other diets 30% of total nitrogen was supplied by the hydrolysate P or by the hydrolysate PT. In both cases, diets containing the hydrolysate conducted to a better survival than the control diet.

The experiment 7 was carried out with carp larvae. The control diet incorporated non-hydrolysed fish meal as the only protein source. In the other diets 30% of total nitrogen was supplied by the hydrolysate P, by the hydrolysate PT or by the hydrolysate PP. The incorporation of the hydrolysates P or PT did not produce significant effects on larval performance. However, the incorporation of the hydrolysate PP produced negative effects both on survival and growth.

In the experiment 8, with carp larvae, casein was used as the sole nitrogen source. This protein was supplied under three different forms: native casein (water insoluble), sodium caseinate (water soluble, non-hydrolysed) and casein hydrolysate. The control diet contained the native casein as the only protein source. In the other diets the native casein was partially (25, 50, 75%) or totally replaced by soluble casein. Diets in which 25% of casein was in the soluble form contained 0, 25, 50 or 100% of casein hydrolysate relative to sodium caseinate, diets in which 50 or 75% of casein was in the soluble form contained 0, 50 or 100% of casein

hydrolysate relative to sodium caseinate, and diet in which 100% of casein was in the soluble form contained only sodium caseinate as protein source. The aim of this experiment was to verify the importance of both solubility and hydrolysis on larval performance. The results showed that native casein was poorly utilised by carp larvae particularly during the first week of exogenous feeding, after which its utilisation improved. Both solubility and hydrolysis were found to have a significant effect on larval survival and growth. The best result was obtained with a diet containing 25% of the casein in the soluble form, 25% of which was hydrolysed.

In the experiment 9 diets were similar to the best diet of the previous experiment. The only difference among diets concerned the kind of casein hydrolysate used, which differed with respect to the profile of nitrogen distribution. No significant changes were observed on the performance of carp larvae whatever the casein hydrolysate used.

In the experiment 10 (also with carp larvae) the same hydrolysates as in the experiment 9 were incorporated into the diets, but at higher levels. The best result was obtained with the hydrolysate containing the lower content of free amino acids and a high content of the fraction corresponding to di/tripeptides.

Considering the profile of nitrogen distribution of experimental diets, the fraction corresponding to di- and tripeptides, and specially that corresponding to free amino acids seem to be the most related with the zootechnical results. Both fractions might be advantageous if included into the diets at low levels, but harmful at higher levels. According to the range provided by the set of diets used in this work, the limit after which these fractions were found to have evident negative effects was around 15% for the fraction formed mainly by di/tripeptides, and about 7% for that mainly corresponding to free amino acids. Concerning the other nitrogen fractions, it seems that the fraction insoluble at pH 8 (the pH of larval intestine) and that insoluble in water should also be taken into account in a larval diet formulation, since they also showed some influence on the zootechnical results.

Both organisms generally used as live food for fish larvae present a similar profile of nitrogen distribution. According to that profile, about 50-60% of total nitrogen would be soluble at pH 8, 84-89% of which would correspond to protein, poly- and oligopeptides, 4-11% to di- and tripeptides, and 3-6 to free amino acids.

In a general way, the more similar to live food the profile of nitrogen distribution of the experimental diets, the better the zootechnical results obtained with those diets. This evidence seems to confirm the importance of an adequate balance among dietary nitrogen fractions, which should be identical to that of live food.

RÉSUMÉ

La connaissance du type d'ingrédients que les larves sont capables de digérer et de la forme sous laquelle les éléments nutritifs doivent leur être fournis est un des points clefs pour arriver à la formulation d'un régime larvaire adéquat. Cet aspect semble être particulièrement important pour ce qui concerne la protéine, dans la mesure où son utilisation défailante par les larves serait, en grande partie, responsable de l'échec de la nourriture artificielle à assurer un rendement zootechnique satisfaisant. Dans ce contexte, le présent travail est une contribution qui a pour but d'éclaircir comment, la forme sous laquelle est fournie la fraction azotée du régime, agit sur le rendement zootechnique larvaire. Suivant cet objectif, nous avons effectué une série d'expériences zootechniques avec des larves de carpe (*Cyprinus carpio*) et de bar (*Dicentrarchus labrax*) sur lesquelles nous avons testé des régimes microparticulaires contenant différents hydrolysats protéiques, incorporés à différents niveaux, en vérifiant les effets sur la survie et de la croissance. Les régimes expérimentaux ont été caractérisés par leur respectif profil de distribution d'azote. Nous avons cherché à éclaircir la relation entre celui-ci et les résultats zootechniques obtenus, aussi bien qu'à comprendre l'importance relative des différentes fractions azotées dans l'expression des résultats. Nous avons également établi le profil de distribution d'azote des organismes (*Brachionus plicatilis* et *Artemia*) utilisés de façon généralisée comme nourriture vivante dans la production de larves de poissons, organismes qui ont servi de référence à un régime larvaire adéquat.

Dans l'expérience 1, nous avons comparé le rendement zootechnique des larves de carpe alimentées, soit avec des régimes contenant différents hydrolysats comme unique source protéique, soit avec un régime comportant une source protéique hydrolysée et une autre non hydrolysée (en parties égales). Les résultats ont montré que l'incorporation d'hydrolysats comme unique source protéique du régime, produit un effet négatif qui se reflète de façon accentuée, surtout au niveau de la croissance.

Dans les expériences 2 et 3, (respectivement sur des larves de carpe et des post-larves de bar) nous avons comparé un régime dont la levure est l'unique source protéique à des régimes dans lesquels la levure a été remplacée par des niveaux croissants (30, 50, 70 et 100%) d'un hydrolysat commercial de farine de poisson. Pour les deux espèces, nous avons vérifié un niveau optimal d'incorporation de l'hydrolysat, correspondant aux 50-70% de remplacement de la levure.

Dans les expériences 4, 5, 6 et 7, nous avons utilisé des régimes contenant de la farine de poisson comme unique source protéique. Les hydrolysats ont été obtenus à travers la digestion de la farine de poisson par la pepsine (hydrolysat P), par la pepsine/trypsine (hydrolysat PT) et par la pepsine/pancréatine (hydrolysat PP).

L'expérience 4 a été réalisée sur des post-larves de bar. Le régime contrôle était constitué de farine de poisson non hydrolysée comme unique source protéique. Alors que dans trois des régimes restants, respectivement 25, 50 et 75% de l'azote total a été fourni par l'hydrolysat P, dans l'autre régime, c'est l'hydrolysat PP qui a fourni 50% de l'azote total. Lorsque 25% de la protéine a été fournie par l'hydrolysat P, le rendement zootechnique n'a pas été affecté. Cependant, des niveaux plus élevés (50 et 75%) ont fait diminuer significativement la croissance. En outre, pour un même niveau d'incorporation de l'hydrolysat (50% de l'azote total), les résultats ont été nettement inférieurs avec l'hydrolysat PP qu'avec l'hydrolysat P.

L'expérience 5 a été réalisée sur des larves de bar. Le régime contrôle était constitué de farine de poisson non hydrolysée comme unique source protéique. Dans les quatre régimes restants, 10 et 30% de l'azote total a été fourni par l'hydrolysat P ou par l'hydrolysat PP. Lorsque 10% de l'azote du régime a été fourni sous une forme hydrolysée, quel que soit l'hydrolysat utilisé, nous n'avons pas observé de différences zootechniques. Toutefois, pour le niveau de 30%, l'hydrolysat PP a affecté négativement la survie, tandis que l'hydrolysat P a continué à ne pas affecter de façon significative les résultats.

L'expérience 6 a été, elle aussi, réalisée avec des larves de bar. Le régime contrôle était constitué de farine de poisson non hydrolysée comme unique source protéique. Dans les deux régimes restants, 30% de l'azote total a été fourni par l'hydrolysat P, par l'hydrolysat PT ou par l'hydrolysat PP. Quel que soit l'hydrolysat inclus, nous obtenons une meilleure survie par rapport au régime contrôle non hydrolysé.

L'expérience 7 a été réalisée avec des larves de carpe. Le régime contrôle était constitué de farine de poisson non hydrolysée comme unique source protéique. Dans les trois régimes restants, 30% de l'azote total a été fourni par l'hydrolysat P, par l'hydrolysat PT ou par l'hydrolysat PP. L'inclusion des hydrolysats P ou PT n'a pas entraîné d'altérations significatives sur les résultats zootechniques. Cependant, aussi bien la croissance que la survie ont été affectées négativement lors de l'utilisation de l'hydrolysat PP.

Dans l'expérience 8, sur des larves de carpe, la caséine, l'unique source protéique des régimes, a été fournie sous trois formes: caséine insoluble dans l'eau (caséine native), caséine soluble dans l'eau mais non hydrolysée (caséinate de sodium) et caséine hydrolysée. Le régime contrôle contenait de la caséine native comme unique source protéique. Dans les régimes restants, la caséine native a été partiellement (25, 50, 75%) ou totalement, remplacée par de la caséine soluble. Dans les régimes avec 25% de caséine soluble, le pourcentage de caséine hydrolysée par rapport au caséinate de sodium a été de 0, 25, 50 et 100%. Dans les régimes avec 50 et 75 % de caséine soluble, ce pourcentage a été de 0, 50 et 100% et, dans le régime avec 100% il a été de 0%. Nous avons cherché à vérifier, ainsi, l'importance relative de la solubilité et de l'hydrolyse dans l'utilisation de cette protéine. Les résultats ont mis en évidence une mauvaise utilisation de la caséine native par les larves, surtout pendant la première semaine d'alimentation exogène, cette protéine étant, par la suite efficacement utilisée. Nous avons vérifié qu'aussi bien la solubilité que l'hydrolyse affectaient la croissance et la survie des larves, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec un régime dans lequel 25% de la caséine était soluble, et, sur celle-ci, 25% étant hydrolysée.

Dans l'expérience 9, elle aussi, sur des larves de carpe, nous avons utilisé trois régimes semblables à celui qui nous avait donné les meilleurs résultats pour l'expérience 8. Ces régimes ne diffèrent que sur les hydrolysats de caséine utilisés, lesquels ne se distinguent que sur le profil de distribution en azote. Les résultats obtenus ne diffèrent pas statistiquement, quel que soit l'hydrolysate incorporé.

Dans l'expérience 10 (également sur des larves de carpe), en utilisant les mêmes hydrolysats mais en augmentant leur teneur dans le régime, nous avons observé les meilleurs résultats avec le régime contenant un hydrolysate à plus faible teneur en acides aminés libres et à plus forte teneur de la fraction correspondant aux di/tripéptides.

Si nous considérons le profil de distribution en azote des régimes expérimentaux, la fraction correspondant aux di-/tripéptides et, principalement, la fraction constituée par les acides aminés libres sont celles qui ont eu une influence majeure sur les résultats zootechniques obtenus. L'inclusion de ces fractions dans les régimes est profitable pour des niveaux relativement bas, mais dommageable pour des niveaux au dessus d'une certaine valeur. Selon la gamme de concentrations dans l'ensemble des régimes utilisés, la limite à partir de laquelle ces fractions ont un effet négatif évident se situe entre 11-18% de l'azote total, pour la fraction constituée par les di-/tripéptides et, à près de 7% de l'azote total, pour la fraction

constituée par les acides aminés libres. En ce qui concerne les fractions azotées restantes - la fraction insoluble à pH 8 (le pH de l'intestin des larves) et la fraction insoluble dans l'eau - elles doivent également être prises en considération dans la formulation des régimes, puisqu'elles ont aussi une influence, dans une certaine mesure, sur les résultats zootechniques.

Les deux organismes utilisés de façon généralisée comme nourriture vivante pour les larves de poisson présentent un profil de distribution d'azote très semblable. Selon le profil déterminé, 50-60% de l'azote est soluble à pH 8, dont 84-89% est constitué par des protéines, des poli- et oligopeptides, 4-11% par des di- et tripeptides et 3-6% par des acides aminés libres.

D'une façon générale, plus les profils de distribution de l'azote des régimes expérimentaux et de la nourriture vivante sont semblables, meilleurs sont les résultats zootechniques obtenus avec ces régimes. Cette constatation semble confirmer l'importance d'obtenir un équilibre approprié entre les différentes fractions azotées du régime, équilibre qui doit être identique à celui de la nourriture vivante.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. A UTILIZAÇÃO DE ALIMENTO ARTIFICIAL NA PRODUÇÃO LARVAR DE PEIXES

A aquacultura mundial tem-se desenvolvido consideravelmente nas últimas décadas, vindo a sua produção a aumentar de forma sustentada. Tal facto, associado ao aumento constante da população humana e aos problemas de sobre-exploração dos recursos piscatórios, faz com que esta actividade venha assumindo um relevo crescente no fornecimento de proteína para consumo humano. No entanto, afirma-se a necessidade de um maior crescimento da produção nos próximos anos, por forma a poder suportar o aumento populacional previsto (New, 1991; Pedini, 2000).

Para uma grande parte das espécies piscícolas actualmente exploradas, e em particular para as espécies marinhas, o aumento da produção está contudo comprometido por um suprimento irregular, e por vezes insuficiente, de juvenis. Esta situação deve-se fundamentalmente à elevada mortalidade que ocorre durante as primeiras fases de desenvolvimento dos peixes – período larvar - a qual está frequentemente relacionada com questões do foro alimentar e nutricional das larvas. Por este motivo, a alimentação e a nutrição das larvas são encarados como um dos principais factores condicionantes do sucesso do período larvar e, em última análise, de toda a produção.

1.1.1. Alimento vivo e alimento artificial

Os salmonídeos possuem no momento da eclosão um tamanho apreciável e reservas vitelinas importantes, o que permite o fornecimento de dietas artificiais como primeiro e único alimento exógeno. Pelo contrário, a maioria das espécies de peixes de interesse em aquacultura, e sobretudo as espécies marinhas, apresenta à nascença um tamanho reduzido e um conjunto de características particulares que têm dificultado a obtenção de um alimento artificial adequado aos estados iniciais do seu desenvolvimento. No caso dos peixes marinhos torna-se, por isso, imprescindível a presença constante de organismos zooplanctónicos (rotíferos e artémia) nos tanques de cultura durante os primeiros cerca de 30-40 dias de vida das larvas, de modo a assegurar uma sobrevivência e um crescimento satisfatórios.

Esta exigência implica a manutenção de uma cadeia trófica nas pisciculturas – produção de algas unicelulares das quais se alimentarão os zooplânctons destinados a servir de presas às larvas dos peixes – que onera grandemente os custos de produção de juvenis. A título de exemplo, no caso do robalo europeu, a alimentação com presas vivas representará 50% dos custos totais de alimentação na produção de juvenis de três meses de idade. Este valor assume ainda maior relevo tendo em conta que, em termos de biomassa, esta presas constituirão apenas 1,6% do peso seco total de alimento necessário durante esse período de tempo (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993a). A transição de alimento vivo para alimento artificial aos 20 ou aos 25 dias de idade, em vez dos 35 dias normalmente praticados, permitiria uma redução de, respectivamente, 80 ou 60% na quantidade de presas necessárias (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993a). Assim, uma dieta artificial que possibilite a redução da dependência de alimento vivo na cultura larvar dos peixes revestir-se-á de elevado interesse económico. Para além disso, a produção larvar está estreitamente correlacionada com a qualidade nutritiva do alimento vivo, nomeadamente com a qualidade da artémia disponível no mercado, a qual está sujeita a oscilações muito apreciáveis (Coves *et al.*, 1991). Dada a possibilidade de existência de grande variação na qualidade nutritiva do alimento vivo, a sua utilização constituirá um factor de risco adicional considerável numa actividade que, pela sua complexidade, é já extremamente delicada.

Pelos motivos apontados, vários aspectos relacionados com a alimentação e nutrição das larvas dos peixes vêm sendo estudados tendo em vista a formulação de um alimento artificial que permita reduzir ao mínimo a dependência do alimento vivo. Dessa forma, poder-se-á diminuir a elevada proporção que a alimentação larvar representa no custo global de produção dos peixes marinhos e, simultaneamente, conseguir uma produção mais consistente e previsível.

1.1.2. Aspectos da ontogenia larvar e particularidades do alimento artificial

Nos peixes, o termo larva é aplicado para designar as formas recém-eclodidas, morfo-anatómica e fisiologicamente distintas dos adultos, em espécies que produzem ovos de pequeno tamanho e com reservas nutritivas escassas, como é o caso da generalidade das espécies marinhas e de algumas dulciaquícolas (ciprinídeos, por exemplo). A fase larvar tem início na eclosão e prolonga-se até à metamorfose, conceito mais ou menos difuso que é assumido como o momento em que será atingida a fase juvenil.

A fase larvar corresponde a um período de transformação contínua, ao longo do qual o animal está sujeito a uma série de alterações morfológicas, anatómicas e fisiológicas, que se reflectirão nas suas necessidades nutricionais (Dabrowski, 1984a, 1986; Segner *et al.*, 1993; Verreth *et al.*, 1993; Watanabe e Kiron, 1994). Por outro lado, apesar do determinismo genético da ontogénese das estruturas e funções, as larvas poderão apresentar respostas adaptativas às condições nutricionais a que são sujeitas (Segner *et al.*, 1993). Estes factos deverão ser tomados em consideração na formulação do alimento, qualquer deficiência sendo rápida e drasticamente manifestada dada a elevada taxa de crescimento específico das larvas.

Contudo, antes dos aspectos nutricionais poderem ser abordados, haverá que tomar em consideração os problemas relacionados com a aceitação e posterior digestão das partículas alimentares, unanimemente reconhecidos como os principais factores que têm obstado ao sucesso do alimento artificial para as larvas.

A aceitação do alimento

A aceitação do alimento envolve a detecção, captura e ingestão das partículas, o que deverá acontecer no mais curto intervalo de tempo possível. Ao contrário das presas vivas, com movimento próprio e permanentemente disponíveis por toda a coluna de água, as partículas inertes são fornecidas de forma restringida no tempo e no espaço, o que dificulta a sua aceitação e acessibilidade pelas larvas.

Os estímulos visuais e os estímulos químicos parecem ser fundamentais nos processos de detecção e ingestão das partículas alimentares (Appelbaum *et al.*, 1983; Dendrinis *et al.*, 1984; Barnabé, 1989; Kolkovski *et al.*, 1997a, 1997b). Apesar disso, o sistema visual das larvas não está completamente funcional no início da alimentação exógena, verificando-se um progressivo aumento da acuidade visual ao longo do desenvolvimento larvar (Blaxter, 1969). Situação idêntica ocorrerá em relação ao órgãos quimiosensoriais, envolvidos na percepção do odor e do sabor (Appelbaum *et al.*, 1983).

A necessidade de tornar as partículas inertes suficientemente atractivas, de modo a suscitar o interesse das larvas e aumentar a sua taxa de ingestão, constituiu uma preocupação constante desde os primeiros trabalhos efectuados sobre a adaptação ao alimento artificial (Métailler e Alliot, 1978; Girin, 1979; Métailler *et al.*, 1979; Meyers, 1979). Vários produtos foram então incorporados no alimento larvar como

apetentes, em especial farinhas de organismos constituintes da dieta natural dos peixes, como poliquetas, crustáceos e moluscos (Barnabé, 1976; Barahona-Fernandes *et al.*, 1977; Girin *et al.*, 1977; Métailler *et al.*, 1981). A posterior identificação das várias substâncias químicas com propriedades estimulantes do apetite presentes na dieta natural de juvenis e adultos (revisão de Mackie e Mitchell, 1985) levou à inclusão desses compostos específicos em dietas artificiais para as larvas. Compostos como a inosina ou uma mistura de glicina, betaína e inosina mostraram-se eficazes como apetentes, respectivamente no pregado (*Scophthalmus maximus*) e no linguado (*Solea vulgaris*) (Person-Le Ruyet *et al.*, 1983; Métailler *et al.*, 1983). Recentemente, foi demonstrado que alguns L-aminoácidos livres (arginina, alanina e glicina) e a betaína, isolados do meio de cultura de artémia, promovem eficazmente a taxa de ingestão de micropartículas inertes por parte de larvas de dourada (*Sparus aurata*), sendo sugerida a suplementação das dietas artificiais nestes compostos (Kolkovski *et al.*, 1997a). Também aos fosfolípidos, cuja incorporação em dietas para larvas é considerada essencial, é atribuído, entre vários efeitos benéficos, um papel estimulador da alimentação (Coutteau *et al.*, 1997).

Relativamente à detecção do alimento, a cor das partículas e, em particular, o contraste destas com o meio, deverão ser tomados em consideração, na medida em que influenciam a taxa de ingestão (Dendrinou *et al.*, 1984). O recurso à inclusão de pigmentos no alimento artificial (Gatesoupe e Luquet, 1981; Appelbaum, 1985) permitirá manipular facilmente este factor.

No momento da captura, características como o tamanho da partícula e o seu comportamento na água poderão igualmente revelar-se importantes. De facto, as larvas parecem apresentar uma selectividade acentuada quanto às dimensões das partículas alimentares (Barahona-Fernandes, 1978; Kentouri *et al.*, 1984; Walford *et al.*, 1991; Cunha, 1996), pelo que o diâmetro destas deverá ser ajustado ao tamanho da boca e acompanhar o seu desenvolvimento. Além disso, as partículas deverão possuir alguma capacidade de flutuação, que permita que sedimentem o mais lentamente possível, já que as larvas se alimentam preferencialmente de partículas em suspensão na coluna de água. Este aspecto será tanto mais determinante quanto mais precoce for a adaptação ao alimento inerte, uma vez que a capacidade natatória implicada nos movimentos de prospecção e captura aumenta gradualmente (Barnabé, 1989), na sequência da diferenciação progressiva das barbatanas.

Outras características, como o sabor, a consistência e a textura, estarão provavelmente envolvidas no processo final de aceitação do alimento inerte (Métailler e Alliot, 1978; Girin, 1979; Métailler *et al.*, 1979; Meyers, 1979), ocorrendo com frequência situações de rejeição das partículas após estas terem sido ingeridas pelas larvas.

Aspectos relacionados com a digestão do alimento

No momento da passagem para a alimentação exógena, o tracto digestivo das larvas dos peixes é estrutural e funcionalmente menos complexo que o dos adultos. A generalidade das larvas não possui estômago quando ocorre a eclosão; enquanto que os ciprinídeos permanecem agástricos durante toda a vida, nos peixes marinhos a formação deste órgão processa-se numa fase tardia, constituindo um marco indicador do final do período larvar. A figura 1.1 resume a sequência típica da diferenciação do tracto digestivo em peixes que possuem estômago.

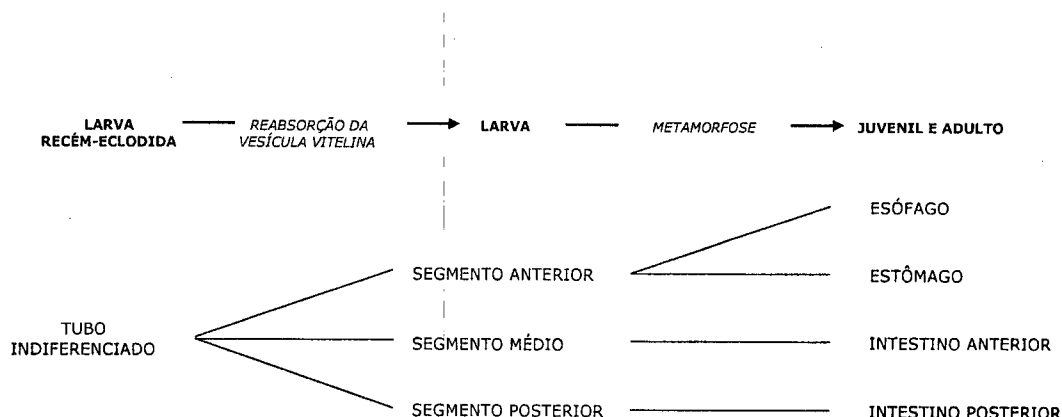


FIGURA 1.1. Sequência da diferenciação do tracto digestivo em peixes que possuem estômago (adaptado de Govoni *et al.*, 1986).

O tracto digestivo das larvas recém-eclodidas é constituído por um simples tubo fechado, histologicamente indiferenciado ao longo da sua extensão. Este tubo permanece inalterado até à quase completa reabsorção das reservas vitelinas, diferenciando-se em segmentos histológica e funcionalmente distintos, no início da alimentação exógena. Poucas alterações adicionais ocorrem até ao final da metamorfose, altura em que se verifica a última importante alteração morfológica, que consiste no aparecimento do estômago funcional e dos cecos pilóricos. O fígado

e o pâncreas encontram-se formados no momento da eclosão, tornando-se funcionais aquando da reabsorção da vesícula vitelina (Govoni *et al.*, 1986).

Nas larvas, tal como nos adultos agástricos, a ausência de uma digestão prévia das proteínas alimentares no estômago, pela pepsina, será compensada em certa medida pelo processo de digestão intracelular das macromoléculas proteicas, absorvidas por pinocitose ao nível das células epiteliais do segmento intestinal posterior (Govoni *et al.*, 1986). Com o desenvolvimento das glândulas gástricas este mecanismo é alterado, impondo-se a digestão extracelular e a absorção das moléculas por transporte membranar, que caracterizam a forma adulta de digestão.

Uma série de estudos – de índole histológica, histoquímica e enzimológica – efectuados em espécies marinhas de elevado interesse em piscicultura, como o robalo *Dicentrarchus labrax* (Vu, 1983; Beccaria *et al.*, 1991; Zambonino-Infante e Cahu, 1994a, 1994b), a dourada *Sparus aurata* (Moyano e Sarasquete, 1993; Sarasquete *et al.*, 1995; Moyano *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1997; Calzada *et al.*, 1998), o pregado *Scophthalmus maximus* (Cousin e Baudin Laurencin, 1985; Segner *et al.*, 1994) e o linguado *Solea solea* (Clark *et al.*, 1986; Boulhic e Gabaudan, 1992) e *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999a, 1999b), confirma este modelo de ontogenia do tubo digestivo apresentado por Govoni *et al.* (1986). Do conjunto destes estudos resultam duas observações com relevo particular na questão da capacidade de utilização do alimento pelas larvas: (i) a funcionalidade do pâncreas e do intestino desde o início da alimentação exógena, no sentido de assegurar a síntese das principais enzimas necessárias à digestão do alimento, assim como a absorção dos nutrientes, e (ii) o desenvolvimento tardio do estômago, que se torna funcional apenas no final do período larvar.

A hipótese de uma deficiência de enzimas digestivas, devida à incompleta organogénese do tubo digestivo, tem sido apontada para explicar as baixas taxas de crescimento e de sobrevivência que estão invariavelmente associadas à fraca utilização das dietas artificiais pelas larvas. Consequentemente, foi sugerido que o sucesso do alimento vivo resultaria do fornecimento por parte deste, não apenas dos nutrientes essenciais, mas sobretudo de enzimas digestivas suplementares que, de forma directa (por autólise da própria presa) e indirecta (através da activação dos zimogénios das larvas), ajudariam na digestão dos nutrientes pelas larvas (Dabrowski e Glogowski, 1977; Vu, 1983; Dabrowski 1984a; Lauff e Hofer, 1984; Munilla-Moran e Stark, 1989; Munilla-Moran *et al.*, 1990; Walford *et al.*, 1991; Walford e Lam, 1993; Kolkovski *et al.*, 1993a, 1993b, 1997b, 1997c).

Assim, Lauff e Hofer (1984), Munilla-Moran *et al.* (1990) e Day *et al.* (1993) estimaram em cerca de 50 a 70% o contributo das enzimas exógenas (das presas) para o processo total de digestão proteolítica larvar. No mesmo sentido, Walford *et al.* (1991) encontram evidências da digestão de dietas microencapsuladas apenas quando estas são fornecidas às larvas em conjunto com rotíferos, o mesmo não acontecendo quando são fornecidas isoladamente.

Baseados na presunção de um contributo significativo das proteases exógenas na digestão larvar, alguns autores testaram o efeito da incorporação de enzimas digestivas no alimento artificial. Dabrowska *et al.* (1979) não observaram, contudo, qualquer efeito da adição de extractos enzimáticos no crescimento de larvas de carpa. Da mesma forma, Fernández-Díaz e Yúfera (1995), em larvas de dourada (*S. aurata*), não verificaram qualquer efeito na digestão de microcápsulas quando estas eram suplementadas com papaína, embora considerassem os resultados não conclusivos. Pelo contrário, também em larvas de dourada, Kolkovski *et al.* (1993a, 1993b) registaram um efeito positivo na assimilação da dieta (e em particular das proteínas e dos lípidos) e no crescimento em consequência da incorporação de pancreatina no alimento. Em larvas de robalo (*D. labrax*) este efeito positivo não foi, porém, confirmado (Kolkovski *et al.*, 1997c).

A hipótese que associa o insucesso do alimento artificial a uma deficiente capacidade digestiva das larvas, não obstante os resultados que a apoiam, foi contestada por vários autores, com fundamento na variedade e actividade das enzimas digestivas presentes nas larvas no início da alimentação exógena (Segner *et al.*, 1989, 1993; Verreth *et al.*, 1993; Zambonino Infante e Cahu, 1994a; Díaz *et al.*, 1997). Além disso, uma série de resultados recentes, alguns deles contraditórios daqueles anteriormente obtidos, põe em causa a validade desta hipótese.

Ao contrário das estimativas anteriores, Kurokawa *et al.* (1998), conjugando a determinação da actividade enzimática com a técnica ELISA, e utilizando anticorpos contra as proteínas dos rotíferos presentes no intestino das larvas, estimaram um contributo negligenciável (0,6%) das proteases das presas para a digestão larvar. Em concordância, Moyano *et al.* (1996) e Díaz *et al.* (1977) não detectaram a presença de enzimas digestivas dos rotíferos em zimogramas obtidos por electroforese de homogeneizados de larvas alimentadas com estes organismos. Estes autores admitem, contudo, a possibilidade de um contributo inicial das proteases ácidas exógenas, através da autólise das próprias presas, o qual será

rapidamente anulado devido à inactivação dessas enzimas pelo meio alcalino existente no intestino das larvas.

Evidências de um contributo insignificante das proteases exógenas no processo digestivo das larvas são ainda apresentadas por Baragi e Lovell (1986) e por Zambonino Infante e Cahu (1994a), com base na detecção de uma actividade enzimática igual ou mesmo superior em larvas alimentadas com dietas artificiais relativamente a larvas alimentadas com artémia. De igual modo, o facto da destruição pelo calor das enzimas de artémia não se reflectir na actividade proteolítica das larvas que dela se alimentaram, sendo esta comparável à de larvas alimentadas com os mesmos organismos não sujeitos ao tratamento térmico, é sugerida como prova da inexistência de um contributo significativo das proteases exógenas (Baragi e Lovell, 1986; García-Ortega *et al.*, 2000).

Finalmente, os trabalhos de Cahu e Zambonino Infante (1994, 1997) mostram que, apesar da capacidade digestiva das larvas não constituir constrangimento à utilização do alimento artificial, uma transição precoce para um alimento artificial convencional terá como consequência um atraso na sequência normal de maturação das funções digestivas e, portanto, na aquisição da forma adulta de digestão. De acordo com os autores, esse atraso manifesta-se sobretudo ao nível da maturação das células epiteliais do intestino e correspondente produção das peptidases intestinais, sendo responsável pelo inferior rendimento zootécnico larvar obtido com o alimento artificial comparativamente ao alimento vivo.

O atraso da maturação digestiva das larvas quando se utiliza alimento artificial poderá, contudo, ser influenciado através da manipulação da composição da dieta. De facto, verificou-se que a substituição parcial da proteína nativa do alimento por proteína hidrolisada permitia limitar esse atraso, em comparação com o que se verificava quando o alimento continha apenas a proteína nativa, reflectindo-se numa melhor performance larvar (Cahu e Zambonino Infante, 1995a, 1995b; Zambonino Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999). Além disso, elevados níveis lipídicos no alimento promoverão um efeito semelhante (Zambonino Infante e Cahu, 1999).

A ausência de uma digestão prévia pela pepsina, associada à inexistência de estômago funcional, tem sido também apontada como uma causa da má utilização do alimento artificial pelas larvas (Segner *et al.*, 1993; Ueberschär, 1993; Verreth *et al.*, 1993). Tal sugestão baseia-se no argumento de nunca se terem obtido

resultados satisfatórios com este tipo de alimento, a não ser numa fase larvar tardia, supostamente após o desenvolvimento completo da função gástrica. Esta hipótese é, no entanto, contestada por Zambonino Infante e Cahu (1994b) pelo facto de larvas adaptadas ao alimento artificial apresentarem uma maior actividade da pepsina do que larvas alimentadas com artémia, apesar de um crescimento muito inferior, o que leva os autores a assumir que a pepsina, por si só, não assegurará uma elevada eficiência digestiva. Por outro lado, a invocação de espécies agástricas, como os ciprinídeos, que utilizam de forma eficaz as proteínas, torna igualmente pouco consistente a hipótese formulada.

1.1.3. Estudos sobre as necessidades nutricionais das larvas

O conhecimento das necessidades nutricionais das larvas de peixes é ainda bastante reduzido. Tal facto deve-se ao emprego de presas vivas como alimento durante as primeiras fases de desenvolvimento larvar, o que limita a possibilidade de fazer variar de uma forma suficientemente ampla e controlada o teor dos nutrientes, dificultando o estudo das necessidades das larvas.

Na realidade, a quase totalidade destes estudos diz respeito à determinação das necessidades de lípidos e, particularmente, de ácidos gordos, uma vez que é possível o enriquecimento das presas vivas nesses compostos através de técnicas desenvolvidas para o efeito. Dessa forma foram estimadas as necessidades em ácidos gordos essenciais de numerosas espécies (revisões de Izquierdo, 1996; Rainuzzo *et al.*, 1997; Sargent *et al.*, 1997). Tentativas de manipulação do teor em proteína e aminoácidos das presas através do alimento que lhes é fornecido, foram também ensaiadas (Gatesoupe, 1986a, 1986b; Dendrinis e Thorpe, 1987; Frolov *et al.*, 1991). Observou-se que, embora o teor proteico e de aminoácidos totais não se alterasse significativamente, a quantidade de aminoácidos livres das presas era passível de alteração (Gatesoupe, 1986a), sendo igualmente possível o enriquecimento em aminoácidos livres específicos (Gatesoupe, 1986b, Tonheim *et al.*, 2000). Não foram, contudo, efectuadas determinações das necessidades de aminoácidos das larvas baseadas nesta técnica. Verificou-se ainda a possibilidade de enriquecimento das presas em vitaminas (Merchie *et al.*, 1996; Kolkovski *et al.*, 2000) e minerais (Robin, 1989), o que permitiu estimar as necessidades das larvas do pregado em ácido ascórbico (Merchie *et al.*, 1996).

Porém, estimativas precisas das necessidades nutricionais das larvas só poderão conseguir-se mediante a utilização de alimento artificial e, especialmente, de dietas purificadas ou semi-purificadas. De facto, o recurso a dietas purificadas ou semi-purificadas à base de caseína, fornecidas desde o início da alimentação exógena, tem permitido a determinação das necessidades das larvas de carpa comum em vários nutrientes específicos, como proteínas (Sen *et al.*, 1978), ácidos gordos (Radünz-Neto *et al.*, 1994, 1996; Fontagné *et al.*, 1999), fosfolípidos (Geurden *et al.*, 1995, 1997) e ácido ascórbico (Gouillou-Coustans *et al.*, 1998). Contudo, apesar dos bons resultados obtidos com a carpa, estudos deste tipo são escassos em larvas de espécies marinhas (Kanazawa *et al.*, 1983; López-Alvarado e Kanazawa, 1994; Péres *et al.*, 1996), em virtude da má aceitação e deficiente utilização destas dietas.

A fracção azotada do alimento e as necessidades azotadas das larvas

A composição bioquímica do alimento vivo constituiu desde sempre uma referência das necessidades nutricionais das larvas. Watanabe *et al.* (1983) consideraram os organismos zooplancónicos utilizados na alimentação larvar como fontes proteicas de elevado valor no que se refere à sua composição aminoacídica. Da mesma maneira, Tulli e Tibaldi (1997) encontraram uma elevada correlação entre o perfil de aminoácidos essenciais de larvas de *Dentex dentex* e o do alimento vivo, o que indica a inexistência de desequilíbrios alimentares a esse nível. Porém, Conceição (1997) concluiu que, precisamente no que concerne ao perfil de aminoácidos, a artémia não será o alimento ideal para as larvas de peixe gato e do pregado. Apesar de tudo, os estudos com vista à determinação das necessidades das larvas em aminoácidos são muito escassos; do nosso conhecimento, existem apenas dois trabalhos, um em que foram estimadas as necessidades de aminoácidos essenciais em larvas do peixe vermelho (Fiogbe e Kestemont, 1993) e outro em que foi determinado o nível apropriado de incorporação de arginina em dietas semi-purificadas para larvas da dourada japonesa (López-Alvarado e Kanazawa, 1994).

No que diz respeito ao teor proteico, embora sejam referidos para o alimento vivo valores que variam entre cerca de 33 e 73% da matéria seca, os valores médios rondam os 50-60% (Grabner *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1983; Gatesoupe, 1986a; Dendrinós e Thorpe, 1987; Frolov *et al.*, 1991; García-Ortega *et al.*, 1998), correspondendo aos níveis geralmente incorporados no alimento artificial. Sen *et al.* (1978) e Péres *et al.* (1996), com dietas à base de caseína, estimaram as

necessidades proteicas para larvas de carpa comum e de robalo europeu em respectivamente 45% e 50-60%.

Uma importância especial tem sido atribuída aos aminoácidos livres. Segundo alguns autores, os aminoácidos livres constituirão a principal fonte de energia durante o desenvolvimento embrionário dos peixes marinhos, sendo igualmente primordiais no começo da alimentação exógena (Fyhn, 1989, 1993; Rønnestad, 1992; Rønnestad *et al.*, 1998, 1999). De acordo com estes autores, os aminoácidos livres presentes em elevada concentração no alimento vivo serão o suplemento exógeno necessário quando as reservas endógenas esgotam; nesse sentido, a inclusão de aminoácidos livres no alimento artificial é sugerida como fundamental para o bom crescimento e sobrevivência das larvas.

Dabrowski e Rusiecki (1983) haviam já chamado a atenção para uma presumível importância nutricional dos aminoácidos livres do zooplankton para as larvas dos peixes, mas pelo facto destas não possuírem o sistema digestivo completamente formado. Estes e outros autores (Gatesoupe, 1986a; Pan *et al.*, 1991; Frolov e Pankov, 1992) quantificaram os aminoácidos livres de rotíferos e artémia, registando valores entre 1,7 e 4,0% da matéria seca, teores que são fortemente influenciados pela salinidade do meio de cultura dos organismos (Dabrowski e Rusiecki, 1983; Fyhn *et al.*, 1993).

Conjuntamente com os aminoácidos livres, Dabrowska *et al.* (1979) propõem a incorporação nas dietas artificiais para larvas de misturas de proteínas e péptidos, e Walford e Lam (1993) sugerem a inclusão de péptidos de baixo peso molecular. Dabrowski (1984a) refere que na formulação de dietas artificiais alternativas ao zooplankton deverá ser tomada em consideração não apenas a composição aminoacídica, mas também o peso molecular das proteínas. A mesma opinião é partilhada por Hayashi *et al.* (1985), que estimaram em mais de 70% do azoto total dos rotíferos a fracção constituída por aminoácidos livres e péptidos, sublinhando a importância da identificação desses péptidos e a utilização das proporções encontradas para uma formulação adequada do alimento artificial. O trabalho de Hjelmeland *et al.* (1993) contribui nesse sentido, demonstrando que 20-30% da fracção proteica solúvel dos rotíferos será formada por pequenos péptidos (de peso molecular inferior a 1000 Da) e aminoácidos livres.

A importância da forma molecular em que se encontra o azoto fornecido às larvas foi posta em evidência por Szlaminska *et al.* (1993), num ensaio com larvas de

ciprinídeos alimentadas com dietas semi-purificadas. Os autores constataram que uma mistura, em partes iguais, de caseína e caseína hidrolisada conduzia a resultados zootécnicos muito superiores aos que eram obtidos quando as duas formas eram fornecidas isoladamente como única fonte proteica. Além disso, Radünz-Neto *et al.* (1993) verificaram que a incorporação de caseinato de sódio na dieta (uma forma solúvel de caseína, ao contrário da caseína nativa) resultava também em melhores performances larvares. Tais estudos permitem concluir que formas solúveis ou hidrolisadas de proteína contribuirão para uma mais adequada utilização do azoto pelas larvas. Trabalhos posteriores (Cahu e Zambonino Infante, 1995a, 1995b; Zambonino Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999), viriam confirmar os efeitos benéficos da substituição parcial da proteína nativa por proteína hidrolisada, em dietas para larvas de robalo europeu.

Recentemente (Rønnestad *et al.*, 1999; García-Ortega *et al.*, 2000) foi ainda sugerido que a desnaturação das proteínas poderia contribuir para a sua melhor utilização pelas larvas, na medida em que uma alteração estrutural da molécula proteica permitiria uma hidrólise mais eficaz por parte das enzimas pancreáticas larvares.

1.1.4. Progressos na utilização de alimento artificial em larvicultura - casos particulares da carpa (*Cyprinus carpio*) e do robalo (*Dicentrarchus labrax*)

Progressos importantes foram alcançados nos últimos cerca de vinte e cinco anos, no sentido de uma adaptação progressivamente mais precoce das larvas ao alimento artificial. Tais progressos estarão indubitavelmente associados ao cúmulo de conhecimentos sobre a fisiologia e o comportamento das larvas, mas resultarão igualmente dos melhoramentos ao nível do fabrico das micropartículas alimentares e dos vários aspectos relacionados com as técnicas de produção.

Convirá salientar que o alimento artificial, até ao momento, embora promova uma sobrevivência larvar muitas vezes comparável à obtida com o alimento vivo, tem conduzido invariavelmente a taxas de crescimento inferiores. Assim, o interesse da redução da dependência do alimento vivo resulta do compromisso entre as vantagens económicas que daí advêm e o relativo sucesso zootécnico obtido.

Carpa comum

No sentido de estabelecer o momento mais propício para a adaptação ao alimento artificial, Bryant e Matty (1981), utilizando uma dieta comercial para truta, e Dabrowski (1984b), com uma dieta experimental à base de levedura e fígado de porco liofilizado, estimaram respectivamente em 15 mg e 5-6 mg o peso mínimo das larvas a partir do qual essa adaptação conduziria a uma performance larvar aceitável. Em ambos os trabalhos foi reconhecida a importância decisiva da influência da composição do alimento artificial na determinação desta "idade de adaptação", sendo feita referência a outros estudos que conduziram a conclusões muito diversas.

No que diz respeito à utilização de dietas artificiais como único alimento exógeno das larvas, resultados igualmente díspares foram obtidos, dependendo da composição do alimento. O emprego de dietas à base de farinha de peixe e baço de boi resultou em taxas sobrevivência muito baixas e crescimentos reduzidos (Dabrowski *et al.*, 1978; Dabrowska *et al.*, 1979), enquanto que dietas baseadas em levedura promoveram muito bons resultados (Appelbaum, 1977; Appelbaum e Dor, 1978; Hecht e Viljoen, 1982 – citados por Bergot, 1986).

Charlon e Bergot (1984), unicamente com uma dieta à base de levedura e fígado de bovino, mas recorrendo a um sistema de cultura concebido de modo a satisfazer as exigências particulares colocadas por uma alimentação artificial, obtiveram uma sobrevivência larvar de 89% e um peso de 242-400 mg ao fim de quatro semanas, comparáveis aos conseguidos com alimento vivo por outros autores. A mesma tecnologia, transferida para uma escala piloto de produção, possibilitou uma taxa de sobrevivência semelhante e um crescimento larvar acima dos 100 mg aos 24 dias de cultura (Charlon *et al.*, 1986). Os resultados obtidos por estes autores evidenciaram que, simultaneamente à qualidade nutricional do alimento, a sua disponibilidade para as larvas e a qualidade da água constituem factores limitantes do sucesso da cultura larvar à base de alimento artificial (Bergot, 1986).

Robalo europeu

Nos primeiros trabalhos efectuados de reprodução em cativeiro e produção de juvenis de *Dicentrarchus labrax* (Barnabé e René, 1972), as larvas eram alimentadas até aos 60 dias de idade exclusivamente com zooplankton recolhido do meio natural e com artémia, altura em que eram consideradas aptas para uma

alimentação à base de dietas artificiais. Essa possibilidade viria a ser confirmada por Girin *et al.* (1975) que, com uma adaptação progressiva das larvas a um alimento artificial entre os 51 e os 59 dias de idade, obtiveram uma sobrevivência superior a 80% ao fim de um período experimental de 25 dias.

Posteriormente, Barahona-Fernandes e Girin (1976) e Barahona-Fernandes (1978) demonstraram ser possível reduzir a idade de transição para o alimento artificial dos 50 dias (cerca de 40 mg) para os 35 dias (cerca de 10 mg), sem comprometer de forma significativa a sobrevivência e o crescimento das larvas, sendo realçada a importância da qualidade do alimento neste processo. Essa importância é também evidente nos trabalhos de Person-Le Ruyet *et al.* (1989, 1993a, 1993b), que estabeleceram em 20 dias de idade (cerca de 3-5 mg) o limite mínimo para que a transição seja efectuada com resultados satisfatórios, desde que assegurada uma adequada formulação do alimento. Em conformidade, os autores propõem, como estratégia a adoptar, o fornecimento simultâneo de presas vivas e alimento artificial até ser ultrapassado o tamanho crítico (3-5 mg), após o qual as partículas artificiais passariam a constituir o único alimento distribuído às larvas.

Na realidade, ensaios prévios sugeriam a impossibilidade de alimentar as larvas de robalo imediatamente após o esgotamento das reservas endógenas apenas com alimento artificial, uma vez que se obtinham taxas de sobrevivência muito baixas e crescimento insignificante (Barnabé, 1976; Gatesoupe *et al.*, 1977; Cavalier, 1989; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993a). No entanto, muito recentemente, Cahu *et al.* (1998) obtiveram uma sobrevivência apreciável (35%) e um peso de 3,4 mg ao fim de 28 dias, utilizando apenas alimento artificial desde o início da alimentação exógena. Considerando tal sobrevivência, e estando o peso final obtido dentro da gama de valores a partir dos quais deixará de ser problemática a adaptação ao alimento artificial, estes resultados parecem constituir um passo decisivo no sentido da independência completa do alimento vivo na produção desta espécie.

Embora os resultados acima referidos tenham sido obtidos à escala experimental, os progressos à escala de produção são igualmente significativos, tendo permitido baixar a idade de passagem para o alimento artificial dos 60 dias, como acima referido, para os actuais 30-40 dias de vida das larvas (Person-Le Ruyet e Bergot, 1999).

Outras espécies

Também para outras espécies de elevado valor em aquacultura vêm sendo relatados progressos relativamente à utilização de microdietas artificiais, dos quais se salientam os mais recentes e significativos obtidos em *Solea solea* (Appelbaum, 1985), *Solea senegalensis* (Cañavate e Fernández-Díaz, 1999), *Paralichthys olivaceus* (Kanazawa *et al.*, 1989), *Scophthalmus maximus* (Bromley e Howell, 1983; Dhert *et al.*, 1999), *Pagrus major* (Takeuchi *et al.*, 1998), *Sparus aurata* (Yúfera *et al.*, 1999, 2000) e *Gadus morhua* (Baskerville-Bridges e Kling, 2000).

1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho teve como principal objectivo contribuir para o conhecimento do efeito da forma sob a qual é fornecida a proteína da dieta no rendimento zootécnico das larvas de peixes, na perspectiva de se melhorar a utilização do alimento artificial por parte destes organismos. O ponto de partida deste estudo assentou na convicção de que a utilização digestiva das proteínas constituiria um factor limitante na alimentação das larvas com dietas artificiais, pelo que o fornecimento de formas proteicas mais facilmente digeríveis poderia revelar-se vantajoso.

À data do início dos trabalhos, para além da hipótese que sugeria um deficiente equipamento proteolítico das larvas, esta convicção teve como suporte experimental resultados de Mousseau (1988) e de Szlaminska *et al.* (1993), obtidos com larvas de ciprinídeos alimentadas com dietas semi-purificadas, que demonstraram que (i) dietas com caseína como única fonte proteica não sustentavam a sobrevivência das larvas quando fornecidas desde o início da alimentação exógena, sendo no entanto bem utilizadas pelas larvas numa fase posterior e (ii) dietas em que 50% da caseína era substituída por um hidrolisado de caseína sustentavam a sobrevivência e o crescimento das larvas desde o início da alimentação exógena.

O trabalho agora apresentado é constituído por duas partes:

Na primeira parte do trabalho apresentam-se os resultados de uma série de ensaios zootécnicos, em que se testaram dietas artificiais microparticuladas contendo

diferentes hidrolisados proteicos, incorporados a vários níveis. Utilizaram-se hidrolisados comerciais de diversas origens, assim como hidrolisados preparados no laboratório com enzimas seleccionadas para o efeito. Pretendeu-se desta forma verificar, fundamentalmente, o efeito de factores como o nível de incorporação do hidrolisado, o grau de hidrólise e a solubilidade da proteína na utilização do alimento pelas larvas.

A utilização do alimento foi avaliada de acordo com parâmetros zootécnicos - basicamente o crescimento e a sobrevivência - que revelam a resposta global dos organismos às dietas fornecidas.

Os ensaios zootécnicos foram efectuados com larvas de duas espécies: a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*). As larvas de carpa constituem um modelo biológico apropriado para este tipo de estudos devido a apresentarem um tamanho inicial (0,5-0,6 mm de comprimento e 1-2 mg de peso) aproximado do das larvas dos peixes marinhos quando se começam a alimentar exógenamente (0,3-0,4 mm de comprimento e cerca de 0,3 mg de peso, no caso do robalo) e, apesar disso, ser possível alimentá-las desde o início unicamente com dietas artificiais. Com a utilização de larvas de robalo pretendeu-se, na medida do possível, a validação dos resultados obtidos na carpa numa espécie marinha de elevado valor comercial. Por outro lado, tratando-se de espécies com algumas características diferentes (em termos de habitat e quanto à fisiologia digestiva no estado adulto), pareceu-nos interessante comparar a capacidade de utilização da proteína pelos dois tipos de larvas.

Na segunda parte do trabalho procedeu-se à caracterização da fracção azotada das dietas experimentais utilizadas nos vários ensaios zootécnicos, assim como do alimento vivo (o rotífero *Brachionus plicatilis* e o crustáceo *Artemia*) usado de forma generalizada na produção larvar dos peixes. Essa caracterização consistiu na quantificação da fracção azotada solúvel e insolúvel, e na análise dos pesos moleculares da fracção solúvel, de modo a poder estabelecer-se para cada dieta um perfil de distribuição do azoto proteico. Procurou-se, assim, clarificar a relação entre o perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais e os resultados zootécnicos obtidos, bem como compreender a importância relativa das várias fracções azotadas na expressão desses resultados.

2. MATERIAL E METODOLOGIA GERAL

2.1. MATERIAL ANIMAL

2.1.1. Larvas de robalo (*Dicentrarchus labrax*)

As larvas de robalo utilizadas nos vários ensaios zootécnicos foram obtidas directamente de pisciculturas comerciais ou de ovos fornecidos por essas pisciculturas e incubados no laboratório.

2.1.1.1. Transporte e aclimação dos ovos e das larvas

Os ovos e as larvas de robalo foram transportados desde as pisciculturas até ao laboratório da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" em sacos de plástico apropriados, com água do sistema de proveniência devidamente oxigenada. No laboratório, os sacos de transporte com os ovos ou as larvas eram colocados em tanques do sistema de incubação ou de cultura até que a sua temperatura igualasse a do sistema. Nessa altura, procedia-se à distribuição dos ovos ou das larvas pelos tanques de incubação ou de cultura. Os ensaios experimentais em que se utilizaram larvas provenientes de pisciculturas tinham início no dia seguinte ao da chegada das larvas ao laboratório.

2.1.1.2. Incubação dos ovos

Os ovos foram incubados num tanque cilíndrico-cónico de 100 l de capacidade, acoplado ao sistema experimental, em circuito semi-fechado com água do mar, com regulação térmica (resistência equipada com termostato). Os tanques eram providos de aerificação desde o fundo, de forma a manter os ovos em circulação na coluna de água. A incubação foi efectuada na obscuridade, à temperatura de 20°C, e a uma salinidade de cerca de 38‰ (conseguida por adição de sal marinho artificial à água do mar). Diariamente, os ovos mortos, que depositavam, eram eliminados através da abertura da torneira existente no fundo do tanque, para impedir a proliferação de bactérias.

2.1.1.3. Cultura das larvas com alimento vivo

Após a eclosão, procedia-se à diminuição da aerificação e as larvas recém-eclodidas eram mantidas nos tanques de incubação, igualmente em condições de obscuridade, até à reabsorção completa da vesícula vitelina. Nesse momento iniciava-se o fornecimento de alimento, constituído exclusivamente por náuplios recém-eclodidos de artémia.

Diariamente, uma determinada quantidade de quistos de artémia era colocada a incubar, de modo a que a eclosão ocorresse na manhã do dia seguinte. Nessa altura, os náuplios eram recolhidos e concentrados, e uma primeira dose era fornecida às larvas de modo a perfazer uma concentração de 3-5 náuplios/ml nos tanques de cultura larvar. Os restantes náuplios eram colocados no frigorífico, com aerificação, e fornecidos como uma segunda dose (igual à primeira) ao final da tarde.

A temperatura da água foi mantida a 20°C e o fotoperíodo regulado para 16 horas luz/8 horas obscuridade. A salinidade foi gradualmente reduzida até ao valor normal da água do mar (32-33‰). As larvas mortas eram eliminadas diariamente através da abertura da torneira existente no fundo do tanque.

As larvas foram mantidas nas condições descritas até à sua utilização no ensaio experimental (25 dias após a eclosão).

2.1.2. Larvas de carpa (*Cyprinus carpio*)

As larvas de carpa utilizadas nos vários ensaios zootécnicos foram obtidas através de reprodução artificial de animais mantidos em cativeiro na Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre".

2.1.2.1. Reprodução artificial da carpa e incubação dos ovos

Os reprodutores foram obtidos no Posto Aquícola de Mira e transportados para o laboratório em tanques apropriados, com aerificação. Chegados ao laboratório, foram colocados em tanques no exterior durante 2-3 dias, em jejum. De seguida eram sujeitos a um tratamento sanitário com uma solução de formol-verde malaquite ou de sulfato de magnésio e colocados num tanque no interior, em

circuito fechado e com regulação térmica. A partir desta altura os animais passavam a ser alimentados com ração comercial. Outros tratamentos sanitários eram efectuados sempre que se entendesse necessário.

Quando se pretendia obter uma postura, aumentava-se progressivamente a temperatura da água (1-2°C por dia) até aos 22-24°C, para induzir a maturação dos ovócitos. Ao fim de cerca de 200 graus-dia, os animais eram retirados do tanque e anestesiados, verificando-se o estado de maturação dos ovócitos. Para tal, estes eram recolhidos através de um cateter introduzido no orifício urogenital das fêmeas, tornados translúcidos com um tratamento com fixador de Serra, e observados à lupa. No caso de se encontrarem suficientemente maduros procedia-se à indução da postura no dia seguinte, caso contrário os reprodutores eram mantidos durante mais alguns dias a 22-24°C até à adequada maturação dos ovócitos.

A postura era induzida por aplicação de duas injeções intraperitoniais de extracto de hipófise (extracto comercial de hipófise de carpa) homogeneizado numa solução 8‰ de NaCl, intervaladas de 220 graus-hora. A primeira injeção era de 0,5 mg de extracto de hipófise/kg de peso vivo, e a final de 3,5 mg/kg de peso vivo para as fêmeas e de 1,5 mg/kg de peso vivo para os machos.

Aproximadamente 200-280 graus-hora depois da segunda injeção recolhiam-se os óvulos e o esperma através de compressão abdominal. Estes eram de seguida misturados durante cerca de 10 minutos na presença de um diluidor apropriado, para que ocorresse a fecundação. Seguia-se um tratamento dos ovos numa solução de tanino 0,5 g/l de água (dois banhos de 30 segundos separados por um banho em água) para eliminação da camada adesiva que os envolve. Finalmente, os ovos eram colocados sobre tabuleiros de rede num sistema de incubação em circuito fechado, mantido na obscuridade e termo-regulado a 19-20°C. As larvas recém-eclodidas eram mantidas neste sistema até serem utilizadas nos ensaios experimentais, após a completa reabsorção da vesícula vitelina.

2.1.3. Rotíferos (*Brachionus plicatilis*) e náuplios de *Artemia*

Os rotíferos e os náuplios de artémia utilizados para análise da fracção proteica, assim como os náuplios de artémia empregues como alimento das larvas de robalo, foram produzidos no laboratório. No caso dos rotíferos procedeu-se à sua cultura à

base de microalgas, também elas produzidas no laboratório. Os náuplios de artémia foram obtidos por incubação de quistos comercialmente disponíveis.

2.1.3.1. Produção de microalgas

Utilizou-se a alga unicelular *Nannochloropsis* sp. como alimento dos rotíferos. As culturas algais, iniciadas a partir de um inóculo proveniente de um *stock* mantido no laboratório, foram efectuadas em balões de 5 litros. O meio de cultura consistia em água do mar (filtrada e autoclavada) enriquecida (10 ml/l) com o meio de Fábregas *et al.* (1984). As culturas foram mantidas em sala com temperatura controlada ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) e em condições de aerificação intensa e iluminação contínua. A suspensão algal era recolhida durante a fase exponencial de crescimento e fornecida aos rotíferos.

2.1.3.2. Produção de rotíferos

O rotífero *Brachionus plicatilis* foi produzido em balões de 5 litros, com água do mar (filtrada e autoclavada) diluída com água desionizada, de modo a obter-se uma salinidade de cerca de 15 ‰. A cultura decorreu em sala com temperatura controlada ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) e em condições de aerificação suave e iluminação contínua. A microalga *Nannochloropsis* sp. foi fornecida aos rotíferos como único alimento.

Foram recolhidos para análise rotíferos alimentados e rotíferos sujeitos a 24 horas de jejum. No primeiro caso, a água da cultura, contendo ainda microalgas, era filtrada através de uma rede de 50 μm de malha, sendo os rotíferos recolhidos, lavados com água destilada, congelados e posteriormente liofilizados. No caso dos rotíferos sujeitos a jejum, os rotíferos recolhidos por filtração eram ressuspensos em meio sem microalgas, onde permaneciam 24 horas; em seguida eram novamente recolhidos por filtração, lavados com água destilada, congelados e posteriormente liofilizados.

2.1.3.3. Obtenção dos náuplios de *Artemia*

A incubação dos quistos de artémia realizou-se em recipientes do tipo de Zoug com água do mar (filtrada e esterilizada), num banho-maria a cerca de 35°C , em condições de aerificação intensa e iluminação contínua. Após a eclosão (ao fim de cerca de 16-20 horas), os náuplios eram recolhidos numa rede de 50 μm de malha,

lavados com água destilada e, consoante os casos, fornecidos como alimento às larvas de robalo ou congelados e depois liofilizados para posterior análise.

Seleccionou-se uma estirpe de artémia (INVE, tipo AF) caracterizada pelos náuplios de pequenas dimensões ($\pm 430 \mu\text{m}$), que possibilita a alimentação das larvas de robalo sem recurso ao fornecimento de rotíferos. Para além disso, esta estirpe de artémia apresenta um perfil natural muito elevado de ácidos gordos essenciais para as larvas dos peixes marinhos (n3-HUFA), não sendo por isso necessário proceder ao seu enriquecimento prévio nestes compostos.

2.2. ENSAIOS ZOTÉCNICOS

2.2.1. Sistema experimental

Utilizou-se um sistema de recirculação de água (figura 2.1), com distribuição automática de alimento, semelhante ao descrito por Charlon e Bergot (1984).

Os distribuidores de alimento, descritos por Charlon e Bergot (1986), possuem uma abertura regulável e estão fixos a um eixo rotativo comandado por um motor eléctrico controlado por um temporizador, possibilitando que uma determinada quantidade de partículas alimentares seja distribuída pela superfície da água em cada revolução (figura 2.2).

Cada unidade experimental é constituída por duas bacias de plástico, uma interna (volume de 6 l) onde se colocam as larvas, com paredes laterais em rede de 250 μm de malha, e outra externa (volume de 14 l), com uma abertura, servindo para a manutenção do nível da água.

A água é distribuída a partir de uma caleira superior para as unidades experimentais (2×15 unidades), sendo recolhida por uma caleira inferior. À saída de cada unidade é colocada uma pequena esponja que funciona como filtro mecânico, para reter eventuais partículas em suspensão, e que é substituída diariamente. Toda a água recolhida pela caleira inferior é novamente filtrada através de uma esponja para um reservatório (volume de 250 l) com um filtro biológico, para onde também é conduzida a água em excesso da caleira superior. Uma bomba eléctrica faz circular a água do reservatório do filtro biológico para um outro reservatório (volume de 90 l) situado superiormente. Deste reservatório a

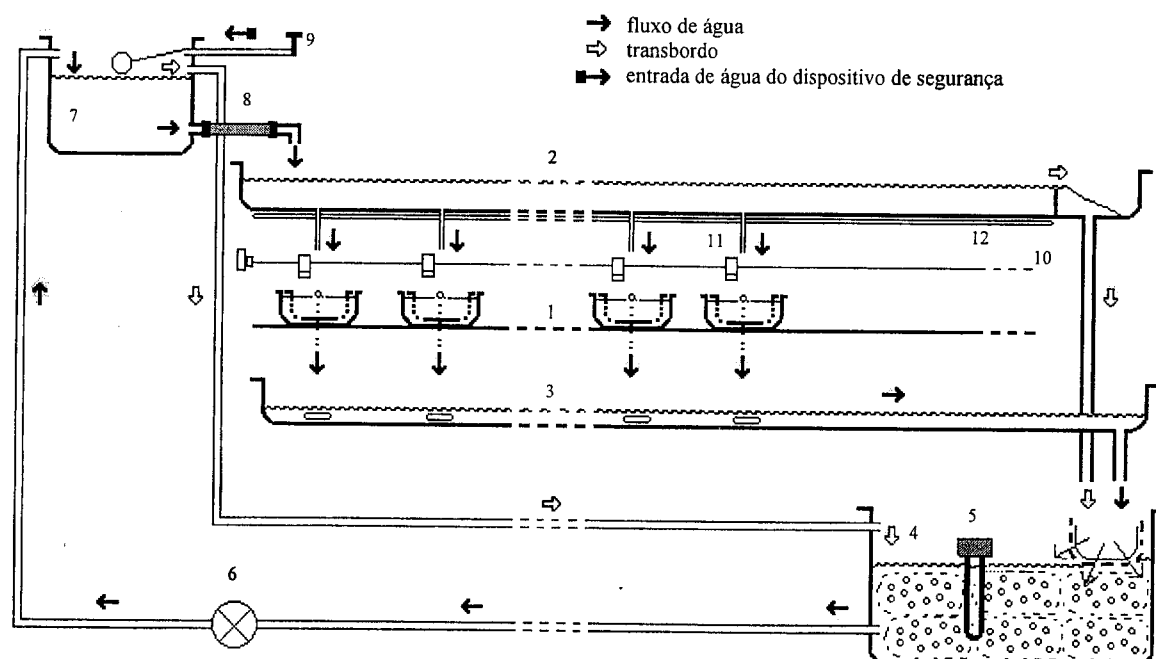


FIGURA 2.1. Esquema do sistema experimental (baseado em Charlon e Bergot, 1984). 1 – unidades experimentais; 2 – caleira superior; 3 – caleira inferior; 4 – reservatório de água com filtro biológico; 5 – resistência para aquecimento da água; 6 – bomba de água; 7 – reservatório de água com dispositivo de segurança; 8 – lâmpada de UV; 9 – entrada de água do dispositivo de segurança; 10 – eixo de rotação dos distribuidores de alimento; 11 – distribuidor de alimento; 12 – lâmpadas fluorescentes.

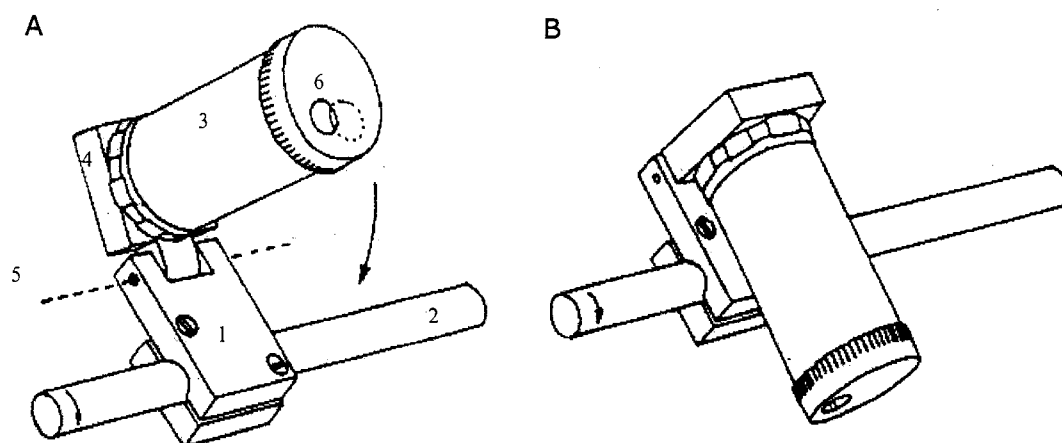


FIGURA 2.2. Pormenor dos elementos dos distribuidores de alimento (A) e vista em fase de distribuição (B) (Charlon, 1990). 1 - elemento de fixação; 2 - eixo de rotação; 3 - contentor do alimento; 4 - placa de fixação do contentor; 5 - eixo de articulação; 6 - tampa do contentor com orifício regulável.

água passa por gravidade para a caleira superior, depois de ter sido esterilizada ao atravessar um filtro de UV, e daí para as unidades experimentais. No reservatório superior encontra-se montada uma válvula de segurança, provida de uma bóia que permite a entrada de água no sistema sempre que o nível baixa, prevenindo assim a falta de circulação de água nas unidades experimentais em caso de corte de energia eléctrica.

A termoregulação da água é conseguida através de uma resistência controlada por um termostato, introduzida no reservatório inferior. As unidades experimentais são iluminadas através de lâmpadas fluorescentes situadas acima da caleira superior. Estas lâmpadas são controladas por um temporizador, possibilitando a regulação do fotoperíodo.

2.2.2. Protocolo experimental

Em cada ensaio, os vários grupos experimentais eram constituídos por distribuição aleatória das larvas, em igual número, pelas unidades experimentais. Durante o ensaio o fornecimento das dietas era efectuado pelos distribuidores automáticos, regulados para realizar 4-5 distribuições cada 10 minutos durante o período de luz. A quantidade de alimento distribuída era regulada de forma a haver um excesso de alimento nos tanques. Em todos os ensaios foi constituído um grupo que era mantido em jejum (em duplicado), com o objectivo de confirmar uma eventual recirculação de matéria orgânica no sistema, passível de servir de alimento às larvas.

Diariamente procedia-se à retirada e contagem das larvas mortas e à transferência dos sobreviventes para tanques limpos, como descrito por Charlon & Bergot (1984). O tanque interior, onde se encontravam as larvas, era levantado lentamente de forma a que a maior parte da água escoasse através da rede das paredes e as larvas ficassem concentradas no fundo. O resto da água, com as larvas concentradas, era de seguida vertido cuidadosamente, através de um dos ângulos do tanque, para um conjunto de dois tanques limpos e previamente cheios com água de um tanque de reserva. Deste modo, a maior parte dos restos de alimento permanecia nos tanques substituídos, e era efectuada uma renovação diária da água do sistema, equivalente a cerca de 30% do volume total. A água usada para encher os tanques limpos era mantida no tanque de reserva desde o dia anterior (com aerificação e à temperatura do sistema). O teor em amónia, nitritos e

nitratos na água do sistema era periodicamente monitorizado recorrendo a *kits* de análise.

Periodicamente, recolhiam-se aleatoriamente 10 peixes por unidade experimental. Os exemplares amostrados eram anestesiados com éter etilenoglicol-monofenílico, efectuando-se de seguida a determinação do comprimento total ou do peso fresco. O comprimento era determinado recorrendo a uma lupa binocular ou, quando disponível, a um sistema de recolha e análise de imagem. A pesagem realizava-se nos animais em grupo, numa balança de precisão (com um rigor de 0,01 mg), após secagem dos exemplares sobre papel absorvente. No final dos ensaios os sobreviventes de cada unidade experimental eram mantidos cerca de 24 horas em jejum, sendo depois contados e pesados em conjunto (após secagem sobre papel absorvente). Alterações a este protocolo geral estão devidamente indicadas na descrição das experiências em causa.

2.3. PREPARAÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

A composição das diferentes dietas experimentais apresenta-se nos respectivos capítulos. O processo de preparação dessas dietas, que foi o mesmo em todos os casos, descreve-se de seguida.

Sempre que necessário, os ingredientes sólidos utilizados nas dietas experimentais eram previamente peneirados através de um crivo com 100 μm de malha, de modo a obterem-se partículas com diâmetro inferior àquele. Após pesagem, os ingredientes sólidos eram misturados a seco, numa misturadora eléctrica. Quando a mistura se tornava homogénea acrescentavam-se os ingredientes líquidos (óleos e fosfatidilcolina previamente dissolvida em água destilada) emulsionados em água destilada, efectuando-se nova homogeneização. Seguia-se a adição de água destilada até se formar uma pasta suficientemente compacta, que era passada numa máquina de picar carne com um crivo de 0,5 mm. Obtinha-se assim uma pasta sob a forma de esparguete, que era seca numa estufa a cerca de 40°C durante 24-48 horas. Depois da secagem procedia-se à sua trituração, numa trituradora eléctrica, e as partículas resultantes eram peneiradas através de uma bateria de crivos de malha decrescente (600, 400, 200 e 100 μm), que as separava em três classes de tamanho (100-200, 200-400 e 400-600 μm), para utilizar consoante o tamanho das larvas.

2.4. PREPARAÇÃO DE HIDROLISADOS DE FARINHA DE PEIXE

Para além de hidrolisados proteicos comerciais, utilizaram-se hidrolisados de farinha de peixe fabricados no nosso laboratório. Refere-se seguidamente o seu modo de preparação.

Foram preparados três hidrolisados de farinha de peixe (farinha de peixe LT, Dinamarca), diferindo pelo tipo de tratamento enzimático a que foram sujeitos: hidrolisado P, obtido por digestão pela pepsina (pepsina comercial); hidrolisado PT, obtido por digestão pela pepsina e de seguida pela tripsina (Merck 8367); hidrolisado PP, obtido por digestão pela pepsina e de seguida pela pancreatina (Merck 1.07130).

Na tabela 2.1 resumem-se as condições de hidrólise, de acordo com a enzima utilizada. O processo de hidrólise foi efectuado em gobelés de 1-2 litros nos quais se formaram suspensões da farinha de peixe em água destilada. A pepsina, previamente dissolvida em água destilada, era então adicionada, ajustando-se de seguida o pH da suspensão ao valor óptimo de actividade enzimática (utilizando HCl). Os gobelés eram colocados num banho-maria a 40°C, deixando-se decorrer a reacção durante 72 horas. No caso dos hidrolisados PT e PP, após a actuação da pepsina adicionava-se a segunda enzima e ajustava-se o pH ao valor óptimo da sua actividade (com NaOH), voltando-se a incubar os gobelés durante 22 horas. A intervalos de tempo regulares, agitavam-se os gobelés de forma a ressuspender a matéria sólida que entretanto ia depositando, tornando assim mais eficaz o processo de hidrólise.

TABELA 2.1. Condições de hidrólise e enzimas utilizadas nos respectivos processos.

Enzima	Pepsina	Tripsina	Pancreatina
Matéria-prima : água destilada (p/v)	1:10	1:10	1:10
Matéria-prima : enzima (p/p)	100:1	100:1	100:1
pH da suspensão	2,0	7,5	7,5
Temperatura de incubação (°C)	40	40	40
Tempo de incubação (h)	72	22	22

No final da hidrólise procedia-se à neutralização da solução (com NaOH ou HCl) e seguidamente à inactivação da(s) enzima(s), aquecendo-se para o efeito a mistura a cerca de 80°C durante 10-15 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a mistura era deixada a repousar no frigorífico para sedimentação do material sólido. O sobrenadante era então filtrado através de lã de vidro, colocado em placas de Petri e imediatamente congelado (-20°C), até ser liofilizado. O precipitado que restava após a filtração do sobrenadante era centrifugado e seguidamente filtrado, conseguindo-se assim recuperar um volume adicional de sobrenadante, o qual era igualmente congelado e posteriormente liofilizado. O material liofilizado guardava-se em recipientes hermeticamente fechados, a -4°C, até ser utilizado.

2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

A análise da composição química das matérias primas, dietas, rotíferos e artémia foi executada de acordo com os métodos a seguir descritos.

2.5.1. Determinação da matéria seca

A matéria seca foi determinada por secagem das amostras em estufa a 105°C, até peso constante.

2.5.2. Determinação das cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração das amostras numa mufla a 550°C, durante 16 horas.

2.5.3. Determinação da gordura bruta

A gordura bruta das amostras foi determinada através do método de Soxhlet, após extracção com éter de petróleo, utilizando um extractor *Soxtec System HT - Tecator*.

2.5.4. Determinação da proteína bruta

A proteína bruta foi calculada determinando o azoto das amostras pelo método semi-micro de Kjeldhal, num sistema *Kjeltec System 1002 - Tecator*, e multiplicando o valor obtido de azoto pelo factor 6,25.

2.5.5. Determinação da energia bruta

A energia bruta foi determinada por combustão directa das amostras numa bomba calorimétrica adiabática (Parr 1261).

2.5.6. Determinação do azoto solúvel

O azoto solúvel das amostras foi determinado a pH 8,0 em tampão fosfato 0,07 M e em água (pH 5,6), com base no método descrito por Araba & Dale (1990). As amostras, previamente tamisadas através de um crivo de 100 µm de malha, foram dispersas no tampão fosfato ou em água (20 mg/ml), por sonicação durante 1 minuto, e depois agitadas durante 15 minutos em placa magnética. Seguiu-se a centrifugação da mistura a 3000 rpm durante 15 minutos, após o que o sobrenadante era decantado e filtrado (filtro Whatman nº 182 20 47) em vácuo. Num volume de 15 ml de filtrado de cada amostra (em duplicado), assim como nas amostras não tratadas, foi quantificado o teor de azoto através do método de Kjeldhal, exprimindo-se o azoto solúvel como percentagem do azoto total.

2.5.7. Análise cromatográfica (HPLC) da fracção azotada solúvel

Apenas a fracção azotada solúvel a pH 8,0 em tampão fosfato foi usada para análise cromatográfica. O volume restante de filtrado obtido em 2.5.6 foi congelado e posteriormente liofilizado. Os liofilizados das várias amostras, assim como os produtos originais no caso dos hidrolisados de farinha de peixe e dos hidrolisados comerciais de caseína, foram dissolvidos em tampão fosfato 0,07 M (pH 8,0) numa concentração de 10 mg/ml, e as respectivas soluções filtradas através de um filtro de 0,2 µm de poro. Estas soluções foram analisadas por cromatografia líquida de filtração em gel num HPLC, para determinação do perfil de distribuição de pesos moleculares, com base nos métodos descritos por Boza *et al.* (1994) e Silvestre *et al.* (1994). Várias substâncias de peso molecular conhecido foram utilizadas como padrões – albumina sérica bovina (Sigma A-4503), ribonuclease A (Sigma R-5250), cadeia A da insulina (Sigma I-1633), Val-Ala-Ala-Phe (Sigma V-8251), Tyr-Tyr-Tyr (Sigma T-2007), triptofano (Sigma T-9753), tirosina (Sigma T-8909) e ácido p-aminobenzóico (Sigma A-0129).

O sistema de HPLC utilizado (Merck-Hitachi, LaChrom) consistia de um módulo de bombas (L-7100), um injector automático (L-7200), um detector de UV (L-7450) e um interface (L-7000), estando conectado a um computador equipado com o *software* HSM (D-7000). Empregou-se uma coluna TSK-Gel G2000 SW_{XL} (TosoHaas) com 300 × 7,8 mm e 5 µm de tamanho de partícula, e como eluente

uma solução de Na₂SO₄ 0,1 M em tampão fosfato 0,07 M (pH 7,4). Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultra-pura e desgaseificadas por aplicação de ultra-sons durante 15 minutos.

De cada solução (de amostras e padrões) foi injectado um volume de 100 µl, sendo o efluente da coluna monitorizado ao comprimento de onda de 230 nm, em corridas de 20 minutos com um fluxo de 1 ml/minuto.

As áreas dos picos de absorvência dos cromatogramas foram integradas, e os valores expressos como percentagem da área total.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de cada parâmetro avaliado nos diferentes ensaios zootécnicos (1ª parte) foram submetidos a análise de variância (quando necessário após as transformações adequadas para homogeneizar as variâncias), seguida do teste de Newman-Keuls sempre que eram detectadas diferenças para um nível de significância de 0,05. Estas análises foram efectuadas recorrendo ao programa informático *Statgraphics* (versão 7.0). As análises de regressão e de componentes principais que constam na 2ª parte do trabalho foram efectuadas com o programa informático *Statistica* (versão 5.5).

2.7. DEFINIÇÃO DE TERMOS UTILIZADOS

- Biomassa final teórica (PS)

$$PS (g) = PMf \times Sf$$

PMf: peso médio final (g),
Sf: sobrevivência final (%)

- Taxa de crescimento específico (TCE)

$$TCE (\%) = \frac{\ln(PMf) - \ln(PMi)}{t} \times 100$$

PMf: peso (ou comprimento total) médio final (mm)
PMi: peso (ou comprimento total) médio inicial (mm)
t: intervalo de tempo (dias)

1^a PARTE

EXPERIÊNCIAS ZOOTÉCNICAS

3. UTILIZAÇÃO DE HIDROLISADOS COMO ÚNICA FONTE PROTEICA DA DIETA

3.1. INTRODUÇÃO

Szlaminska *et al.* (1993) observaram que uma dieta contendo uma mistura de caseína e caseína hidrolisada conduzia a um rendimento zootécnico muito superior, em larvas de peixe vermelho, àquele obtido quando cada um dos ingredientes era utilizado isoladamente. Tais resultados realçam a importância da forma como a proteína é fornecida às larvas, sugerindo um efeito negativo da inclusão de hidrolisados quando estes constituem a única fonte proteica da dieta. O presente trabalho teve como principal objectivo procurar confirmar esta hipótese. Para tal, comparou-se o rendimento zootécnico de larvas de carpa alimentadas com dietas contendo como única fonte proteica um hidrolisado de farinha de peixe isolado ou misturado com vários outros hidrolisados relativamente a uma dieta com uma fonte proteica hidrolisada e outra não hidrolisada. As dietas que apenas continham hidrolisados como fonte proteica diferiam entre si quanto à origem desses hidrolisados.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Esta experiência - experiência 1 - foi realizada no INRA – Station d'Hydrobiologie de Saint-Pée-sur-Nivelle (França), no sistema original de Charlon e Bergot (1984), semelhante ao descrito no capítulo 2. O ensaio foi efectuado com larvas de carpa, tendo-se fornecido as dietas microparticuladas desde o início da alimentação exógena. A experiência decorreu nas condições descritas na tabela 3.1.

Foram testadas nove dietas, em duplicado, que diferiam quanto às fontes proteicas utilizadas (tabela 3.2). Na dieta FH a fonte proteica era constituída apenas por um hidrolisado de farinha de peixe, o qual foi substituído a 50% por outros hidrolisados nas dietas SH, MH, CFH, LH, CH1 e CH2, e por uma proteína não hidrolisada (caseína) na dieta C (dieta controle). Uma dieta à base de levedura, de formulação idêntica à utilizada por outros autores e que conduz a uma elevada sobrevivência e a um crescimento satisfatório (Radünz-Neto *et al.*, 1994, 1996; Geurden *et al.*, 1995), foi usada como referência. O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais (determinado apenas para as dietas Y, FH, C e CH1) apresenta-se no

capítulo 7 (tabela 7.4), por razões que se prendem com o modo como o trabalho foi organizado.

Aos dias 6, 10, 14, 17 e 21 do período experimental procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito um sistema semi-automático de análise de imagem (*VIDS, Systèmes Analytiques, França*).

TABELA 3.1. Condições experimentais na experiência 1.

Espécie	<i>C. carpio</i>
Comprimento inicial (mm)	6,9
Larvas por tanque	205
Período experimental (dias)	21
Temperatura (°C)	24±1 ¹
Salinidade (‰)	0
Fotoperíodo (h, luz:obscuridade)	14:10
Fluxo de água (l min ⁻¹)	0,4 - 0,8
Diâmetro da partícula alimentar (µm)	
1ª semana	100-200
2ª semana	200-400
3ª semana	400-600

¹Temperatura gradualmente elevada de 19,5±1 para 24±1°C entre o dia 0 e o dia 4, e mantida a 24±1°C após o dia 4.

3.3. RESULTADOS

Entre o 9º e o 11º dias do ensaio morreu a maior parte das larvas mantidas em jejum, tendo todas acabado por morrer ao 12º dia. Nos restantes grupos, independentemente da dieta utilizada, verificou-se uma sobrevivência elevada durante todo o período experimental (figura 3.1). Encontraram-se, contudo, diferenças significativas de sobrevivência entre os vários grupos (tabela 3.3); no final do ensaio obteve-se a melhor sobrevivência com a dieta de referência (dieta Y) e a pior com as dietas LH e FH. Com a dieta LH a sobrevivência foi inferior à dos outros grupos ao longo de todo o ensaio, enquanto que com a dieta FH decaiu acentuadamente na última semana experimental.

Durante o ensaio o tamanho das larvas foi significativamente maior nos grupos alimentados com a dieta em que apenas 50% da proteína era hidrolisada (dieta C) e com a dieta de referência do que nos restantes grupos. Nos grupos alimentados

TABELA 3.2. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas na experiência 1.

Dietas	Y	FH	SH	MH	C	CFH	LH	CH1	CH2
<i>Ingredientes (% ms)</i>									
Levedura ¹	80,0	—	—	—	—	—	—	—	—
Hidrolisado de peixe ²	—	70,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Hidrolisado de caseína ^{1 3}	5,0	—	—	—	—	—	—	35,0	—
Hidrolisado de caseína ^{2 4}	—	—	—	—	—	—	—	—	35,0
Hidrolisado de lactalbumina ⁵	—	—	—	—	—	—	35,0	—	—
Hidrolisado de soja ⁶	—	—	35,0	—	—	—	—	—	—
Hidrolisado de carne ⁷	—	—	—	35,0	—	—	—	—	—
Hidrolisado de bacalhau ⁸	—	—	—	—	—	35,0	—	—	—
Caseína ⁹	—	—	—	—	35,0	—	—	—	—
Dextrina ¹⁰	—	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Mistura vitamínica ¹¹	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Mistura mineral ¹²	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Fosfatidilcolina ¹³	—	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Composição analítica</i>									
Matéria seca (ms, %)	93,6	94,3	92,3	92,1	93,6	93,4	92,7	92,0	92,1
Proteína bruta (% ms)	47,7	52,3	56,9	63,3	62,6	52,7	56,0	56,7	55,9
Cinzas (% ms)	12,4	9,3	10,5	9,4	7,2	11,3	9,6	9,9	9,7
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	18,7	23,0	21,2	20,6	23,5	21,2	20,8	21,3	21,8

¹ Protibel, Bel Industries, França; ² CPSP, Sopropêche, França; ³ N-Z Amine A, Sigma C0626; ⁴ N-Z Amine AS, Sigma N4517; ⁵ Edamin S, Sigma L0375; ⁶ N-Z-Soy Peptone, Sigma P1265; ⁷ Peptone Type I, Sigma P7750; ⁸ Gadolysat, Kurios, França; ⁹ Prolabo nº 22.544.292; ¹⁰ Sigma D2256; ¹¹ EIFAC (1971) (mg/kg mistura): retinol, 750000 (IU/kg mistura); calciferol 150000 (IU/kg mistura); α -tocopherol, 3000 (IU/kg mistura); menadiona sódio-bis, 250; tiamina, 750; riboflavina, 1500; pantotenato de cálcio, 2500; ácido nicotínico, 8750; piridoxina, 750; ácido fólico, 250; cianocobalamina, 1,5; biotina, 6250; ácido ascórbico, 25000; inositol, 50000; colina 50%, 200000; ¹² Luquet (1971) (mg/kg mistura): sulfato de cobalto, 20; sulfato de cobre, 3000; sulfato de ferro, 20000; fluoreto de sódio, 1000; iodeto de potássio, 40; carbonato de magnésio, 124000; sulfato de manganésio, 3000; sulfato de zinco, 4000; fosfato dicálcico 500000; cloreto de potássio, 90000; cloreto de sódio, 40000; cloreto de cálcio 215000.; ¹³ Sigma P9671

TABELA 3.3. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final e biomassa final teórica das larvas na experiência 1.

Dietas	Y	FH	SH	MH	C	CFH	LH	CH1	CH2	Erro da média
Sobrevivência (%)										
dia 6	98 ^a	89 ^{ab}	90 ^{ab}	92 ^{ab}	98 ^a	97 ^a	83 ^b	91 ^{ab}	86 ^b	1,826
dia 14	98 ^a	87 ^{abc}	87 ^{abc}	85 ^{abc}	94 ^{ab}	95 ^{ab}	79 ^c	90 ^{abc}	82 ^{bc}	2,794
dia 21	98 ^a	72 ^c	87 ^{ab}	82 ^{bc}	90 ^{ab}	95 ^{ab}	74 ^c	89 ^{ab}	82 ^{bc}	2,769
Comprimento (mm)										
dia 6	8,8 ^b	8,1 ^c	8,1 ^c	7,4 ^c	9,5 ^a	8,1 ^c	8,0 ^c	7,7 ^c	7,6 ^c	0,142
dia 14	12,8 ^a	11,2 ^b	11,2 ^b	8,7 ^c	13,4 ^a	10,9 ^b	10,5 ^b	10,8 ^b	9,7 ^b	0,305
dia 21	16,3 ^a	12,9 ^{bc}	13,9 ^b	9,1 ^d	17,5 ^a	13,7 ^b	11,1 ^c	14,3 ^b	12,9 ^{bc}	0,485
TCE (%)										
dias 0-6	4,2 ^b	2,8 ^c	2,7 ^c	1,2 ^d	5,4 ^a	2,7 ^c	2,6 ^c	1,9 ^{cd}	1,7 ^{cd}	0,296
dias 6-14	4,6 ^a	4,2 ^{ab}	4,0 ^{ab}	2,0 ^b	4,2 ^{ab}	3,7 ^{ab}	3,3 ^{ab}	4,2 ^{ab}	3,0 ^{ab}	0,430
dias 14-21	3,5 ^a	2,0 ^{ab}	3,1 ^a	0,7 ^b	3,9 ^a	3,3 ^a	0,8 ^b	4,0 ^a	4,0 ^a	0,599
Peso (mg.ind ⁻¹)	55,4 ^b	24,7 ^{cd}	27,3 ^{cd}	7,8 ^e	82,8 ^a	24,8 ^{cd}	15,8 ^d	34,6 ^c	24,6 ^{cd}	2,467
Biomassa (g)	5,4 ^b	1,8 ^d	2,4 ^{cd}	0,6 ^e	7,5 ^a	2,4 ^{cd}	1,2 ^{de}	3,1 ^c	2,0 ^{cd}	0,261

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

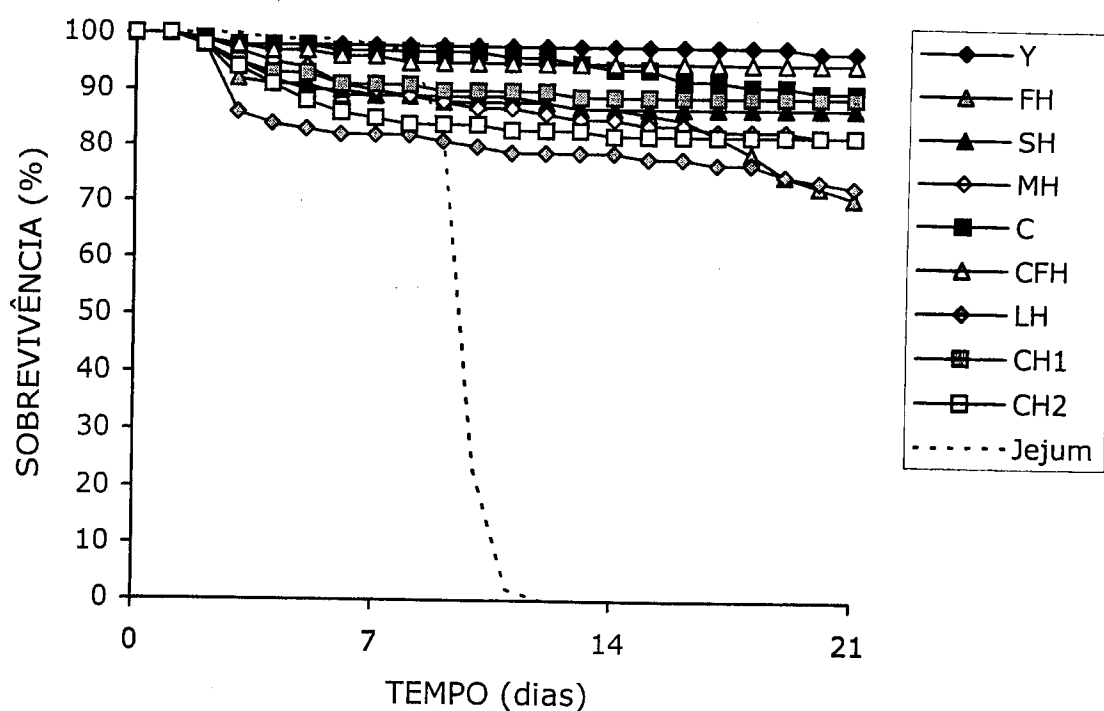


FIGURA 3.1. Sobrevivência larvar na experiência 1.

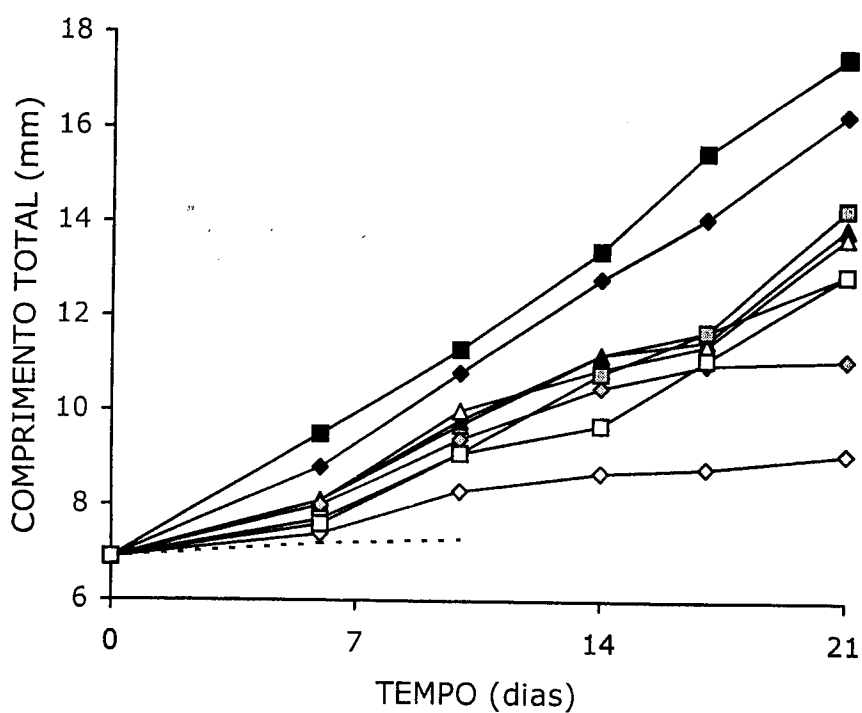


FIGURA 3.2. Crescimento larvar na experiência 1 (ver legenda da figura 3.1).

com dietas contendo hidrolisados como única fonte proteica o tamanho final foi significativamente menor com a dieta MH do que com as outras dietas; foi também significativamente menor com a dieta LH do que com as dietas SH, CFH e CH1 (tabela 3.3, figura 3.2).

A análise dos valores da taxa de crescimento específico (tabela 3.3) mostra que o maior tamanho final das larvas registado nos grupos alimentados com as dietas C e Y se terá devido a um maior crescimento nestes dois grupos, relativamente aos restantes, durante a primeira semana experimental. A partir dessa altura a taxa de crescimento específico tornou-se similar na maioria dos grupos, com excepção dos alimentados com as dietas LH e MH; estes dois grupos apresentaram uma taxa de crescimento específico particularmente baixa durante a última semana, o que se reflectiu num tamanho final significativamente menor que o de todos os outros grupos.

De um modo geral, os valores do peso final estão bem correlacionados com os do comprimento. Acentua-se, porém, a diferença entre os grupos C e Y que é, neste caso, estatisticamente significativa. Situação idêntica é verificada no que respeita à biomassa (tabela 3.3, figura 3.3).

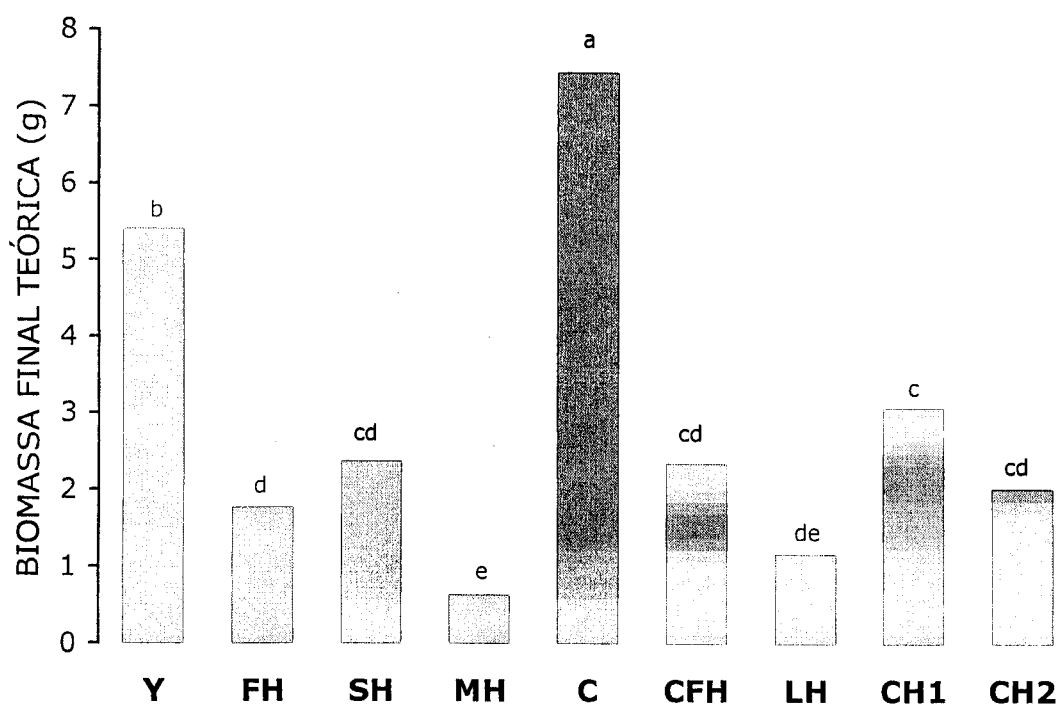


FIGURA 3.3. Biomassa final teórica na experiência 1 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

3.4. DISCUSSÃO

A mortalidade total do grupo mantido em jejum é indicadora da inexistência de recirculação de material orgânico passível de servir de alimento para as larvas. O momento em que ocorreu essa mortalidade massiva coincidiu com o observado por vários autores, em condições semelhantes (Radünz-Neto *et al.*, 1994, 1996; Geurden *et al.*, 1995). Da mesma forma, os resultados zootécnicos obtidos com a dieta de referência (dieta Y) são comparáveis aos apresentados noutros trabalhos. Radünz-Neto *et al.* (1994, 1996) e Geurden *et al.* (1995) utilizando uma dieta idêntica e condições experimentais similares referem, para a mesma espécie, valores de 92-96% de sobrevivência e 15,5-19,0 mm de comprimento ao fim de 21 dias, registando-se no presente estudo respectivamente 98% e 16,3 mm. Os resultados obtidos com esta dieta de referência, que proporciona de forma consistente uma sobrevivência elevada e um crescimento razoável, permitiram confirmar a operacionalidade do sistema experimental e a boa qualidade do lote de larvas usado.

Os resultados obtidos com a dieta C (formulada à base de hidrolisado de peixe - CPSP - e caseína nativa) não diferiram estatisticamente em termos de sobrevivência e crescimento, e foram mesmo superiores no que respeita ao peso final e biomassa, aos obtidos com a dieta de referência (à base de levedura Protibel). O facto das duas dietas serem constituídas por fontes proteicas diferentes, o que faz com que diversos factores variem simultaneamente, torna complexa a interpretação dos resultados. Assim, por exemplo, as duas dietas distinguem-se quanto ao teor proteico (tabela 3.2) e ao perfil de distribuição do azoto (ver 2ª parte, capítulo 7, tabela 7.4), o mesmo devendo acontecer em relação ao perfil de aminoácidos. O teor proteico da dieta Y é bastante menor do que o da dieta C mas, contudo, superior a 45%, que foi o valor estimado das necessidades proteicas das larvas de carpa (Sen *et al.*, 1978). No que diz respeito ao perfil de distribuição do azoto, a dieta Y apresenta, relativamente à dieta C, mais do dobro da proporção de azoto insolúvel a pH 8 (o pH do intestino das larvas) e menos de metade da proporção das fracções correspondentes aos poli- e oligopéptidos (fracções S1 e S2, tabela 7.4, capítulo 7). Este facto poderá ajudar a explicar os melhores resultados obtidos com a dieta C, na medida em que uma maior parte da proteína será mais facilmente digerida em formas absorvíveis.

As diferenças no crescimento larvar observadas com as dietas C, CH1 e CH2 realçaram a importância da forma de fornecimento da proteína, evidenciando o

efeito negativo da utilização de hidrolisados como única fonte proteica. A dieta C, contendo uma mistura de hidrolisado de proteína de peixe e caseína nativa, proporcionou um crescimento muito superior ao das outras duas dietas, nas quais a caseína se encontrava sob a forma hidrolisada. Estas três dietas deverão diferir praticamente apenas ao nível do perfil de distribuição do azoto, visto serem constituídas pelas mesmas fontes proteicas. Sob esse ponto de vista, a dieta CH1, comparativamente com a dieta C, contém uma quantidade muito elevada de azoto na forma solúvel, que se reflecte em níveis muito elevados das fracções correspondentes aos di-/tripéptidos e aminoácidos livres (fracções S3 e S4, tabela 7.4, capítulo 7). De acordo com os resultados de vários autores, um excesso de aminoácidos livres nas dietas revelar-se-á prejudicial para os peixes (Kaushik e Dabrowski, 1983; Stone *et al.*, 1989), assim como um excesso de di-/tripéptidos (Zambonino Infante *et al.*, 1997), o que poderá explicar os melhores resultados obtidos com a dieta C. Por outro lado, os resultados obtidos com a dieta CH1 foram consistentemente melhores do que os obtidos com a dieta CH2, embora não estatisticamente diferentes. Segundo dados do produtor (SIGMA), os hidrolisados de caseína usados nessas dietas distinguem-se quanto à solubilidade, sendo o da dieta CH1 menos solúvel do que o da CH2, o que realça uma vez mais a importância da solubilidade do azoto.

As restantes dietas que incluíam apenas fontes proteicas hidrolisadas promoveram igualmente um crescimento larvar muito inferior ao da dieta C. Estes resultados estão de acordo com os de Szlaminska *et al.* (1993), que obtiveram um maior crescimento em larvas de *Carassius auratus* alimentadas com uma dieta contendo uma mistura de caseína e hidrolisado de caseína, comparativamente a uma dieta contendo apenas o hidrolisado de caseína. Num trabalho recente (Kolkovski e Tandler, 2000), em que se utilizou farinha de lula e o respectivo hidrolisado, foi demonstrado uma vez mais o efeito negativo da inclusão do hidrolisado como única fonte proteica da dieta, no crescimento e na sobrevivência de larvas de dourada (*Sparus aurata*). Refira-se ainda a propósito o trabalho de Aoe *et al.* (1974), que demonstrou também a menor eficácia dos hidrolisados de caseína, relativamente à caseína original, na promoção do crescimento de carpas juvenis. Um resultado em parte contraditório é, no entanto, apresentado por Day *et al.* (1997), que obtiveram uma melhor sobrevivência de pós-larvas de linguado quando a farinha de peixe da dieta foi completamente substituída por um hidrolisado de peixe, e não quando essa substituição foi apenas parcial.

Para além de eventuais razões de ordem nutricional, o fraco crescimento obtido com as dietas contendo hidrolisados como única fonte azotada poderá estar relacionado com a elevada solubilidade destas dietas na água e com a tendência para a agregação das suas partículas. Estas características podem contribuir para a redução da disponibilidade do alimento, como referem Radünz-Neto *et al.* (1993), o que poderá ser particularmente relevante durante as primeiras fases de desenvolvimento das larvas, quando estas apresentam capacidades limitadas de locomoção e prospecção.

Nas dietas contendo hidrolisados como única fonte azotada, a substituição de 50% do hidrolisado de peixe (CPSP) por hidrolisados de soja (na dieta SH), de bacalhau (na dieta CFH), ou de caseína (nas dietas CH1 e CH2), não afectou de forma significativa o crescimento larvar e melhorou, de um modo geral, a sobrevivência. Escaffre *et al.* (1997) verificaram que a incorporação de até 40% de um concentrado de soja na dieta não afectava negativamente o crescimento e a sobrevivência das larvas de carpa, apesar da deficiência da soja em certos aminoácidos, o que corrobora os resultados observados com o hidrolisado de soja. Considerando que as dietas CH1 e CH2 deverão apresentar um perfil aminoacídico idêntico ao da dieta C, e como os bons resultados obtidos com esta dieta não deixam prever desequilíbrios a esse nível, os resultados obtidos com os hidrolisados de caseína são igualmente justificados. Ainda sob o ponto de vista do perfil de aminoácidos, não seriam também de esperar diferenças significativas quando metade do CPSP da dieta foi substituído pelo hidrolisado de bacalhau. Na medida em que as dietas SH, CFH e CH1 promoveram uma sobrevivência significativamente superior à da dieta FH, outros factores, como a solubilidade das dietas e o perfil de distribuição do azoto (como foi anteriormente referido), deverão ser tomados em consideração na interpretação destes resultados. Finalmente, todos os factores referenciados deverão também estar envolvidos na acentuada redução do crescimento verificada quando parte do CPSP foi substituído pelos hidrolisados de albumina (na dieta LH) e de carne (na dieta MH).

Como conclusão, a presente experiência evidencia a importância da forma como é fornecida a proteína dietária para as larvas de carpa, assim como o efeito negativo da utilização de hidrolisados como única fonte azotada da dieta.

4. EFEITO DO NÍVEL DE INCLUSÃO DE UM HIDROLISADO PROTEICO EM DIETAS À BASE DE LEVEDURA

4.1. INTRODUÇÃO

No capítulo precedente verificou-se que, em larvas de carpa, uma dieta contendo uma mistura de fontes proteicas hidrolisadas e não hidrolisadas conduzia a um rendimento zootécnico muito superior ao obtido com dietas em que os hidrolisados constituíam a única fonte proteica. Estes resultados confirmam os de Szlaminska *et al.* (1993), que observaram, além disso, um efeito positivo na performance larvar quando a caseína nativa da dieta era parcialmente substituída por um hidrolisado de caseína. O conjunto dos resultados sugere a existência de um nível óptimo de incorporação de hidrolisados proteicos nas dietas para larvas. No presente capítulo pretendeu determinar-se o nível adequado de inclusão de hidrolisado em dietas à base de levedura para larvas de carpa e de robalo.

A opção pela utilização de dietas à base de levedura justifica-se pela elevada sobrevivência larvar que estas geralmente proporcionam, como foi confirmado no capítulo anterior, o que faz com que sejam usadas como dieta de referência por alguns autores (Radünz-Neto *et al.*, 1994, 1996; Geurden *et al.*, 1995).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se duas experiências – uma com carpa (experiência 2) e outra com robalo (experiência 3) – que decorreram na Estação de Zoologia Marítima “Dr. Augusto Nobre”, de acordo com as condições apresentadas na tabela 4.1.

Foram testadas, em duplicado, cinco dietas que diferiam na sua base proteica (tabela 4.2): a dieta controle era constituída apenas por levedura (dieta H0), sendo este ingrediente substituído por níveis crescentes (30, 50, 70 e 100%) de um hidrolisado de proteína de peixe (CPSP) nas restantes dietas (dietas H30, H50, H70 e H100, respectivamente). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4).

EXPERIÊNCIA 2

A experiência foi efectuada com larvas de carpa, tendo-se fornecido as dietas microparticuladas desde o início da alimentação exógena.

Semanalmente (dias 7, 14, 21 e 28) procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito uma lupa binocular.

TABELA 4.1. Condições experimentais nas experiências 2 e 3.

	Experiência 2	Experiência 3
Espécie	<i>C. carpio</i>	<i>D. labrax</i>
Comprimento inicial (mm)	6,4	---
Peso inicial (mg)	---	73,0
Larvas por tanque	210	80
Período experimental (dias)	28	49
Temperatura (°C)	24±1 ¹	21-24
Salinidade (‰)	0	32-33
Fotoperíodo (h, luz:obscuridade)	16:8	14:10
Fluxo de água (l min ⁻¹)	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4
Diâmetro da partícula alimentar (µm)		
1ª semana	100-200	400-600
2ª semana	200-400	400-600
3ª semana	400-600	400-600
4ª semana	400-600	400-600
5ª-7ª semanas		400-600

¹Temperatura gradualmente elevada de 19±1 para 24±1°C entre o dia 0 e o dia 3, e mantida a 24±1°C após o dia 3.

EXPERIÊNCIA 3

A experiência foi efectuada com pós-larvas de robalo de 71 dias de idade, obtidas na piscicultura OESNOR – Produção Aquícola S.A. (Peniche). À data do início do ensaio as pós-larvas encontravam-se em fase de adaptação ao alimento artificial, estando a ser-lhes fornecido simultaneamente artémia e uma dieta comercial (EWOS: matéria seca – MS – 93,0%; proteína bruta 59,3% MS; cinzas 13,7% MS; energia 21,3 kJ g⁻¹ MS).

As dietas experimentais foram as mesmas que se usaram na experiência 2, com excepção da dieta H100. Optou-se pela não utilização desta dieta na presente

TABELA 4.2. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas nas experiências 2 (dietas H0-H100) e 3 (dietas H0-H70).

Dietas	H0	H30	H50	H70	H100
<i>Ingredientes (% ms)</i>					
Hidrolisado de peixe ¹	—	22,5	37,5	52,5	75,0
Levedura ²	75,0	52,5	37,5	22,5	—
Óleo de fígado de bacalhau	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura vitamínica ³	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mistura mineral ⁴	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Dextrina	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>Composição analítica</i>					
Matéria seca (ms, %)	94,6	94,3	93,8	93,6	93,8
Proteína bruta (% ms)	41,3	44,2	47,3	46,7	54,6
Cinzas (% ms)	10,2	11,4	11,4	14,4	9,5
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	19,2	20,5	21,8	21,8	23,0

¹ CPSP, Sopropêche, França.; ² Protibel, Bel Industries, França; ³ Vitaminas (mg/kg mistura): retinol, 360000 (IU/kg mistura); calciferol 500000 (IU/kg mistura); α -tocopherol, 20000; menadiona sódio-bis, 4000; tiamina, 1000; riboflavina, 1000; pantotenato de cálcio, 10000; ácido nicotínico, 20000; piridoxina, 2000; ácido fólico, 1000; cianocobalamina, 10; biotina, 100; ácido ascórbico, 40000; inositol, 60000; ⁴ Minerais (mg/kg mistura): sulfato de cobalto, 191; sulfato de cobre, 1960; sulfato de ferro, 20000; fluoreto de sódio, 221; iodeto de potássio, 78; óxido de magnésio, 83000; óxido de manganésio, 2600; selenito de sódio, 66; óxido de zinco, 3750; fosfato dicálcico 802000; cloreto de potássio, 115000; cloreto de sódio, 44000.

experiência tendo em consideração os resultados obtidos na experiência 2 e a dificuldade que se colocava quanto ao seu fornecimento com o tipo de alimentadores utilizado. Esta dieta era bastante higroscópica em consequência do elevado teor de hidrolisado, formando uma pasta que entupia, com frequência, a saída do alimentador. Para além dos grupos alimentados com as dietas experimentais, um grupo continuou a ser alimentado com a dieta comercial durante o período experimental.

Nos dias 28 e 49 do período experimental os sobreviventes de cada tanque foram anestesiados e pesados em conjunto. Após recuperação da anestesia os peixes eram recolocados no sistema experimental, não tendo ocorrido qualquer mortalidade em consequência desta operação.

4.3. RESULTADOS

EXPERIÊNCIA 2

A maioria das larvas mantidas em jejum morreu entre os dias 7 e 11 (figura 4.1). Porém, um número muito reduzido de larvas desse grupo (menos de 1%) permaneceu vivo até ao final da experiência. Nos grupos alimentados com as dietas H0, H30, H50 e H70 a mortalidade foi muito baixa até ao final do ensaio. No grupo alimentado com a dieta H100 a mortalidade aumentou a partir da segunda semana, sendo significativamente maior do que a dos outros grupos no fim do período experimental (tabela 4.3, figura 4.1).

Em relação ao crescimento, verificou-se um aumento significativo do comprimento das larvas com o aumento do nível de substituição da levedura por hidrolisado até 70% (tabela 4.3, figura 4.2). No final do ensaio, as larvas do grupo alimentado com a dieta H70 eram significativamente maiores do que as do grupo alimentado com a dieta H50, e em ambos significativamente maiores do que as dos restantes grupos (tabela 4.3). Quanto ao peso final, os grupos alimentados com as dietas H50 e H70 não diferiram estatisticamente, apesar do valor médio mais elevado no grupo H70; os restantes grupos apresentaram um peso médio significativamente menor do que o daqueles (tabela 4.3). Tal como em relação ao comprimento final, o pior resultado foi obtido com a dieta H100. Resultado semelhante foi observado para a biomassa final (tabela 4.3, figura 4.3), este critério tornando mais evidente o efeito negativo da dieta H100.

TABELA 4.3. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final e biomassa final teórica das larvas de carpa na experiência 2.

Dietas	H0	H30	H50	H70	H100	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>						
dia 7	96 ^a	99 ^a	98 ^a	98 ^a	96 ^a	1,025
dia 14	95 ^a	95 ^a	97 ^a	98 ^a	94 ^a	2,049
dia 21	95 ^a	95 ^a	96 ^a	94 ^a	74 ^a	4,631
dia 28	95 ^a	95 ^a	95 ^a	94 ^a	66 ^b	5,258
<i>Comprimento (mm)</i>						
dia 7	9,1 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	9,2 ^a	9,1 ^a	0,131
dia 14	10,7 ^c	11,0 ^{bc}	11,9 ^a	12,2 ^a	11,3 ^b	0,106
dia 21	12,4 ^c	12,9 ^c	14,4 ^b	15,4 ^a	12,6 ^c	0,260
dia 28	15,2 ^c	16,2 ^c	19,2 ^b	22,5 ^a	14,0 ^c	0,642
<i>TCE (%)</i>						
dias 0-7	5,0 ^a	4,8 ^a	4,9 ^a	5,2 ^a	5,1 ^a	0,209
dias 7-14	2,4 ^a	2,9 ^a	4,0 ^a	4,0 ^a	3,1 ^a	0,311
dias 14-21	2,0 ^{ab}	2,3 ^{ab}	2,7 ^{ab}	3,4 ^a	1,5 ^b	0,292
dias 21-28	2,9 ^{ab}	3,3 ^{ab}	4,1 ^{ab}	5,4 ^a	1,5 ^b	0,526
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>						
	47,7 ^{bc}	58,0 ^b	97,5 ^a	158,2 ^a	29,3 ^c	13,104
<i>Biomassa (g)</i>						
	4,5 ^b	5,5 ^b	9,3 ^a	14,9 ^a	1,9 ^c	1,181

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

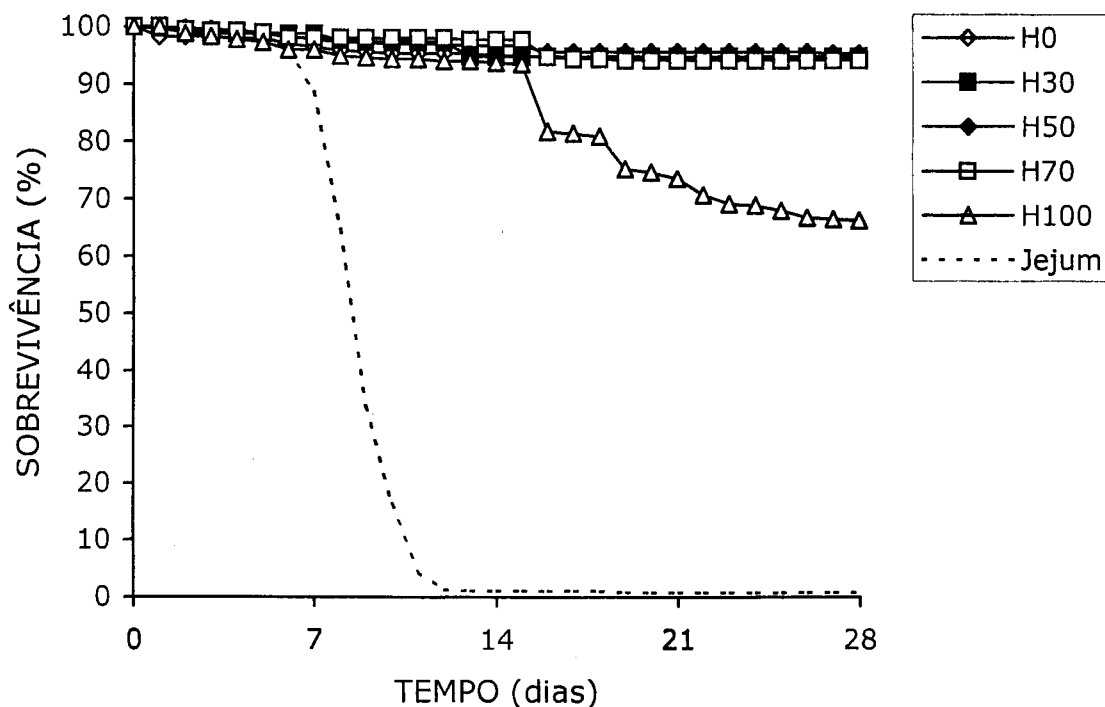


FIGURA 4.1. Sobrevivência larvar na experiência 2.

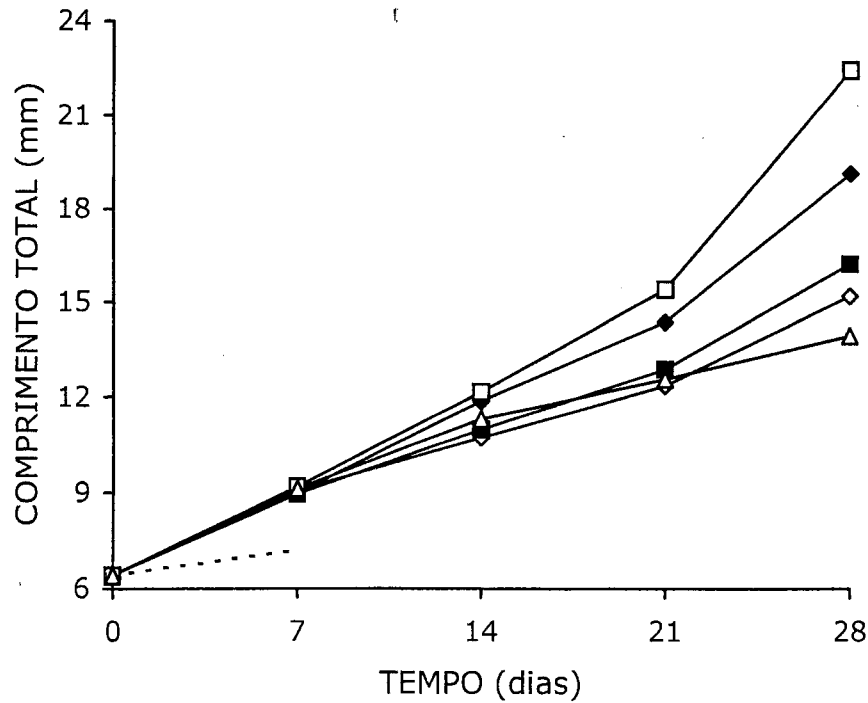


FIGURA 4.2. Crescimento larvar na experiência 2 (ver legenda da figura 4.1).

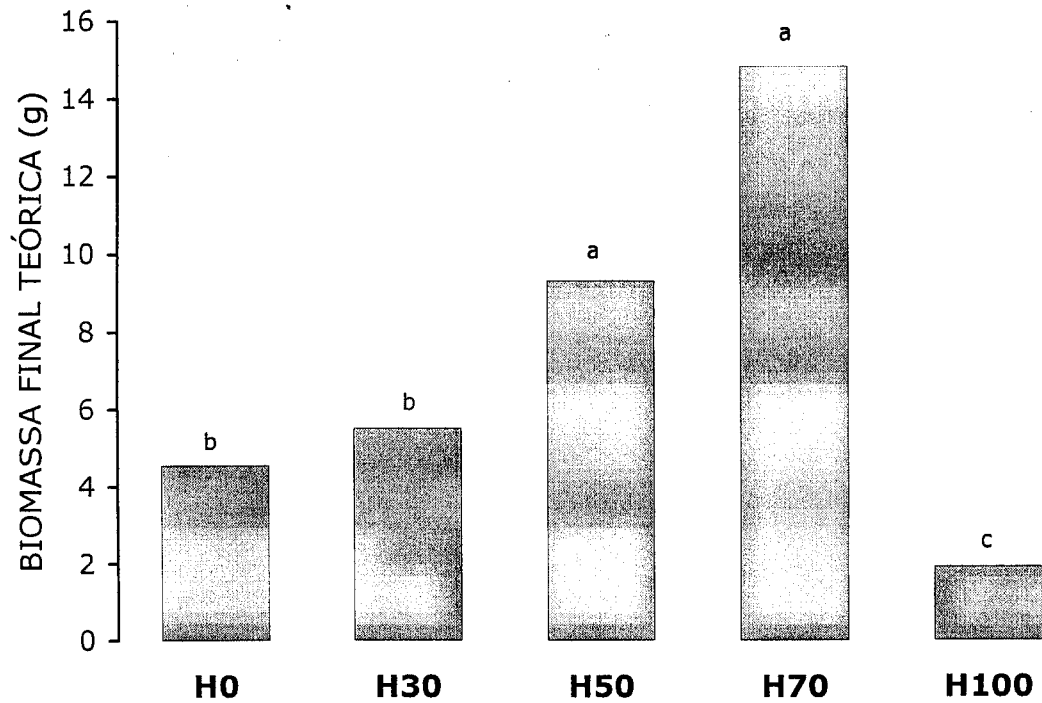


FIGURA 4.3. Biomassa final teórica na experiência 2 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P>0,05$).

EXPERIÊNCIA 3

Todos os animais do grupo mantido em jejum morreram ao fim de 7 dias. Nos grupos alimentados, a mortalidade foi muito acentuada no decurso da primeira semana, mantendo-se praticamente inalterável nas seis semanas seguintes (tabela 4.4, figura 4.4). No final do ensaio, as diferenças de sobrevivência entre os grupos alimentados com as dietas experimentais não foram estatisticamente significativas, apesar dos valores médios serem consideravelmente maiores nos grupos H70 e H50 do que nos restantes. No grupo alimentado com a dieta comercial (dieta C) registou-se a melhor sobrevivência final que, porém, não diferiu significativamente da dos grupos alimentados com as dietas H70 e H50.

Com as dietas experimentais, o crescimento foi tanto melhor quanto maior o nível de substituição da levedura por hidrolisado, não havendo, contudo, diferenças significativas entre os níveis de substituição de 50 e 70% (tabela 4.4, figura 4.5). No final do ensaio, o peso dos peixes alimentados com as dietas H50 e H70 foi cerca de 1,7 vezes maior do que os alimentados com a dieta H30 e mais do triplo dos alimentados com a dieta H0. De forma semelhante, os valores de biomassa final obtidos com as dietas H50 e H70 não diferiram significativamente entre si, e foram muito superiores aos registados com as dietas H0 e H30 (tabela 4.4, figura 4.6). A dieta comercial, à qual já se vinham adaptando todos os animais no início da experiência, conduziu a melhores resultados do que os obtidos com a melhor dieta experimental, quer em termos de crescimento como de biomassa final.

4.4. DISCUSSÃO

Na experiência com a carpa, a sobrevivência de algumas larvas do grupo mantido em jejum revela a presença de matéria orgânica no sistema experimental, que lhes terá servido de alimento. Escaffre *et al.* (dados não publicados) observaram igualmente uma sobrevivência inferior a 1% ao fim de 21 dias num lote de larvas de carpa mantido em jejum, numa experiência em que utilizaram dietas similares. Do mesmo modo, Radünz-Neto *et al.* (1993) registaram uma sobrevivência de 15% ao fim de 28 dias num lote de larvas de peixe vermelho mantido em jejum, num ensaio em que testaram dietas à base de levedura e de um hidrolisado de caseína. Estes últimos autores sugeriram que o elevado grau de dissolução das partículas alimentares poderia favorecer o desenvolvimento de bactérias no sistema experimental, as quais serviriam de alimento, possibilitando a sobrevivência de algumas larvas do lote mantido em jejum. Convirá referir que na experiência

TABELA 4.4. Valores médios de sobrevivência, peso, taxa de crescimento específico (TCE) e biomassa final teórica das pós-larvas de robalo na experiência 3.

Dietas	C	H0	H30	H50	H70	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>						
dia 7	40 ^a	22 ^{bc}	13 ^c	27 ^{ab}	30 ^{ab}	3,202
dia 14	40 ^a	21 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,543
dia 21	40 ^a	20 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,421
dia 28	40 ^a	19 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,674
dia 35	40 ^a	19 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,674
dia 42	40 ^a	19 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,674
dia 49	40 ^a	19 ^b	12 ^b	25 ^{ab}	30 ^{ab}	3,674
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>						
dia 28	616,7 ^a	245,4 ^d	343,4 ^c	495,4 ^b	501,7 ^b	24,704
dia 49	1533,6 ^a	376,7 ^d	717,4 ^c	1165,0 ^b	1226,4 ^b	37,704
<i>TCE (%)</i>						
dias 0-28	7,6 ^a	4,3 ^c	5,5 ^b	6,8 ^a	6,9 ^a	0,182
dias 28-49	4,3 ^a	2,0 ^c	3,5 ^b	4,1 ^{ab}	4,3 ^a	0,159
<i>Biomassa (g)</i>						
	61,3 ^a	7,3 ^c	8,6 ^c	28,4 ^b	36,0 ^b	2,825

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

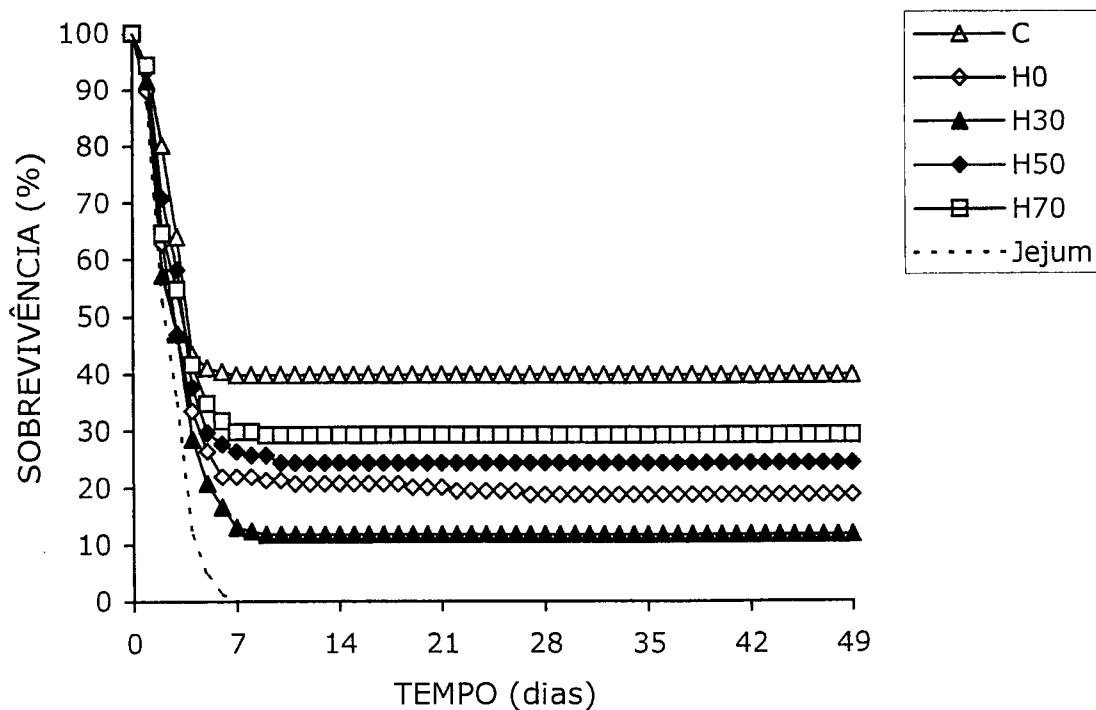


FIGURA 4.4. Sobrevivência larvar na experiência 3.

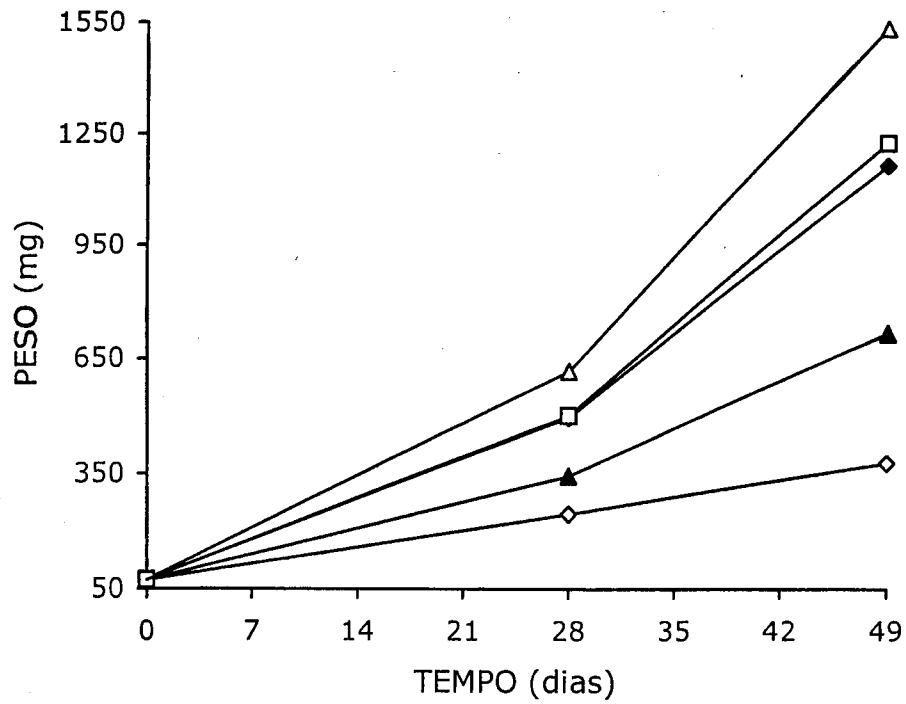


FIGURA 4.5. Crescimento larvar na experiência 3 (ver legenda da figura 4.4).

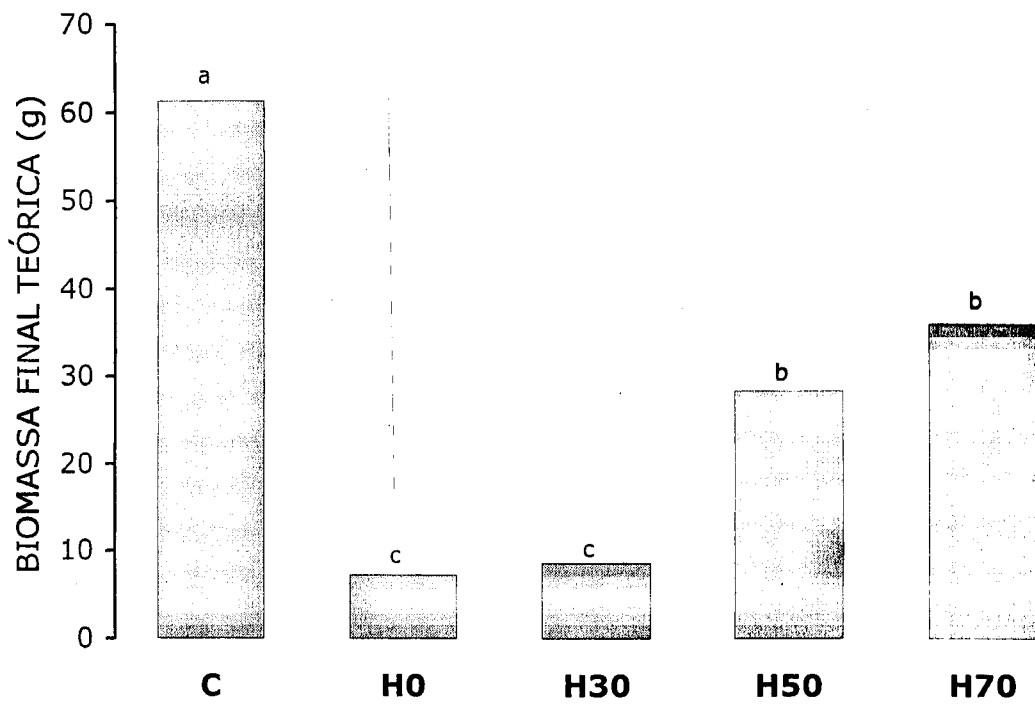


FIGURA 4.6. Biomassa final teórica na experiência 3 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

descrita no capítulo precedente (capítulo 3) foram usadas dietas com elevados níveis de incorporação de hidrolisados, e por isso altamente solúveis, não restando, porém, qualquer sobrevivente do lote em jejum após alguns dias. Considerando que as larvas mantidas em jejum sobreviveriam pelo facto de se alimentarem de bactérias em circulação, é portanto de supor que factores adicionais fortuitos, para além da degradação do alimento, possam estar na origem do desenvolvimento dessas bactérias. Assim, por exemplo, uma menor eficácia do sistema de esterilização da água circulante poderá também estar envolvida neste fenómeno. A mortalidade total do lote em jejum na experiência com o robalo poderia atribuir-se à conjugação de dois factores: por um lado, ao facto de não se ter utilizado a dieta H100, aquela que apresentava maior solubilidade, o que levaria à redução do desenvolvimento bacteriano, e por outro, ao tamanho apreciável dos robalos no início da experiência, o que faria com que os eventuais elementos nutritivos em circulação no sistema não fossem suficientes para satisfazer as suas necessidades basais.

As dietas H0, H30, H50 e H70 sustentaram uma elevada sobrevivência das larvas de carpa, tal como aconteceu com a generalidade das dietas na experiência 1 que continham igualmente levedura ou CPSP como fontes proteica. A elevada mortalidade do robalo (experiência 3) durante a primeira semana do ensaio poderá indicar uma fraca aceitação inicial do alimento inerte. O facto da mortalidade observada nos grupos alimentados ter praticamente cessado após a primeira semana, coincidindo com a mortalidade total no grupo mantido em jejum, assim como a estabilização mais precoce e o valor ligeiramente maior da sobrevivência com a dieta comercial, à qual os peixes já se vinham adaptando, apoiam esta hipótese. A elevada mortalidade inicial dos robalos poderá também ser explicada com base no trabalho de Chatain e Dewavrin (1989). Os autores associaram a elevada mortalidade que observaram, durante a adaptação de pós-larvas de robalo (de 73 dias) ao alimento artificial, à existência de um grande número de indivíduos com a bexiga natatória não funcional, que lhes diminuirá a resistência nesta situação de *stress*. Apesar de não se ter verificado a funcionalidade da bexiga natatória dos animais na presente experiência, eles apresentavam um peso médio inicial bastante inferior ao normal para a sua idade, o que constitui um sintoma de anormalidade ao nível desse órgão (Chatain, 1987).

O conjunto dos resultados de crescimento aponta para um valor óptimo de inclusão de hidrolisado, que se situará nos níveis de 50-70% de substituição da levedura, para ambas as espécies. Atendendo ao perfil de distribuição do azoto das dietas

(ver 2ª parte, capítulo 7, tabela 7.4), as dietas H50 e H70 continham, relativamente às restantes, proporções intermédias das diferentes fracções azotadas. Assim, será admissível que um maior equilíbrio entre as várias fracções possa ter contribuído para os melhores resultados obtidos com estas duas dietas. No entanto, em consequência da variação na proporção de levedura e hidrolisado, as dietas utilizadas diferiam também quanto ao perfil de aminoácidos e ácidos gordos (entre outros nutrientes), o que poderá ter igualmente contribuído para os resultados encontrados. O mesmo se aplica ao teor proteico das dietas, uma vez que este se encontrava um pouco aquém das necessidades estimadas para as duas espécies, principalmente nas dietas H0 e H30. Para larvas de ciprinídeos as necessidades proteicas foram estimadas em 45% (Sen *et al.*, 1978) e 51% (Fiogbe e Kestemont, 1993) do peso seco da dieta, respectivamente na carpa comum e no peixe vermelho. No caso do robalo essas estimativas situam-se entre 50 e 60% do peso seco da dieta para larvas de 15-35 dias (Péres *et al.*, 1996), sendo no entanto admissíveis valores consideravelmente inferiores para pós-larvas, tendo em conta que as necessidades estimadas para juvenis são de 43-50% (Pérez *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 1998; Peres e Oliva-Teles, 1999).

Recentemente, uma dieta de composição semelhante à dieta H50 - contendo uma mistura em partes iguais de levedura e CPSP como fonte proteica - foi testada em carpa e robalo desde o início da alimentação exógena (Cahu *et al.*, 1998). Com a carpa, os resultados desse trabalho foram comparáveis àqueles por nós obtidos. O facto mais relevante foi registado no robalo, com uma sobrevivência de 35% e um crescimento apreciável ao fim de 28 dias, demonstrando a possibilidade de cultura desta espécie sem recurso ao alimento vivo.

A performance das larvas de carpa com a dieta H100 mostrou, uma vez mais, o efeito negativo da utilização de hidrolisados como única fonte proteica. É de assinalar a semelhança entre os resultados obtidos ao 21º dia com esta dieta e os que se registaram com a dieta FH, de composição idêntica, na experiência 1: 74 contra 72% de sobrevivência (que em ambos os casos sofreu um decréscimo acentuado a partir da segunda semana) e 12,6 contra 12,9 mm de comprimento.

Tendo em vista os objectivos definidos, conclui-se que o nível óptimo de incorporação de hidrolisado na dieta corresponderá a 50-70% de substituição da levedura, para ambas as espécies. Admite-se que a este nível de incorporação de hidrolisado corresponda um maior equilíbrio entre as várias fracções azotadas nas

dietas, que terá contribuído para os melhores resultados obtidos, embora outros factores possam estar envolvidos.

5. EFEITO DO GRAU DE HIDRÓLISE DA PROTEÍNA DA DIETA

5.1. INTRODUÇÃO

Na quase totalidade dos trabalhos em que se utilizaram hidrolisados proteicos em dietas para larvas de peixes, não foi dispensada qualquer atenção às características do hidrolisado, nomeadamente no que se refere ao grau da hidrólise (Szlaminska *et al.*, 1993; Radünz-Neto *et al.*, 1994; Cahu e Zambonino Infante, 1995a, 1995b; Berge e Storebakken, 1996; Day *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Kolkovski e Tandler, 2000). Do nosso conhecimento, o trabalho de Zambonino Infante *et al.* (1997) constitui a única excepção. Nesse trabalho foi especialmente preparado, e devidamente caracterizado, um hidrolisado de farinha de peixe formado principalmente por di- e tripéptidos, que se revelou benéfico no crescimento e na sobrevivência de larvas de robalo. No entanto, os resultados obtidos no conjunto dos trabalhos efectuados com hidrolisados não são inequívocos quanto ao seu efeito na performance larvar, constatando-se mesmo algumas aparentes contradições. Esta situação sugere que as características dos hidrolisados tenham influência nos efeitos observados. No presente capítulo pretendeu testar-se esta hipótese, utilizando-se hidrolisados que diferiam quanto ao grau de hidrólise e, por conseguinte, quanto ao perfil de distribuição de pesos moleculares dos péptidos constituintes. Com essa finalidade, prepararam-se no laboratório vários hidrolisados a partir de uma mesma farinha de peixe, procurando obter-se diferentes graus de hidrólise através da selecção e combinação das enzimas digestivas à acção das quais a farinha de peixe era sujeita.

Para além da questão do grau de hidrólise, o efeito do nível de incorporação do hidrolisado na dieta, já abordado no capítulo anterior, foi retomado no presente capítulo. No capítulo precedente, tal como foi então discutido, a utilização de dietas em que uma fonte proteica (levedura) era substituída por outra (farinha de peixe hidrolisada) tornou complexa a interpretação dos resultados, na medida em que as duas fontes proteicas são distintas no que diz respeito aos seus componentes nutritivos. Na verdade, para além do nível de incorporação de proteína hidrolisada, as dietas diferiam relativamente a outros factores, como por exemplo o teor azotado e o perfil de aminoácidos, o que também poderá ter influenciado os resultados. Neste capítulo esse problema foi contornado pela utilização de farinha de peixe como única fonte proteica da dieta, possibilitando uma interpretação mais segura sobre o efeito da substituição da proteína nativa pela proteína hidrolisada.

Efectuaram-se três experiências com robalo e uma com carpa. As experiências com robalo foram programadas sequencialmente, variando em cada uma delas o tamanho inicial dos animais, com o fim de se obter informação complementar sobre a importância da forma da proteína dietária em diversos estados de desenvolvimento da espécie.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas quatro experiências – três com robalo de diferente tamanho inicial (experiências 4, 5 e 6) e uma com carpa (experiências 7) – que decorreram na Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre", de acordo com as condições apresentadas na tabela 5.1.

EXPERIÊNCIA 4

A experiência foi efectuada com pós-larvas de robalo de 45 dias de idade, obtidas na piscicultura OESNOR – Produção Aquícola S.A. (Peniche). Até ao início da experiência os peixes foram alimentados apenas com artémia.

As dietas experimentais (isoenergéticas e isoazotadas) foram formuladas à base de farinha de peixe (tabela 5.2), que era a única fonte proteica na dieta H0 (dieta controle). Nas dietas HP25, HP50 e HP75, respectivamente 25, 50 e 75% do azoto total foi fornecido por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina, enquanto que na dieta HPP50 50% do azoto total foi fornecido por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina/pancreatina. O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). Para além destas dietas, testou-se uma dieta comercial (INVE, LANSY A2: matéria seca – MS – 86,2%; proteína bruta 55,7% MS; gordura bruta 15,5%; cinzas 12,7% MS; energia 22,0 kJ g⁻¹ MS). Todos os tratamentos foram testados em duplicado.

Semanalmente (dias 7, 14 e 21) os sobreviventes de cada tanque foram anestesiados e pesados em grupo. Após recuperação da anestesia os animais foram recolocados no sistema experimental, não tendo ocorrido qualquer mortalidade durante esta operação.

TABELA 5.1. Condições experimentais nas experiências 4, 5, 6 e 7.

Espécie	Experiência 4	Experiência 5	Experiência 6	Experiência 7
	D. labrax	D. labrax	D. labrax	C. carpio
Peso inicial (mg)	45,6	3,3	8,0	---
Comprimento inicial (mm)	---	---	---	6,4
Larvas por tanque	35	80	220	350
Período experimental (dias)	21	21	28	21
Temperatura (°C)	22±1	20±1	20±1	24±1 ¹
Salinidade (‰)	32-33	32-33	32-33	0
Fotoperíodo (h, luz:obscuridade)	16:8	16:8	16:8	16:8
Fluxo de água (l min ⁻¹)	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4
Diâmetro da partícula alimentar (µm)				
1ª semana	400-600	200-400	200-400	100-200
2ª semana	400-600	200-400	400-600	200-400
3ª semana	400-600	200-400	400-600	400-600
4ª semana			400-600	

¹Temperatura gradualmente elevada de 19±1 para 24±1°C entre o dia 0 e o dia 6, e mantida a 24±1°C após o dia 6.

TABELA 5.2. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas nas experiências 4, 5 e 6.

Dietas	Experiência 4					Experiência 5					Experiência 6			
	H0	HP25	HP50	HP75	HPP50	H0	HP10	HP30	HPP10	HPP30	H0	HP30	HPT30	
Ingredientes (% ms)														
Farinha de peixe	75,8	56,8	38,0	19,0	37,9	72,7	65,4	50,9	65,4	50,9	69,7	48,8	48,8	
Hidrolisado P	—	21,2	42,4	63,6	—	—	9,5	28,4	—	—	—	23,5	—	
Hidrolisado PT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	24,0	
Hidrolisado PP	—	—	—	—	42,9	—	—	—	8,3	24,9	—	—	—	
Óleo de fígado de bacalhau	—	—	—	—	6,5	—	—	—	3,8	5,2	1,7	4,2	4,2	
Fosfatidilcolina ¹	2,7	4,6	6,5	8,4	2,0	3,1	3,8	5,2	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Mistura vitamínica ²	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	
Vitamina C (25%)	2,5	2,5	2,5	2,5	—	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
Cloreto de colina (50%)	—	—	—	—	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2	
Mistura mineral ³	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Dextrina	1,0	1,0	1,0	1,0	6,7	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	20,7	15,6	15,1	
Celulose ⁴	15,5	11,4	7,1	3,0	—	11,0	8,1	2,3	9,3	5,8	—	—	—	
Carboximetilcelulose ⁵	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	
Composição analítica														
Matéria seca (ms, %)	93,8	92,8	91,1	92,3	88,7	94,6	93,8	92,3	93,5	86,1	89,9	84,3	81,0	
Proteína bruta (% ms)	52,3	54,2	54,5	55,8	54,1	55,5	56,9	57,7	56,4	55,3	59,3	58,7	58,5	
Gordura bruta (% ms)	—	—	—	—	—	15,2	14,7	13,2	15,2	14,2	12,1	13,5	13,7	
Cinzas (% ms)	17,0	20,2	24,9	29,8	24,5	15,5	17,4	22,2	16,5	18,4	9,7	16,0	16,1	
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	21,1	20,3	19,7	18,9	19,8	20,5	20,2	19,1	20,7	20,2	22,2	20,8	20,7	

¹ Sigma P9671; ² Experiência 4, ver experiência 2; experiências 5 e 6, Coves et al. (1991) (mg/kg mistura): retinol, 1000000 (IU/kg mistura); calciferol 100000 (IU/kg mistura); α -tocoferol, 4000; menadiona sódio-bis, 100; tiamina, 1000; riboflavina, 2500; pantotenato de cálcio, 5000; ácido nicotínico, 10000; piridoxina, 1000; ácido fólico, 500; cianocobalamina, 6; biotina, 100; inositol, 100000 ³ Experiência 4, ver experiência 2; experiências 5 e 6, Coves et al. (1991) (mg/kg mistura): sulfato de cobalto hepta-hidratado, 2; sulfato de cobre penta-hidratado, 300; sulfato de ferro hepta-hidratado, 2000; fluoreto de sódio, 100; iodeto de potássio, 4; carbonato de magnésio, 12400; sulfato de manganésio mono-hidratado, 300; sulfato de zinco mono-hidratado, 400; hidrogenofosfato de cálcio di-hidratado 50000; cloreto de potássio, 9000; cloreto de sódio, 4000; carbonato de cálcio, 21500; ⁴ Sigma C8002; ⁵ Sigma C5013.

EXPERIÊNCIA 5

A experiência foi efectuada com larvas de robalo de 25 dias de idade, obtidas na Piscicultura do Rio Alto (Póvoa de Varzim). Até ao início da experiência os peixes foram alimentados apenas com artémia.

As dietas experimentais (isoenergéticas e isoazotadas) foram formuladas à base de farinha de peixe (tabela 5.2), que era a única fonte proteica na dieta H0 (dieta controle). Nas restantes dietas 10 e 30% do azoto total foi fornecido por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina (respectivamente nas dietas HP10 e HP30) ou por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina/pancreatina (respectivamente nas dietas HPP10 e HPP30). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). Todas as dietas foram testadas em duplicado.

Em virtude da elevada mortalidade ocorrida durante a primeira semana experimental não se efectuaram amostragens para pesagens a tempos intermédios, realizando-se apenas a pesagem final.

EXPERIÊNCIA 6

Ovos de robalo provenientes da piscicultura da TIMAR - Culturas em Água, Lda. (Peniche) foram incubados nas condições descritas no capítulo 2. Até completarem 25 dias de idade, momento do início da experiência, as larvas foram alimentadas unicamente à base de artémia.

As dietas experimentais (isoenergéticas e isoazotadas) foram formuladas à base de farinha de peixe (tabela 5.2), que era a única fonte proteica na dieta H0 (dieta controle). Nas restantes dietas 30% do azoto total foi fornecido por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina ou pela pepsina/tripsina (respectivamente nas dietas HP30 e HPT30). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). Todas as dietas foram testadas em triplicado.

Semanalmente (dias 7, 14 e 21) procedeu-se à amostragem de larvas para pesagem.

EXPERIÊNCIA 7

A experiência foi efectuada com larvas de carpa, tendo-se fornecido as dietas microparticuladas desde o início da alimentação exógena.

As dietas experimentais (isoenergéticas e isoazotadas) foram formuladas à base de farinha de peixe (tabela 5.3), que era a única fonte proteica na dieta H0 (dieta controle). Nas restantes dietas 30% do azoto total foi fornecido por farinha de peixe hidrolisada pela pepsina, pela pepsina/tripsina ou pela pepsina/pancreatina (respectivamente nas dietas HP30, HPT30 e HPP30). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). Todas as dietas foram testadas em duplicado.

TABELA 5.3. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas na experiência 7.

Dietas	H0	HP30	HPT30	HPP30
<i>Ingredientes (% ms)</i>				
Farinha de peixe	69,0	48,3	48,3	48,3
Hidrolisado P	—	23,5	—	—
Hidrolisado PT	—	—	24,0	—
Hidrolisado PP	—	—	—	26,6
Óleo de fígado de bacalhau	1,0	3,0	3,0	3,0
Fosfatidilcolina ¹	2,0	2,0	2,0	2,0
Mistura vitamínica ²	2,0	2,0	2,0	2,0
Vitamina C (25%)	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (60%)	0,8	0,8	0,8	0,8
Mistura mineral ³	5,0	5,0	5,0	5,0
Dextrina	18,7	13,9	13,4	10,8
Carboximetilcelulose ⁴	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Composição analítica</i>				
Matéria seca (ms, %)	89,8	88,6	88,2	86,3
Proteína bruta (% ms)	55,1	56,2	56,5	56,7
Gordura bruta (% ms)	14,3	12,6	11,9	14,9
Cinzas (% ms)	12,7	19,3	19,2	17,1
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	21,7	20,0	20,0	20,4

¹ Sigma P9671; ² Coves *et al.* (1991), ver experiências 5 e 6; ³ Luquet (1971), ver experiência 1; ⁴ Sigma C5013

Semanalmente (dias 7, 14 e 21) procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito uma lupa binocular.

5.3. RESULTADOS

EXPERIÊNCIA 4

Todas as larvas do grupo mantido em jejum morreram até ao 7º dia experimental (figura 5.1). Nos grupos alimentados com as dietas experimentais a mortalidade ocorreu sobretudo durante a primeira semana, sendo nula durante esse período no grupo ao qual foi fornecida a dieta comercial (tabela 5.4). A partir da primeira semana deixou de ocorrer mortalidade nos grupos alimentados com as dietas H0, HP25 e HP50 começando, pelo contrário, a verificar-se no grupo alimentado com a dieta comercial. No final do ensaio a sobrevivência foi elevada independentemente da dieta utilizada. Os valores médios de sobrevivência obtidos com as dietas HP25 e HP50 foram idênticos aos registados com a dieta comercial (dieta C), e mais altos, embora não significativamente, do que os verificados com as restantes dietas experimentais.

As diferenças no crescimento começaram a ser evidentes a partir da segunda semana experimental (tabela 5.4, figura 5.2). No final do ensaio, o peso larvar individual variou na razão inversa do nível de inclusão de hidrolisado na dieta (considerando o mesmo hidrolisado), não se observando, contudo, diferença significativa entre os grupos alimentados com as dietas H0 e H25. Os resultados obtidos com as dietas HP75 e HPP50 foram significativamente inferiores aos dos restantes grupos. Entre os grupos alimentados com as dietas HP50 e HPP50 verificou-se uma diferença significativa do peso larvar, apesar de ambas as dietas terem o mesmo nível de incorporação de hidrolisado. A biomassa final não diferiu significativamente entre os grupos H0, HP25 e HP50 (devido, sobretudo neste último, à sobrevivência mais elevada em relação ao primeiro), mas nestes foi estatisticamente superior à dos grupos HP75 e HPP50 (tabela 5.4, figura 5.3). Com a dieta comercial os resultados de crescimento e a biomassa final não diferiram estatisticamente dos observados com as dietas H0, HP25 e HP50.

EXPERIÊNCIA 5

Todas as larvas do grupo mantido em jejum morreram até ao 10º dia experimental (figura 5.4). Nos grupos alimentados verificou-se uma mortalidade muito elevada durante a primeira semana, sendo mais severa naquele alimentado com a dieta HPP30. Nesse grupo a mortalidade atingiu 81% ao 7º dia, valor significativamente superior ao dos restantes grupos (tabela 5.5). Após a primeira semana a taxa de mortalidade manteve-se baixa em todos os grupos.

TABELA 5.4. Valores médios de sobrevivência, peso, taxa de crescimento específico (TCE) e biomassa final teórica das pós-larvas de robalo na experiência 4.

Dietas	C	H0	HP25	HP50	HP75	HPP50	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>							
dia 7	100 ^a	83 ^a	93 ^a	91 ^a	86 ^a	83 ^a	4,651
dia 14	94 ^a	83 ^a	93 ^a	91 ^a	83 ^a	81 ^a	4,961
dia 21	91 ^a	83 ^a	93 ^a	91 ^a	80 ^a	80 ^a	4,643
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>							
dia 7	92,2 ^a	75,3 ^a	79,4 ^a	86,9 ^a	76,4 ^a	88,5 ^a	11,035
dia 14	182,3 ^a	183,6 ^a	182,7 ^a	158,8 ^{ab}	120,3 ^c	138,7 ^{bc}	6,188
dia 21	251,6 ^{ab}	283,1 ^a	266,2 ^{ab}	230,8 ^b	173,3 ^c	190,3 ^c	8,767
<i>TCE (%)</i>							
dias 0-7	10,1 ^a	6,5 ^a	7,9 ^a	9,1 ^a	7,3 ^a	9,5 ^a	2,092
dias 7-14	9,7 ^a	13,4 ^a	11,9 ^a	8,7 ^a	6,5 ^a	6,4 ^a	2,120
dias 14-21	4,6 ^a	6,2 ^a	5,4 ^a	5,4 ^a	5,2 ^a	4,5 ^a	0,602
<i>Biomassa (g)</i>							
	23,0 ^a	23,5 ^a	24,6 ^a	21,1 ^a	13,9 ^b	15,2 ^b	1,343

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

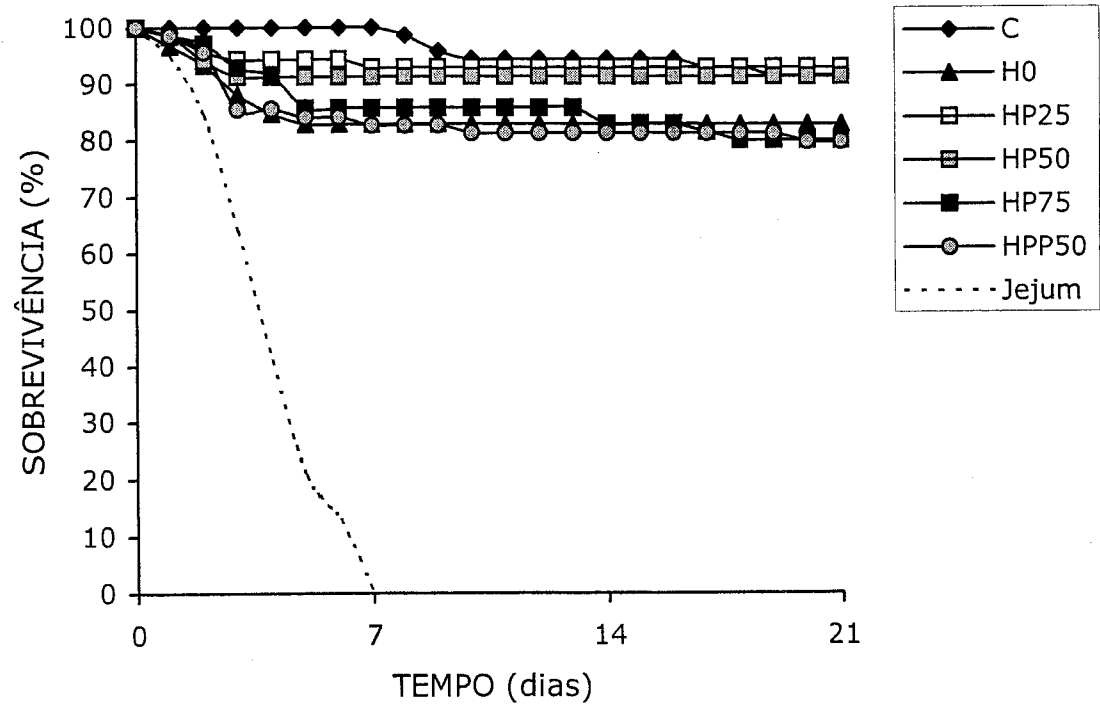


FIGURA 5.1. Sobrevivência larvar na experiência 4.

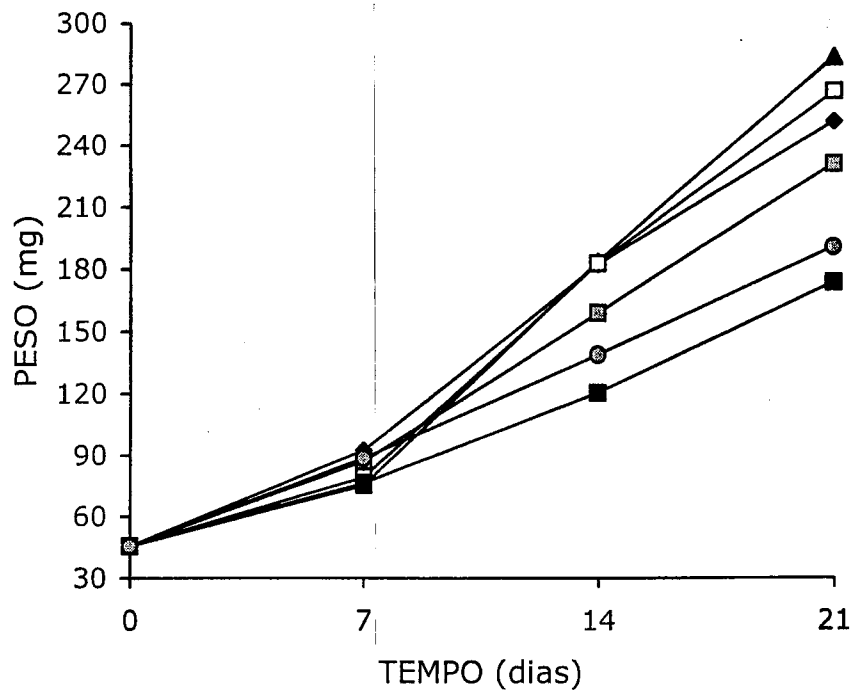


FIGURA 5.2. Crescimento larvar na experiência 4 (ver legenda da figura 5.1).

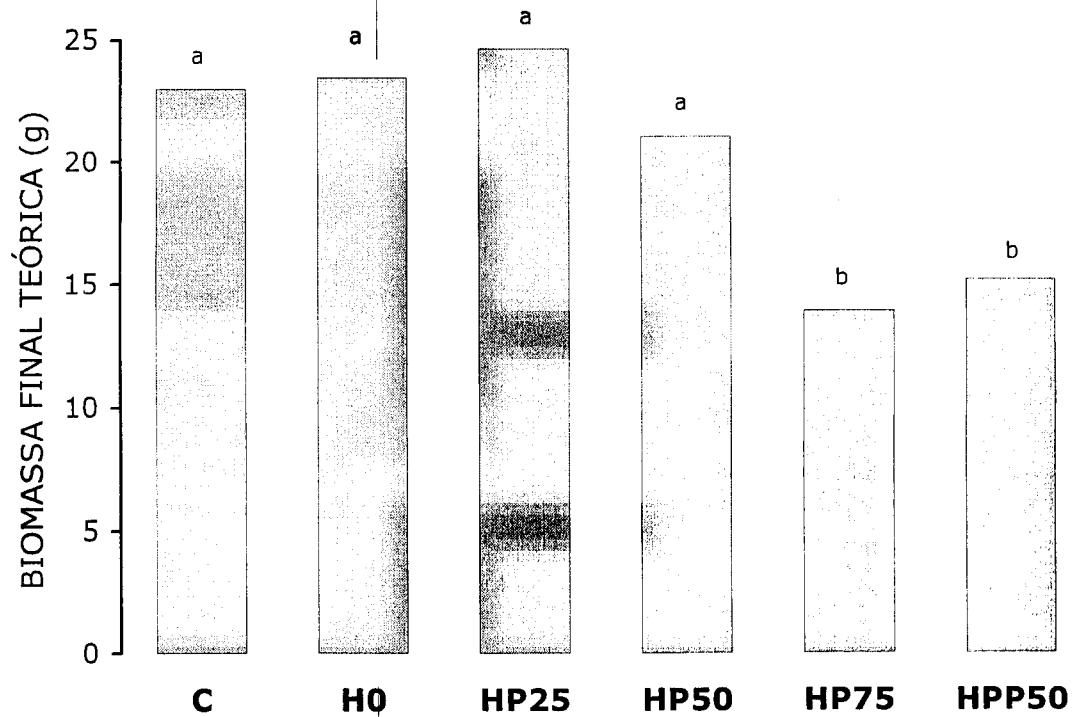


FIGURA 5.3. Biomassa final teórica na experiência 4 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

TABELA 5.5. Valores médios de sobrevivência, peso final e biomassa final teórica das larvas de robalo na experiência 5.

Dietas	H0	HP10	HP30	HPP10	HPP30	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>						
dia 7	42 ^a	39 ^a	39 ^a	42 ^a	19 ^b	4,012
dia 14	37 ^a	36 ^a	31 ^a	39 ^a	18 ^b	3,658
dia 21	36 ^a	36 ^a	28 ^a	34 ^a	17 ^b	2,989
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>						
dia 21	12,3 ^a	15,9 ^a	20,5 ^a	13,2 ^a	13,4 ^a	2,281
<i>Biomassa (g)</i>						
	0,4 ^a	0,6 ^a	0,6 ^a	0,5 ^a	0,2 ^a	0,089

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

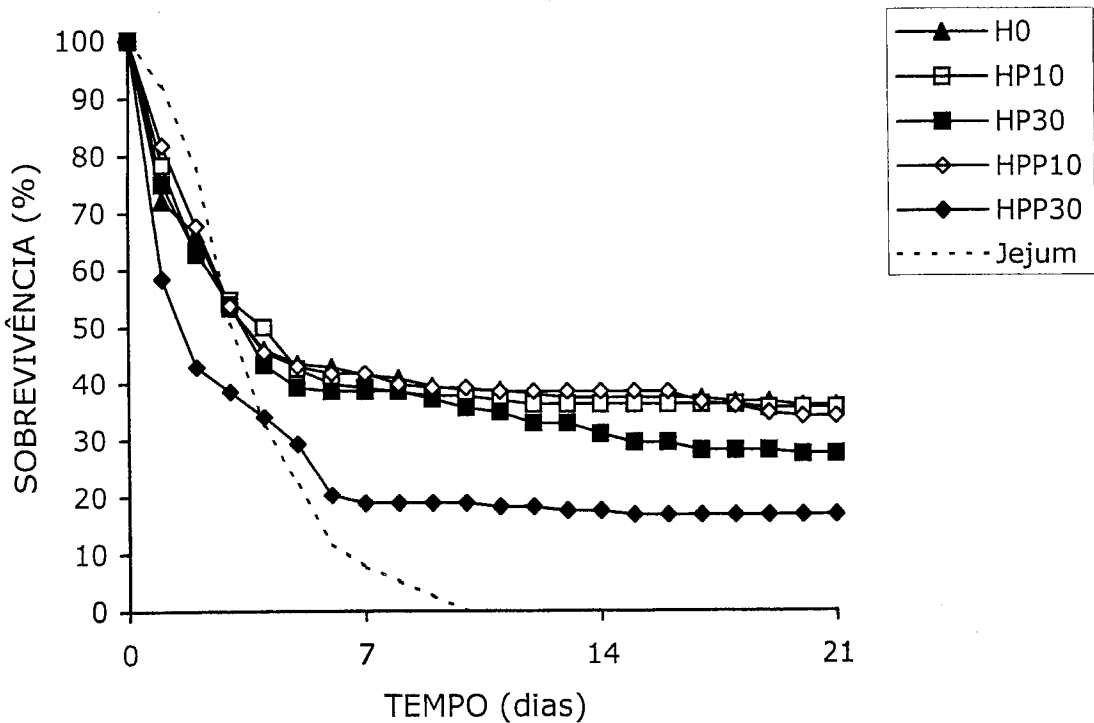


FIGURA 5.4. Sobrevivência larvar na experiência 5.

No que respeita ao peso final, apesar do valor médio mais elevado obtido com a dieta HP30 (cerca de mais de 50% relativamente aos obtidos com as dietas H0, HPP10 e HPP30), não foram detectadas diferenças significativas entre os vários grupos (tabela 5.5). Também em relação à biomassa final não se detectaram diferenças significativas entre os grupos, embora o grupo HPP30 apresentasse um valor médio consideravelmente inferior aos restantes. (tabela 5.5, figura 5.5).

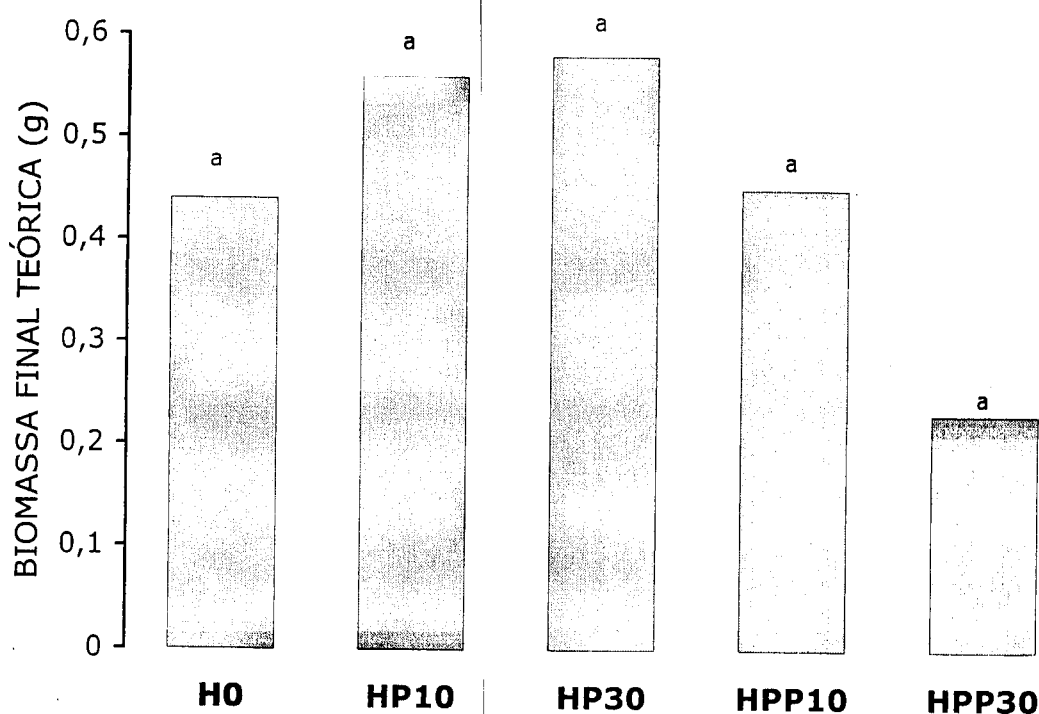


FIGURA 5.5. Biomassa final teórica na experiência 5 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

EXPERIÊNCIA 6

Na fase que antecedeu o período experimental, desde a eclosão até ao 25º dia de vida, obteve-se uma sobrevivência larvar elevada (72%) e um crescimento bastante acentuado (figuras 5.6 e 5.7). Ao 25º dia as larvas apresentavam um peso individual médio de 8,0 mg, quase o dobro daquele que é normal para larvas de robalo com a mesma idade, quando cultivadas à temperatura usual nas pisciculturas.

TABELA 5.6. Valores médios de sobrevivência, peso, taxa de crescimento específico (TCE) e biomassa final teórica das larvas de robalo na experiência 6.

Dietas	H0	HP30	HPT30	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>				
dia 7	87 ^a	92 ^a	91 ^a	2,132
dia 14	83 ^b	90 ^a	90 ^a	1,577
dia 21	81 ^a	88 ^a	87 ^a	1,611*
dia 28	79 ^b	86 ^a	86 ^a	1,107
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>				
dia 7	19,8 ^a	18,0 ^a	16,9 ^a	1,652
dia 14	53,1 ^a	54,8 ^a	56,6 ^a	3,424
dia 21	115,9 ^a	96,4 ^a	122,7 ^a	12,597
dia 28	194,5 ^a	198,9 ^a	192,1 ^a	11,883
<i>TCE (%)</i>				
dias 0-7	12,7 ^a	11,6 ^a	10,6 ^a	1,270
dias 7-14	14,2 ^a	15,9 ^a	17,4 ^a	0,854
dias 14-21	11,2 ^a	7,9 ^a	10,9 ^a	1,488
dias 21-28	7,4 ^a	10,5 ^a	6,6 ^a	1,118
<i>Biomassa (g)</i>				
	15,4 ^a	17,0 ^a	16,5 ^a	0,946

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

*A análise de variância detecta diferenças estatísticas ($P < 0,05$), mas o teste de comparação das médias não diferencia os vários grupos

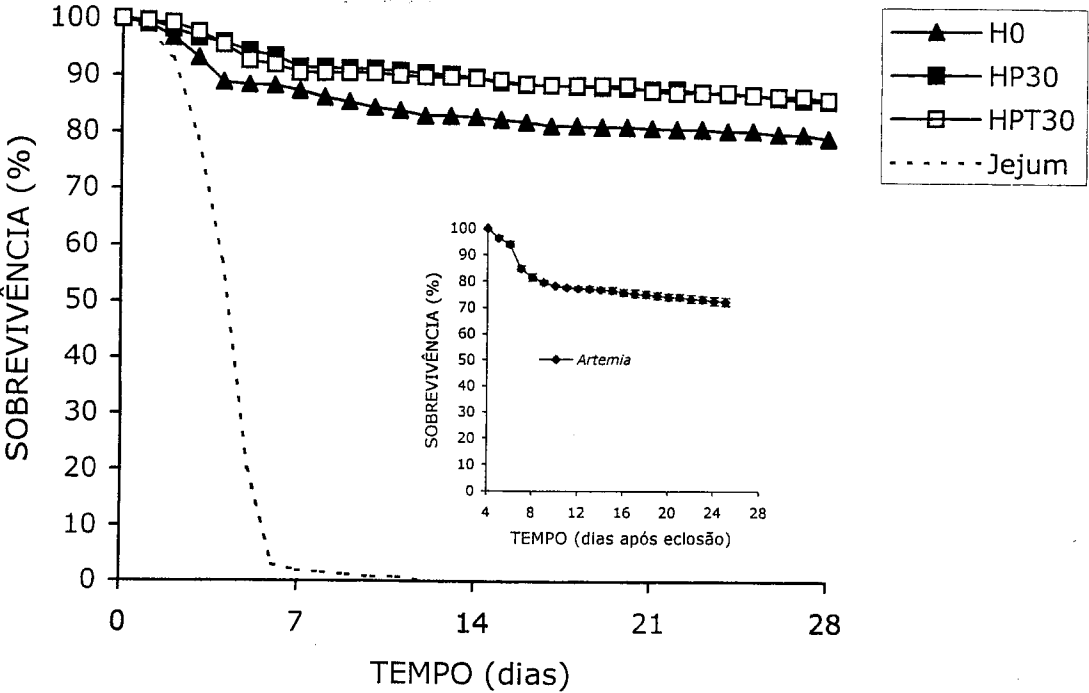


FIGURA 5.6. Sobrevivência larvar na experiência 6.

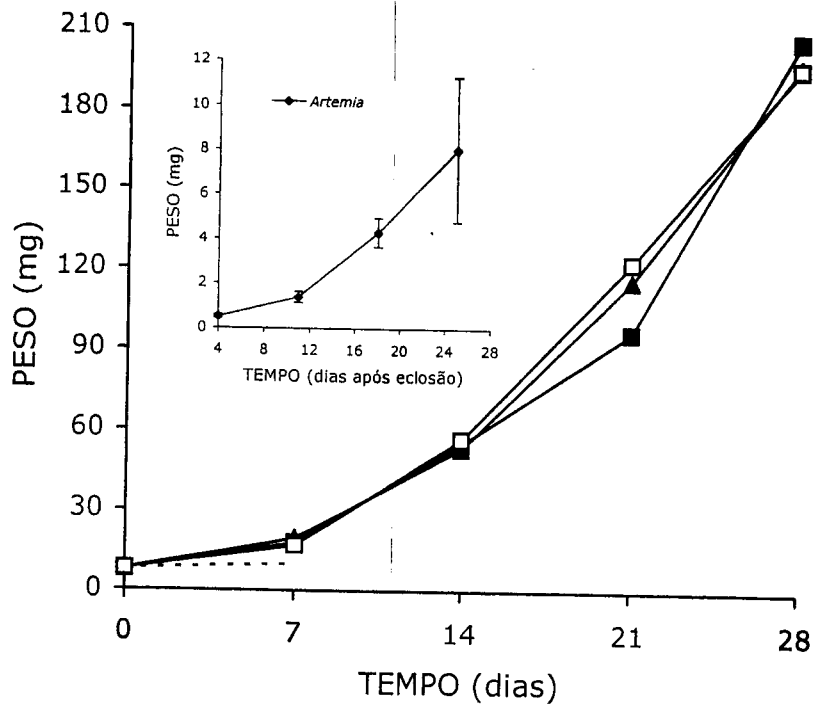


FIGURA 5.7. Crescimento larvar na experiência 6 (ver legenda da figura 5.6).

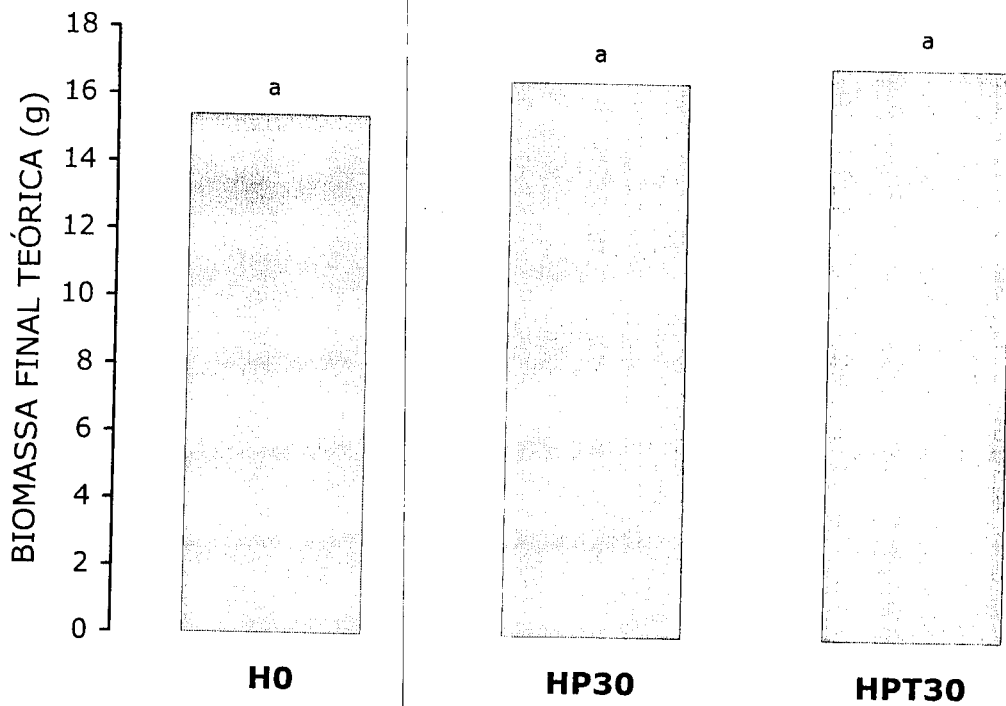


FIGURA 5.8. Biomassa final teórica na experiência 6 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

A maioria das larvas mantidas em jejum morreu até ao 6º dia experimental (97%), embora algumas tivessem sobrevivido até ao 12º dia (figura 5.6). Nos grupos alimentados, a sobrevivência manteve-se bastante elevada até ao final da experiência. Nesse momento observou-se a mesma sobrevivência nos grupos alimentados com as dietas HP30 e HPT30, a qual foi significativamente superior à obtida no grupo alimentado com a dieta H0 (tabela 5.6).

O crescimento foi idêntico em todos os grupos (figura 5.7), não se verificando praticamente diferenças no peso final obtido com as três dietas. Também em relação à biomassa final as diferenças encontradas não foram significativas (tabela 5.6, figura 5.8).

EXPERIÊNCIA 7

A sobrevivência foi elevada ao longo da primeira semana em todos os grupos (tabela 5.7, figura 5.9). A partir do 8º dia a sobrevivência do grupo mantido em jejum diminuiu abruptamente, tendo todas as larvas morrido até ao 12º dia. Nos grupos alimentados a sobrevivência decresceu também de forma abrupta entre os 9º e 14-15º dias. Esse decréscimo foi mais acentuado no grupo alimentado com a dieta HPP30, continuando a verificar-se posteriormente de forma gradual (figura 5.9). A sobrevivência final nesse grupo foi reduzida e significativamente inferior à dos restantes grupos, os quais não diferiram entre si (tabela 5.7).

Apesar do menor tamanho final das larvas alimentadas com a dieta HPP30, as diferenças entre os grupos não foram significativas no que se refere ao comprimento total (tabela 5.7, figura 5.10). Porém, em relação ao peso e à biomassa finais, no grupo ao qual foi fornecida a dieta HPP30 registaram-se valores significativamente inferiores aos dos restantes grupos (tabela 5.7, figura 5.11).

5.4. DISCUSSÃO

Os resultados da experiência 4 mostram que a substituição da farinha de peixe por hidrolisados de farinha de peixe não melhorou significativamente a sobrevivência nem o crescimento durante a adaptação tardia das pós-larvas ao alimento artificial. Pelo contrário, níveis elevados de incorporação de hidrolisados originaram pesos finais mais baixos. Neste ponto, os resultados estão de acordo com os de Zambonino Infante *et al.* (1997) e de Cahu *et al.* (1999), que observaram que a partir de um determinado nível de inclusão de hidrolisado na dieta o rendimento

TABELA 5.7. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final e biomassa final teórica das larvas de carpa na experiência 7.

Dietas	H0	HP30	HPT30	HPP30	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>					
dia 7	96 ^a	93 ^a	97 ^a	95 ^a	2,667
dia 14	50 ^a	32 ^a	42 ^a	14 ^a	8,427
dia 21	31 ^a	26 ^a	36 ^a	5 ^b	6,445
<i>Comprimento (mm)</i>					
dia 7	7,8 ^a	8,0 ^a	8,0 ^a	8,1 ^a	0,106
dia 14	11,6 ^a	11,7 ^a	11,2 ^a	10,7 ^a	0,324
dia 21	16,4 ^a	16,3 ^a	15,4 ^a	13,7 ^a	0,627
<i>TCE (%)</i>					
dias 0-7	2,8 ^a	3,2 ^a	3,1 ^a	3,3 ^a	0,192
dias 7-14	5,7 ^a	5,4 ^a	4,9 ^{ab}	4,0 ^b	0,269
dias 14-21	4,9 ^a	4,8 ^a	4,5 ^a	3,6 ^a	0,255
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>					
	41,3 ^a	41,8 ^a	37,3 ^a	29,2 ^b	2,217
<i>Biomassa (g)</i>					
	1,3 ^a	1,1 ^a	1,3 ^a	0,2 ^b	0,299

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

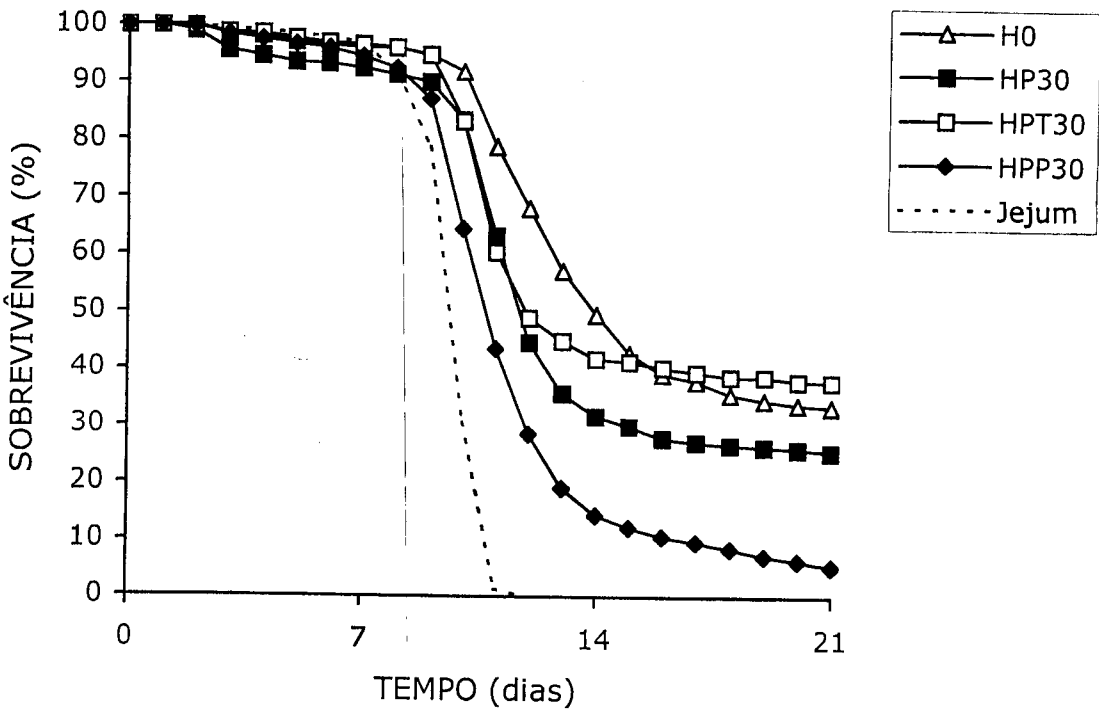


FIGURA 5.9. Sobrevivência larvar na experiência 7.

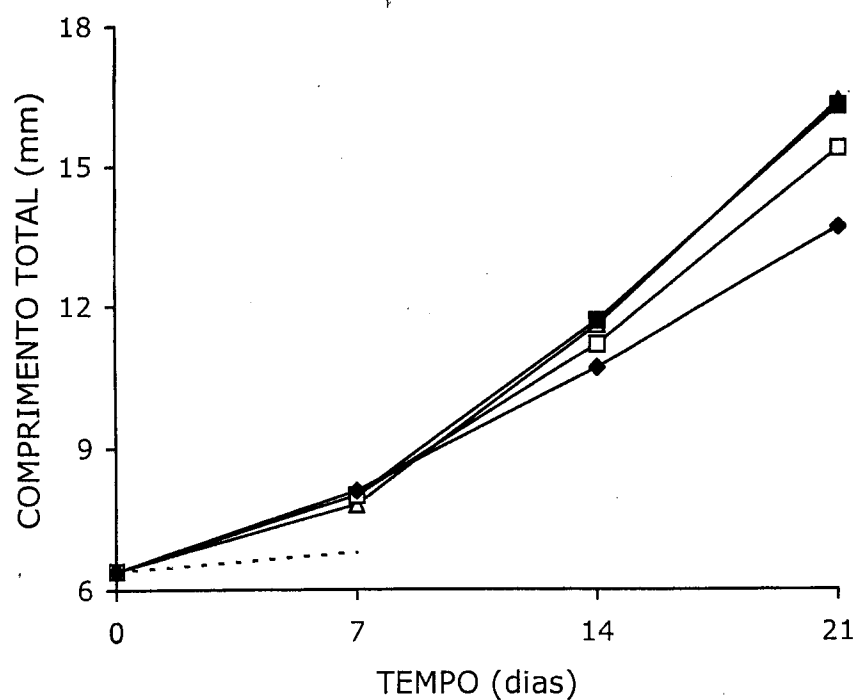


FIGURA 5.10. Crescimento larvar na experiência 7 (ver legenda da figura 5.9).

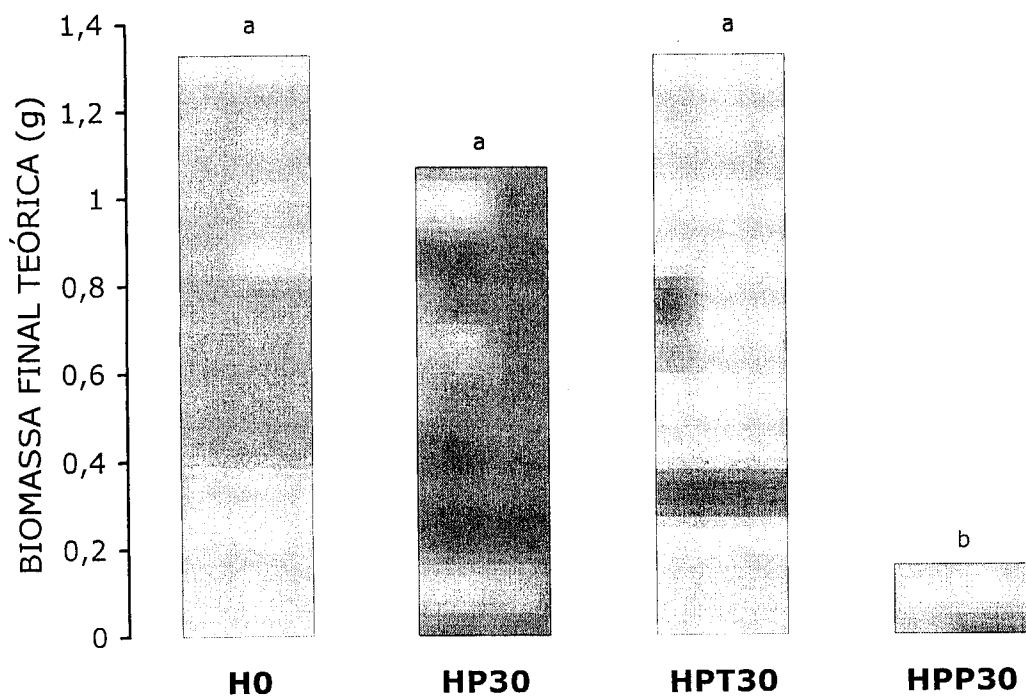


FIGURA 5.11. Biomassa final teórica na experiência 7 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

zootécnico é negativamente afectado. Não obstante, contrariamente, Day *et al.* (1997) registaram uma correlação positiva entre o nível de inclusão do hidrolisado na dieta e a sobrevivência de pós-larvas de linguado, sendo a melhor sobrevivência obtida quando a farinha de peixe foi totalmente substituída por hidrolisado.

Convirá notar que, de certo modo, os resultados da experiência 4 são contraditórios àqueles descritos na experiência 3 (capítulo 4), também ela efectuada com pós-larvas tardiamente adaptadas ao alimento artificial. Na experiência anterior, até um certo nível, o aumento da incorporação de hidrolisado melhorou significativamente o crescimento, o que não se verificou na experiência 4. O facto de na experiência 3 se ter procedido à substituição de uma fonte proteica (levedura) por outra (farinha de peixe), como foi então discutido, poderá ter contribuído para esta aparente contradição. Por outro lado, os hidrolisados e, consequentemente, as dietas utilizadas nas duas experiências são substancialmente diferentes no que diz respeito ao perfil de distribuição do azoto (ver 2ª parte, capítulo 7, figuras 7.1 e 7.2, e tabela 7.4), o que deverá igualmente ter contribuído para essa contradição aparente.

Segundo Zambonino Infante *et al.* (1997) os hidrolisados terão efeitos aparentemente contraditórios nos peixes, na medida em que serão benéficos para as larvas mas ineficazes ou mesmo prejudiciais para os juvenis, o que estará relacionado com as diferenças ao nível da fisiologia digestiva entre os dois estados de desenvolvimento. Sendo assim, este facto poderia explicar os resultados da experiência 4, já que esta foi efectuada com pós-larvas de idade relativamente avançada. A ineficácia dos hidrolisados proteicos na promoção do crescimento em juvenis foi evidenciada na carpa e na truta (Aoe *et al.*, 1974), assim como no pregado (Oliva-Teles *et al.*, 1999). No entanto, também no que diz respeito a este aspecto, foram apresentados resultados contraditórios, que dão conta de efeitos positivos dos hidrolisados no crescimento de juvenis de salmão (Berge e Storebakken, 1996) e na sobrevivência de pós-larvas de linguado durante a adaptação ao alimento inerte (Day *et al.*, 1997).

No que diz respeito às larvas, Cahu *et al.* (1999) observaram que em robalos alimentados com microdietas a partir dos 10 dias de idade (com cerca de 0,5 mg de peso), a substituição de 25% da farinha de peixe da dieta por um hidrolisado comercial de farinha de peixe (CPSP) melhorava de forma significativa a sobrevivência após um período de 30 dias. Segundo os autores, este efeito benéfico terá sido devido à maturação mais precoce do tubo digestivo das larvas, promovida

pelos hidrolisados. Na experiência 6, realizada com larvas de robalo de 8,0 mg, observou-se também uma melhoria significativa da sobrevivência com as dietas contendo proteína hidrolisada (pela pepsina e pela pepsina/tripsina) em comparação com a dieta controle. Esse efeito benéfico não foi, contudo, confirmado na experiência 5, com larvas de robalo mais pequenas, nem na experiência 7, com larvas de carpa.

A comparação dos resultados observados com as dietas contendo o hidrolisado P (obtido por digestão da farinha de peixe pela pepsina) e o hidrolisado PP (obtido por digestão da farinha de peixe pela pepsina/pancreatina), no mesmo nível de incorporação, fornece alguma informação sobre o efeito do grau da hidrólise da proteína. Assim, um grau de hidrólise superior afectou negativamente, de forma significativa, o crescimento numa fase mais tardia (experiência 4) e a sobrevivência numa fase mais precoce (experiência 5) do desenvolvimento do robalo, bem como o crescimento e a sobrevivência da carpa durante o seu desenvolvimento inicial (experiência 7). Uma hidrólise mais moderada – intermédia às duas acima citadas, como é o caso do hidrolisado HPT (obtido por digestão da farinha de peixe pela pepsina/tripsina) - proporcionou resultados idênticos aos registados com o hidrolisado P, tanto no robalo como na carpa.

Como já foi referido, no capítulo 7 (2ª parte do trabalho) apresenta-se a caracterização dos três hidrolisados (figura 7.2) e das várias dietas (tabela 7.4) usadas nas experiências. No hidrolisado PP existe uma quantidade apreciável de aminoácidos livres (figura 7.2, fracção S4) que, como tem sido sugerido (Espe e Lied, 1994), a partir de determinado teor nas dietas poderão ser prejudiciais para as larvas. Este facto poderá explicar os piores resultados obtidos com as dietas que continham níveis mais elevados do hidrolisado PP (caso das dietas HPP50 na experiência 4 e HPP30 nas experiências 5 e 7), o que não aconteceu quando esse hidrolisado foi incluído num nível mais reduzido (dieta HPP10 na experiência 5). Recentemente, Kolkovski e Tandler (2000) não observaram qualquer diferença no crescimento ou na sobrevivência de larvas de dourada quando 50% da farinha de lula da dieta foi substituída pelo seu hidrolisado, tendo sido este obtido através da digestão da farinha original pela tripsina/pancreatina. Neste caso poder-se-á supor que as dietas contivessem uma menor quantidade de aminoácidos livres, uma vez que, não tendo havido digestão prévia da farinha pela pepsina em meio ácido, estaria mais limitada a acção das exopeptidases da pancreatina.

O efeito negativo de níveis dietários elevados de aminoácidos livres está bem documentado. Kaushik e Dabrowski (1983) observaram um crescimento reduzido de carpas juvenis alimentadas com uma mistura de aminoácidos livres como fonte proteica, e Cahu e Zambonino Infante (1995a) detectaram uma menor sobrevivência de larvas de robalo quando alimentadas com uma dieta em que 10% da fonte proteica foi substituída por uma mistura de aminoácidos livres. Stone *et al.* (1989) justificaram a pior performance de trutas alimentadas com ensilados de peixe sujeitos a uma autólise prolongada, relativamente a trutas alimentadas com ensilados cuja autólise foi mais limitada, com os elevados níveis de aminoácidos livres presentes nos primeiros. De acordo com Espe e Lied (1994), os aminoácidos livres terão um efeito benéfico no crescimento quando incorporados na dieta até um determinado nível, a partir do qual se tornarão prejudiciais.

No caso da carpa, as sobrevivências finais observadas na experiência 7 (5-31%,) foram bastante inferiores às que se registaram nas experiências descritas nos capítulos precedentes com a mesma espécie (66-98%, experiências 1 e 2). De forma semelhante, Cahu *et al.* (1998) obtiveram uma sobrevivência muito inferior de larvas de carpa alimentadas com uma dieta formulada à base de farinha de peixe como fonte proteica (semelhante à dieta H0 da experiência 7), do que com dietas à base de levedura (45% contra 86-98%). Esta observação está de acordo com Dabrowska *et al.* (1979) e Dabrowski e Poczyczyński (1988), que consideraram prejudicial a inclusão de peixe ou tecidos de peixe liofilizados em dietas para larvas de ciprinídeos, ao contrário daquilo que se verificava em relação a outras espécies (Dabrowski e Poczyczyński, 1988).

Finalmente, a hipótese apontada por Segner *et al.* (1993) e Verreth *et al.* (1993), que atribui a incapacidade das larvas mais jovens utilizarem eficientemente o alimento artificial à ausência de digestão pela pepsina, parece ser infirmada pelos presentes resultados, uma vez que a inclusão de proteína pré-digerida pela pepsina nas dietas não melhorou o rendimento larvar.

Relativamente aos objectivos iniciais definidos, poder-se-á concluir que em pós-larvas de robalo (45,6 mg) a substituição da farinha de peixe pelo seu hidrolisado não produziu alterações zootécnicas significativas quando o nível de substituição foi baixo (25%), mas piorou o crescimento quando esse nível foi elevado. Em larvas de robalo (3,3 e 8 mg) o efeito da substituição parcial da farinha de peixe pelos hidrolisados foi inconclusiva, no que respeita aos hidrolisados obtidos através da digestão pela pepsina e pela pepsina/tripsina, tendo-se verificado numa das

experiências um efeito positivo significativo na sobrevivência. Nas larvas de carpa (cerca de 2 mg) não foi detectado qualquer efeito significativo com os referidos hidrolisados, para os níveis de substituição utilizados. Pelo contrário, em todos os casos, verificou-se um efeito negativo significativo da inclusão, acima de determinado nível, do hidrolisado obtido através da digestão pela pepsina/pancreatina. Um excesso de aminoácidos livres nas dietas contendo esse hidrolisado em níveis mais elevados, é proposto como causa provável do efeito negativo observado. Assim, conjuntamente com o nível de incorporação do hidrolisado, o grau de hidrólise da proteína dietária deverá ser um factor a ter em consideração quando se utilizam hidrolisados proteicos nas dietas para larvas de peixes.

6. IMPORTÂNCIA DA SOLUBILIDADE E DA HIDRÓLISE NA UTILIZAÇÃO DA CASEÍNA DA DIETA

6.1. INTRODUÇÃO

O recurso a dietas purificadas, com ingredientes bem caracterizados, constitui um passo determinante para o estudo das necessidades nutricionais dos peixes. Neste sentido, a caseína tem sido frequentemente empregue como principal fonte azotada dessas dietas (Dabrowski, 1986). Contudo, alguns trabalhos têm demonstrado a incapacidade das larvas de ciprinídeos para sobreviver e crescer quando lhes são fornecidas, desde o início da alimentação exógena, dietas purificadas contendo caseína como única fonte azotada, ao contrário do que acontece com larvas de idade mais avançada ou com juvenis, que utilizam satisfatoriamente esta proteína (Sen *et al.*, 1978; Mousseau, 1988). No entanto, a substituição de 50% da caseína da dieta por um hidrolisado de caseína faz aumentar fortemente a sobrevivência e sustenta um crescimento apreciável das larvas (Szlaminska *et al.*, 1993). Além disso, também a adição de caseinato de sódio (uma forma solúvel, não hidrolisada, de caseína) em dietas à base de caseína faz aumentar substancialmente o rendimento zootécnico larvar (Radünz-Neto *et al.*, 1993), o que sugere que as formas solúveis, tal como as hidrolisadas, melhoram a utilização alimentar desta proteína.

Na sequência destes estudos foi formulada uma dieta purificada, contendo uma pequena proporção de ambas as formas de caseína (hidrolisada e solúvel) conjuntamente com a caseína nativa, que tem servido como dieta base para a determinação das necessidades nutricionais das larvas de carpa (Radünz-Neto *et al.*, 1994, 1996; Geurden *et al.*, 1995, 1997; Gouillou-Coustans *et al.*, 1998). Embora os resultados zootécnicos obtidos com esta dieta sejam satisfatórios, não existe, porém, informação precisa sobre o papel relativo da solubilidade e da hidrólise da proteína na sua utilização pelas larvas.

Nas experiências descritas nos capítulos anteriores, a separação entre o efeito da solubilidade e o da hidrólise da proteína não foi efectuada, na medida em que a fonte de azoto solúvel era o próprio hidrolisado. Assim, as experiências descritas neste capítulo tiveram como principal objectivo investigar a importância relativa da solubilidade e da hidrólise da caseína das dietas na sua utilização pelas larvas de carpa. Considerando que as larvas mais jovens parecem utilizar a caseína nativa

menos eficientemente do que as de idade mais avançada, pretendeu-se igualmente determinar a partir de que momento, durante as primeiras semanas de desenvolvimento larvar, as larvas estarão aptas a utilizar de forma eficaz essa fonte proteica. À semelhança do trabalho discutido no capítulo anterior, foi igualmente estudado o efeito do grau de hidrólise da proteína.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas três experiências com larvas de carpa, tendo-se fornecido as dietas microparticuladas desde o início da alimentação exógena. As experiências decorreram na Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" de acordo com as condições apresentadas na tabela 6.1.

EXPERIÊNCIA 8

As dietas experimentais (isoenergéticas e isoazotadas) diferiam na quantidade de proteína solúvel e na proporção relativa dos dois componentes dessa fracção solúvel (o caseinato de sódio – uma forma solúvel não hidrolisada de caseína - e o hidrolisado de caseína) (tabela 6.2). A dieta S0 serviu de controle e incluía a caseína nativa como única fonte proteica. Nas restantes dietas 25, 50, 75 e 100% da caseína nativa foi substituída por caseína solúvel. Nas dietas em que 25% da caseína era solúvel a percentagem de caseína hidrolisada em relação ao caseinato de sódio foi de 0, 25, 50 e 100% (respectivamente nas dietas S25, S25H25, S25H50 e S25H100). Nas dietas em que 50 e 75% da caseína era solúvel essa percentagem foi de 0, 50 e 100% (respectivamente nas dietas S50 e S75, S50H50 e S75H50, S50H100 e S75H100) e na dieta em que 100% da caseína era solúvel foi de 0% (dieta S100). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). Todas as dietas foram testadas em duplicado.

Com o intuito de determinar o momento a partir do qual as larvas terão capacidade para utilizar eficientemente a caseína nativa, constituíram-se dois grupos adicionais, também em duplicado, que foram sujeitos a diferente tratamento. Um dos grupos foi alimentado com a dieta S25H25 durante as primeiras duas semanas experimentais, passando a ser alimentado com a dieta S0 na última semana (tratamento 2); o outro grupo foi alimentado com a dieta S25H25 apenas durante a primeira semana experimental, passando a ser alimentado com a dieta S0 nas restantes duas semanas (tratamento 3). Os resultados destes dois tratamentos

TABELA 6.1. Condições experimentais nas experiências 8, 9 e 10.

Espécie	Experiência 8	Experiência 9	Experiência 10
	C. carpio	C. carpio	C. carpio
Comprimento inicial (mm)	7,3	6,3	6,4
Larvas por tanque	250	250	250
Período experimental (dias)	21	28	28
Temperatura (°C)	24±1 ¹	24±1 ²	24±1 ²
Salinidade (‰)	0	0	0
Fotoperíodo (h, luz:obscuridade)	16:8	16:8	16:8
Fluxo de água (l min ⁻¹)	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4	0,3 - 0,4
Diâmetro da partícula alimentar (µm)			
	1ª semana	100-200	100-200
	2ª semana	200-400	200-400
	3ª semana	400-600	400-600
	4ª semana	400-600	400-600

¹ Temperatura gradualmente elevada de 21±1 para 24±1°C entre o dia 0 e o dia 3, e mantida a 24±1°C após o dia 3.

² Temperatura gradualmente elevada de 20±1 para 24±1°C entre o dia 0 e o dia 4, e mantida a 24±1°C após o dia 4.

TABELA 6.2. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas na experiência 8.

Dietas	S0	S25	S25 H25	S25 H50	S25 H100	S50	S50 H50	S50 H100	S75	S75 H50	S75 H100	S100
<i>Ingredientes (% ms)</i>												
Caseína ¹	60,0	45,0	45,0	45,0	45,0	30,0	30,0	30,0	15,0	15,0	15,0	—
Caseinato de sódio ²	—	15,0	11,25	7,5	—	30,0	15,0	—	45,0	22,5	—	60,0
Hidrolisado de caseína ³	—	—	3,75	7,5	15,0	—	15,0	30,0	—	22,5	45,0	—
Óleo de amendoim ⁴	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Óleo de fígado de bacalhau	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfatidilcolina ⁵	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mistura vitamínica ⁶	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Vitamina C (25%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mistura mineral ⁷	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Dextrina ⁸	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
<i>Composição analítica</i>												
Matéria seca (ms, %)	91,5	91,5	90,6	93,8	93,4	91,2	93,0	94,4	90,4	91,2	90,9	90,2
Proteína bruta (% ms)	62,1	59,5	57,4	60,2	61,7	58,7	59,2	59,9	58,0	58,0	55,7	58,1
Cinzas (% ms)	9,7	10,1	10,4	9,8	9,8	10,4	9,8	10,4	10,5	11,0	10,4	10,7
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	19,6	19,3	19,1	20,1	19,9	19,1	19,6	19,7	19,1	19,0	18,3	19,1

¹ Caseína isenta de vitaminas, Calbiochem 21859; ² Sigma C8654; ³ N-Z-Amine A, Sigma C0626; ⁴ Sigma P2144; ⁵ Sigma P9671; ⁶ Coves et al. (1991), ver experiências 5 e 6; ⁷ Luquet (1971), ver experiência 1; ⁸ Sigma D2256

foram então comparados com os obtidos no grupo alimentado com a dieta S25H25 durante as três semanas experimentais (tratamento 1).

Semanalmente (dias 7, 14 e 21) procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito um sistema semi-automático de análise de imagem (*LEICA QWin*, Alemanha). No final da experiência constatou-se visualmente uma grande variação no tamanho das larvas em alguns grupos, por oposição a outros em que havia uma grande homogeneidade. Por esse motivo, efectuou-se a pesagem individual de todos os animais sobreviventes de cada tanque, calculando-se o coeficiente de variação do peso final para cada grupo.

EXPERIÊNCIA 9

O objectivo desta experiência foi o de estudar o efeito do grau de hidrólise da caseína. Formularam-se três dietas que continham as mesmas proporções de caseína, caseinato de sódio e hidrolisado de caseína da dieta S25H25 da experiência anterior (a que conduziu aos melhores resultados), mas diferindo quanto ao tipo de hidrolisado de caseína incorporado (tabela 6.3). Assim, foram formuladas as dietas A25, EKC25 e HD25 contendo hidrolisados enzimáticos de caseína com um perfil de distribuição de pesos moleculares diferente (dados fornecidos pela SIGMA): N-Z-Amine A (54,2% de 100-200 Da; 36,2% de 200-500 Da; 8,8% de 500-1000 Da), N-Z-Amine EKC (17,0% de 100-200 Da; 43,0% de 200-500 Da; 34,0% de 500-1000 Da) e N-Z-Amine HD (71,0% de 100-200 Da; 25,0% de 200-500 Da; 4,0% de 500-1000 Da). O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). As dietas foram testadas em triplicado.

Semanalmente (dias 7, 14, 21 e 28) procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito uma lupa binocular.

EXPERIÊNCIA 10

Pretendeu-se nesta experiência estudar igualmente o efeito do grau de hidrólise da caseína mas, na sequência dos resultados da experiência 9, foi aumentado o teor de inclusão dos hidrolisados na dieta (tabela 6.3). Procurou-se, assim, potenciar a acção desses hidrolisados, de modo a permitir que se manifestassem efeitos sobre as larvas que eventualmente não se tivessem manifestado com o nível de incorporação usado anteriormente. O teor de hidrolisados foi, neste caso, idêntico ao utilizado na dieta S25H100 da experiência 8, tendo-se constituído as dietas

TABELA 6.3. Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas nas experiências 9 e 10.

Dietas	Experiência 9			Experiência 10		
	A25	EKC25	HD25	A100	EKC100	HD100
<i>Ingredientes (% ms)</i>						
Caseína ¹	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0
Caseinato de sódio ²	11,25	11,25	11,25	—	—	—
Hidrolisado de caseína 1 ³	3,75	—	—	15,0	—	—
Hidrolisado de caseína 2 ⁴	—	3,75	—	—	15,0	—
Hidrolisado de caseína 3 ⁵	—	—	3,75	—	—	15,0
Óleo de amendoim ⁶	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Óleo de fígado de bacalhau	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfatidilcolina ⁷	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mistura vitamínica ⁸	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Vitamina C (25%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mistura mineral ⁹	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Dextrina ¹⁰	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0	22,0
<i>Composição analítica</i>						
Matéria seca (ms, %)	89,8	89,7	89,9	91,0	92,2	91,3
Proteína bruta (% ms)	62,9	59,9	59,2	62,3	60,2	60,3
Cinzas (% ms)	9,8	9,8	9,8	9,7	9,6	9,4
Energia bruta (kJ g ⁻¹ ms)	19,5	19,1	19,2	20,2	20,0	19,4

¹ Caseína isenta de vitaminas, Calbiochem 21859; ² Sigma C8654; ³ N-Z-Amine A, Sigma C0626; ⁴ N-Z-Amine EKC, Sigma N4767; ⁵ N-Z-Amine HD, Sigma C7210; ⁶ Sigma P2144; ⁷ Sigma P9671; ⁸ Coves et al. (1991), ver experiências 5 e 6; ⁹ Luquet (1971), ver experiência 1; ¹⁰ Sigma D2256

A100, EKC100 e HD100. O perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais apresenta-se no capítulo 7 (tabela 7.4). As dietas foram testadas em triplicado.

Semanalmente (dias 7, 14, 21 e 28) procedeu-se à amostragem de larvas para medição do comprimento total, utilizando-se para o efeito uma lupa binocular.

6.3. RESULTADOS

EXPERIÊNCIA 8

A mortalidade completa do grupo mantido em jejum verificou-se ao 8º dia experimental (figura 6.1). Nos restantes grupos observou-se uma mortalidade acentuada durante os três primeiros dias de alimentação exógena. Da primeira semana em diante a mortalidade manteve-se reduzida nos grupos aos quais se forneceram as dietas S25, S25H25, S25H50, S50, S75 e S100 (tabela 6.4, figura 6.1). Pelo contrário, nos grupos alimentados com as dietas contendo maiores níveis de hidrolisado – S25H100, S50H50, S50H100, S75H50 e S75H100 – verificou-se um decréscimo progressivo da sobrevivência. No caso do grupo S75H100 esse decréscimo foi muito acentuado, não restando qualquer larva sobrevivente no final da segunda semana (figura 6.1). No final do ensaio a sobrevivência mais elevada foi observada no grupo alimentado com a dieta S25H25 (78%), mas não se diferenciou estatisticamente dos grupos alimentados com as dietas S25, S25H50, S50, S75 e S100. Nos grupos S0, S25H100, S75H50 e S50H100 registou-se uma sobrevivência significativamente mais baixa do que nos restantes grupos (tabela 6.4).

Diferenças significativas no crescimento eram já detectáveis entre os vários grupos ao 7º dia (tabela 6.4), as larvas alimentadas com as dietas S25H25 e S75H100 apresentando respectivamente o maior e o menor comprimento. No final do ensaio, as larvas alimentadas com as duas dietas que incluíam maior quantidade de hidrolisado (S50H100 e S75H50) tinham um comprimento significativamente menor do que as dos restantes grupos (tabela 6.4, figura 6.2). As larvas às quais se forneceu a dieta S25H25 apresentaram o maior comprimento final, porém não estatisticamente diferente do das larvas alimentadas com as dietas S25, S25H50 e S75. Os valores de peso e biomassa finais revelaram, de um modo geral, a mesma tendência do comprimento final, acentuando algumas das diferenças manifestadas relativamente a este parâmetro (tabela 6.4, figura 6.3).

TABELA 6.4. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final, coeficiente de variação do peso final (CV Peso final) e biomassa final teórica das larvas na experiência 8.

Dietas	S0	S25	S25 H25	S25 H50	S25 H100	S50	S50 H50	S50 H100	S75	S75 H50	S75 H100	S100	Erro da média
Sobrevivência (%)													
dia 7	59 ^b	68 ^{ab}	80 ^a	74 ^{ab}	67 ^{ab}	72 ^{ab}	71 ^{ab}	62 ^b	61 ^b	70 ^{ab}	62 ^b	59 ^b	3,266
dia 14	33 ^d	65 ^{ab}	79 ^a	71 ^{ab}	59 ^{abc}	70 ^{ab}	62 ^{ab}	33 ^d	57 ^{bc}	41 ^{cd}		55 ^{bc}	4,251
dia 21	30 ^c	64 ^{ab}	78 ^a	67 ^{ab}	34 ^c	67 ^{ab}	51 ^b	12 ^d	57 ^{ab}	28 ^c		55 ^{ab}	4,838
Comprimento (mm)													
dia 7	10,5 ^{bc}	11,2 ^{ab}	12,0 ^a	11,4 ^{ab}	11,2 ^{ab}	11,1 ^{ab}	11,3 ^{ab}	10,6 ^{bc}	10,5 ^{bc}	10,5 ^{bc}	10,0 ^c	10,6 ^{bc}	0,190
dia 14	13,3 ^c	15,5 ^{ab}	16,2 ^a	15,1 ^{ab}	13,1 ^{cd}	14,0 ^{bc}	14,2 ^{bc}	11,7 ^e	14,4 ^{bc}	12,1 ^{de}		14,1 ^{bc}	0,324
dia 21	18,7 ^{cd}	21,0 ^{ab}	21,7 ^a	20,7 ^{ab}	16,7 ^e	19,3 ^{bcd}	17,7 ^{de}	14,3 ^f	20,0 ^{abc}	14,6 ^f		19,3 ^{bcd}	0,428
TCE (%)													
dias 0-7	5,2 ^{bc}	6,1 ^{ab}	7,1 ^a	6,4 ^{ab}	6,1 ^{ab}	6,0 ^{ab}	6,2 ^{ab}	5,3 ^{bc}	5,1 ^{bc}	5,1 ^{bc}	4,5 ^c	5,3 ^{bc}	0,243
dias 7-14	3,4 ^{ab}	4,6 ^a	4,3 ^a	4,0 ^a	2,2 ^{bc}	3,3 ^{ab}	3,2 ^{ab}	1,5 ^c	4,6 ^a	2,1 ^{bc}		4,1 ^a	0,376
dias 14-21	4,8 ^a	4,4 ^a	4,2 ^a	4,5 ^a	3,5 ^a	4,6 ^a	3,2 ^a	2,9 ^a	4,7 ^a	2,7 ^a		4,4 ^a	0,398
Peso (mg.ind ⁻¹)	74,2 ^{de}	108,5 ^{ab}	119,3 ^a	98,3 ^{bc}	50,4 ^f	81,2 ^{cde}	62,9 ^{ef}	21,0 ^g	87,4 ^{cd}	29,9 ^g		86,1 ^{cd}	5,109
CV Peso (%)	63,6 ^d	28,9 ^{ab}	23,1 ^a	31,0 ^{ab}	49,7 ^c	36,6 ^{abc}	42,9 ^{bc}	72,0 ^d	35,3 ^{abc}	69,3 ^d		34,1 ^{abc}	3,336
Biomassa (g)	2,3 ^{de}	7,0 ^b	9,2 ^a	6,6 ^{bc}	1,7 ^{def}	5,4 ^{bc}	3,2 ^d	0,2 ^f	4,9 ^c	0,8 ^{ef}		4,7 ^c	0,451

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

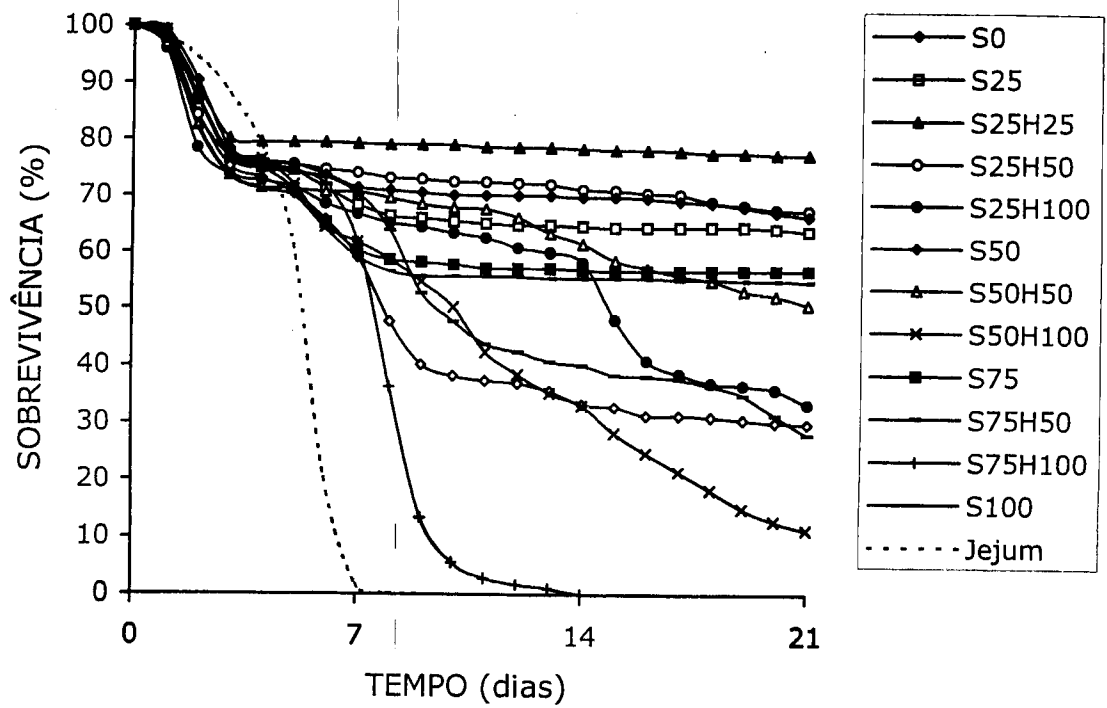


FIGURA 6.1. Sobrevivência larvar na experiência 8.

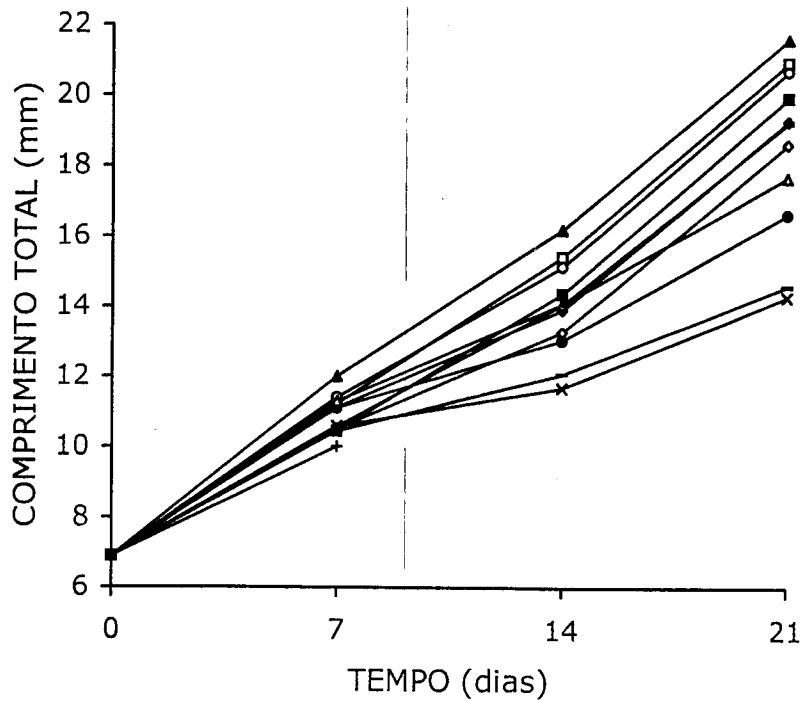


FIGURA 6.2. Crescimento larvar na experiência 8 (ver legenda da figura 6.1).

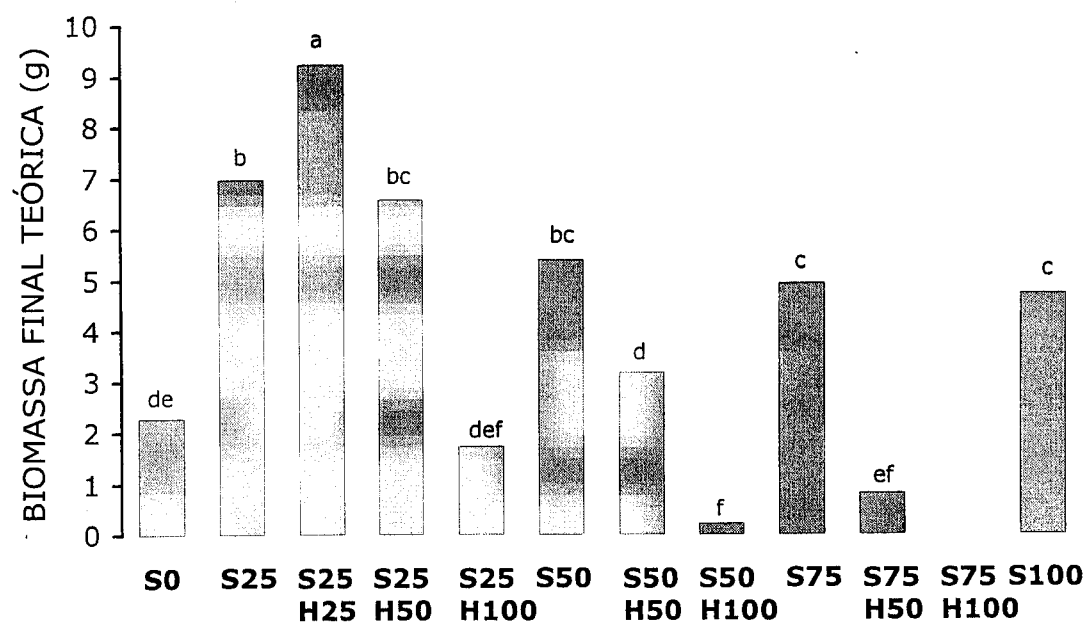


FIGURA 6.3. Biomassa final teórica na experiência 8 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

O coeficiente de variação do peso final mostrou uma tendência inversa à do crescimento, o que significa que os grupos com melhor crescimento apresentaram maior homogeneidade em termos de peso individual (tabela 6.4).

Na tabela 6.5 apresentam-se os valores obtidos para os diferentes parâmetros nos grupos aos quais se forneceu a dieta S25H25 durante todo o período experimental e naqueles em que essa dieta foi substituída pela dieta S0, ao fim da primeira ou da segunda semana.

A sobrevivência final não diferiu significativamente entre os grupos submetidos aos diferentes tratamentos, apesar de ter sido mais elevada quando a dieta S25H25 foi fornecida ao longo das três semanas. Em termos de crescimento (comprimento e peso) e de biomassa, os valores foram ligeiramente mais baixos quando se procedeu à substituição da dieta, e tanto menores quanto mais cedo foi a substituição. No entanto, apenas em relação ao comprimento as diferenças foram significativas, distinguindo o grupo que recebeu a dieta S25H25 durante apenas a primeira semana dos restantes grupos. O coeficiente de variação do peso foi tanto

maior quanto menor o peso médio larvar, sendo o grupo alimentado com a dieta S25H25 durante todo o período experimental significativamente mais homogêneo do que aquele que recebeu essa dieta apenas na primeira semana.

TABELA 6.5. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final, coeficiente de variação do peso final (CV Peso final) e biomassa final teórica (PS) das larvas sujeitas aos diferentes tratamentos.

Tratamento	1	2	3	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>				
dia 7	80 ^a	68 ^a	74 ^a	3,488
dia 14	79 ^a	67 ^a	71 ^a	2,784
dia 21	78 ^a	66 ^a	67 ^a	4,330
<i>Comprimento (mm)</i>				
dia 7	12,0 ^a	12,0 ^a	11,5 ^a	0,185
dia 14	16,2 ^a	16,3 ^a	15,5 ^a	0,323
dia 21	21,7 ^a	21,1 ^a	20,3 ^b	0,178
<i>TCE (%)</i>				
dias 0-7	7,1 ^a	7,1 ^a	6,4 ^a	0,220
dias 7-14	4,3 ^a	4,4 ^a	4,3 ^a	0,182
dias 14-21	4,2 ^a	3,7 ^a	3,9 ^a	0,213
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>	119,3 ^a	109,1 ^a	96,2 ^a	7,203
<i>CV Peso (%)</i>	23,1 ^a	27,8 ^{ab}	33,5 ^b	1,579
<i>Biomassa (g)</i>	9,2 ^a	7,2 ^a	6,5 ^a	0,697

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

Tratamento 1 – Larvas alimentadas com a dieta S25H25 ao longo das 3 semanas experimentais.

Tratamento 2 – Larvas alimentadas com a dieta S25H25 durante as 1^a e 2^a semanas e com a dieta S0 na restante.

Tratamento 3 – Larvas alimentadas com a dieta S25H25 durante a 1^a semana e com a dieta S0 nas restantes duas.

EXPERIÊNCIA 9

A mortalidade completa do grupo mantido em jejum ocorreu no 12º dia experimental (figura 6.4). Nos grupos alimentados a mortalidade foi praticamente nula até ao dia 4, a partir do qual aumentou de forma brusca e acentuada, só manifestando tendência para estabilizar após a segunda semana. O grupo alimentado com a dieta EKC25 apresentou sobrevivência mais elevada ao longo de toda a experiência, mas as diferenças registadas entre os grupos não foram, contudo, significativas (tabela 6.6).

Também em relação ao crescimento não se observaram diferenças significativas entre os grupos, tanto no comprimento (tabela 6.6, figura 6.5) como no peso final. O mesmo se passou no que diz respeito à biomassa final, não obstante o valor apreciavelmente inferior obtido com a dieta HD25 (tabela 6.6, figura 6.6).

EXPERIÊNCIA 10

A mortalidade completa do grupo mantido em jejum ocorreu no 10º dia experimental (figura 6.7). Nos grupos alimentados constatou-se a diminuição progressiva da sobrevivência ao longo de todo o período da experimental, não se notando uma tendência para a sua estabilização. O decréscimo na sobrevivência foi mais marcado no grupo alimentado com a dieta A100, o qual se tornou significativamente diferente dos outros dois grupos a partir da terceira semana (tabela 6.7).

O crescimento foi semelhante nos três grupos (figura 6.8), mas os valores médios de comprimento e de peso finais foram consistentemente maiores no grupo alimentado com a dieta EKC100 e menores no grupo alimentado com a dieta HD100 (tabela 6.7). A biomassa final foi também maior no grupo alimentado com a dieta EKC100, que neste caso diferiu significativamente do grupo alimentado com a dieta A100 (tabela 6.7, figura 6.9).

6.4. DISCUSSÃO

Alguns estudos com ciprinídeos indicam uma fraca utilização alimentar da caseína nativa pelas larvas, tendo em conta a baixa performance zootécnica obtida com dietas à base desta proteína. Sen *et al.* (1978) observaram sobrevivência e crescimento reduzidos de larvas de carpa comum alimentadas desde a reabsorção das reservas vitelinas com uma dieta contendo caseína como única fonte proteica,

TABELA 6.6. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final e biomassa final teórica das larvas na experiência 9.

Dietas	A25	EKC25	HD25	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>				
dia 7	56 ^a	70 ^a	58 ^a	11,963
dia 14	34 ^a	45 ^a	23 ^a	9,360
dia 21	27 ^a	39 ^a	17 ^a	8,573
dia 28	24 ^a	35 ^a	15 ^a	7,570
<i>Comprimento (mm)</i>				
dia 7	8,4 ^a	8,6 ^a	8,5 ^a	0,195
dia 14	10,8 ^a	11,1 ^a	10,7 ^a	0,296
dia 21	15,7 ^a	16,3 ^a	14,8 ^a	0,739
dia 28	21,2 ^a	19,9 ^a	21,0 ^a	0,495
<i>TCE (%)</i>				
dias 0-7	4,1 ^a	4,4 ^a	4,3 ^a	0,327
dias 7-14	3,6 ^a	3,6 ^a	3,2 ^a	0,353
dias 14-21	5,2 ^a	5,5 ^a	4,6 ^a	0,489
dias 21-28	4,3 ^{ab}	2,9 ^b	5,1 ^a	0,457
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>				
	134,5 ^a	123,2 ^a	125,2 ^a	14,330
<i>Biomassa (g)</i>				
	3,4 ^a	4,0 ^a	1,8 ^a	0,955

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

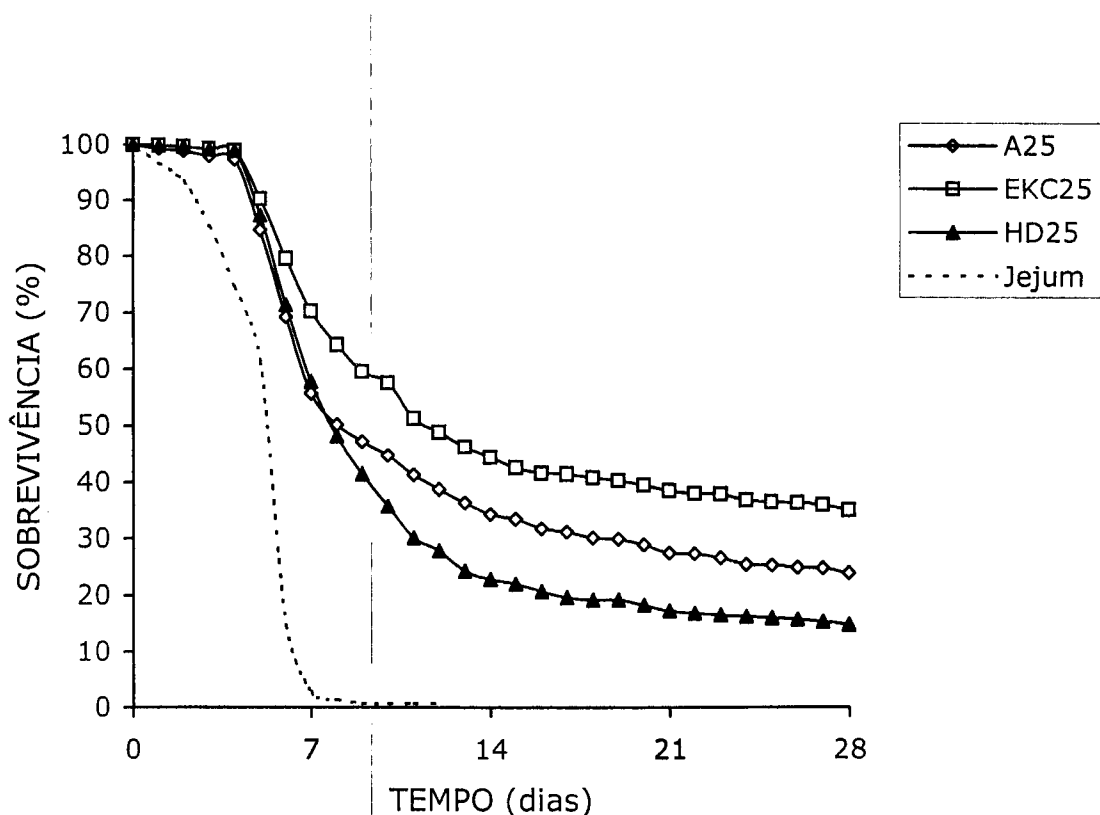


FIGURA 6.4. Sobrevivência larvar na experiência 9.

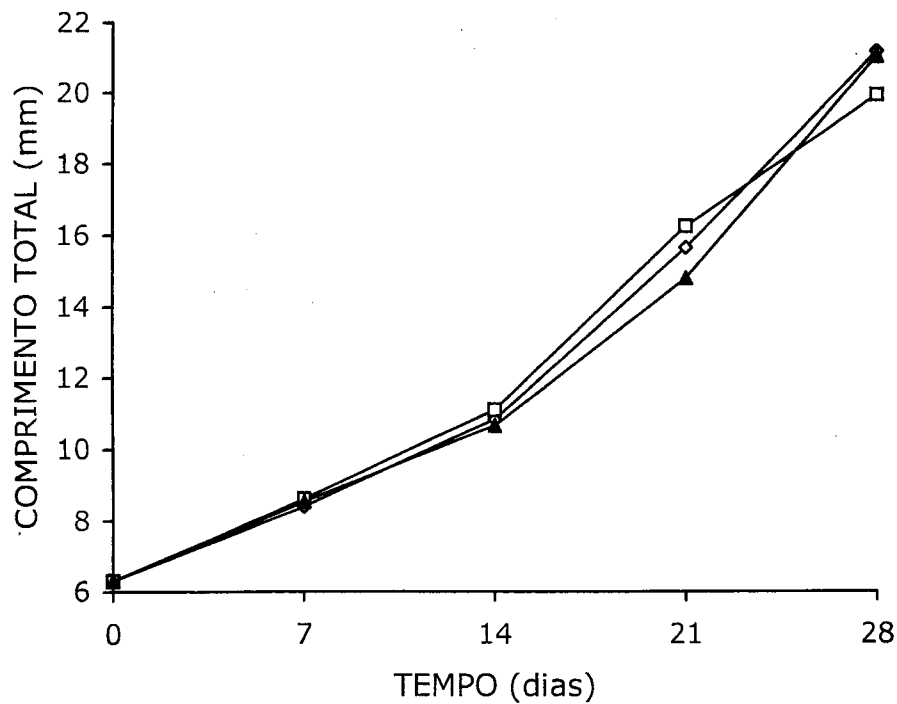


FIGURA 6.5. Crescimento larvar na experiência 9 (ver legenda da figura 6.4).

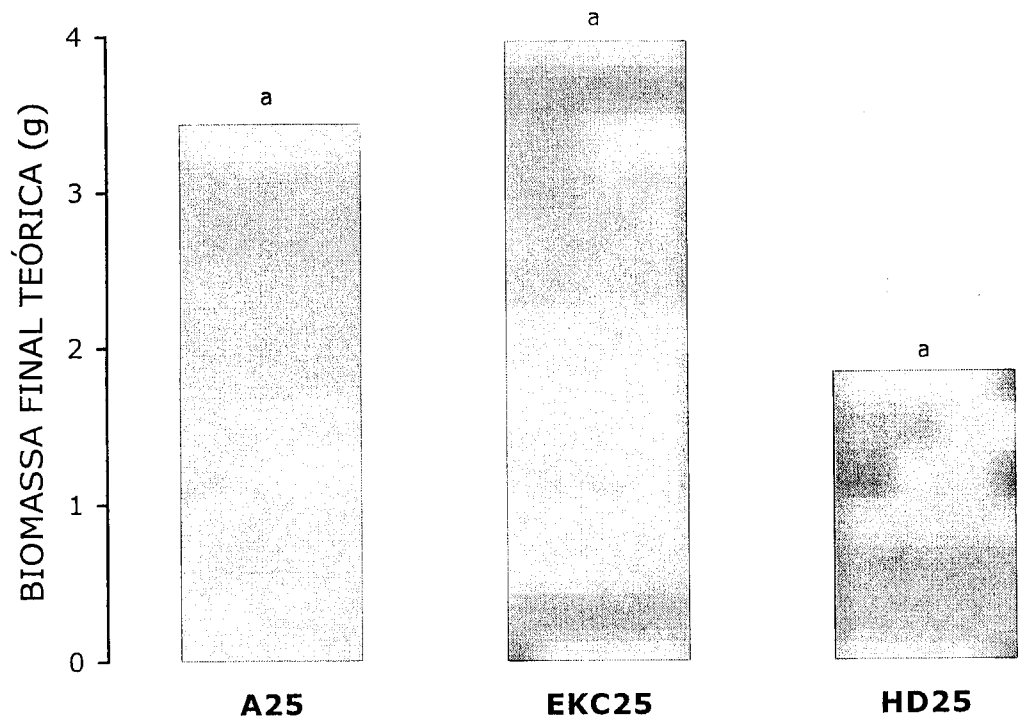


FIGURA 6.6. Biomassa final teórica na experiência 9 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P > 0,05$).

TABELA 6.7. Valores médios de sobrevivência, comprimento total, taxa de crescimento específico (TCE), peso final e biomassa final teórica das larvas na experiência 10.

Dietas	A100	EKC100	HD100	Erro da média
<i>Sobrevivência (%)</i>				
dia 7	88 ^a	88 ^a	89 ^a	3,810
dia 14	65 ^a	80 ^a	77 ^a	4,489
dia 21	48 ^b	68 ^a	71 ^a	5,144
dia 28	33 ^b	60 ^a	64 ^a	5,342
<i>Comprimento (mm)</i>				
dia 7	8,8 ^a	9,1 ^a	8,8 ^a	0,262
dia 14	11,7 ^a	12,4 ^a	11,8 ^a	0,419
dia 21	14,2 ^a	16,1 ^a	14,8 ^a	0,467
dia 28	18,1 ^a	19,3 ^a	17,4 ^a	0,467
<i>TCE (%)</i>				
dias 0-7	4,6 ^a	5,0 ^a	4,6 ^a	0,422
dias 7-14	4,1 ^a	4,5 ^a	4,2 ^a	0,352
dias 14-21	2,7 ^a	3,7 ^a	3,2 ^a	0,604
dias 21-28	3,4 ^a	2,6 ^a	2,3 ^a	0,373
<i>Peso (mg.ind⁻¹)</i>	69,4 ^a	87,1 ^a	55,5 ^a	10,076
<i>Biomassa (g)</i>	2,4 ^b	5,1 ^a	3,6 ^{ab}	0,591

Em cada linha, valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$)

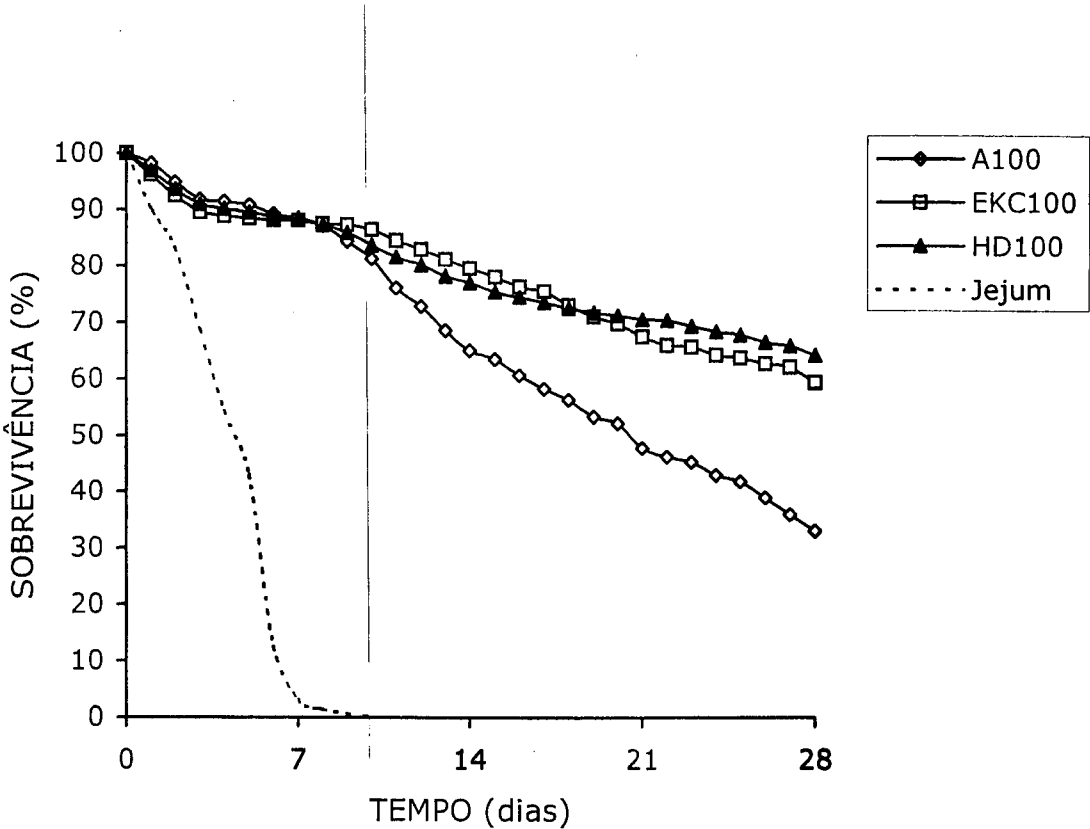


FIGURA 6.7. Sobrevivência larvar na experiência 10.

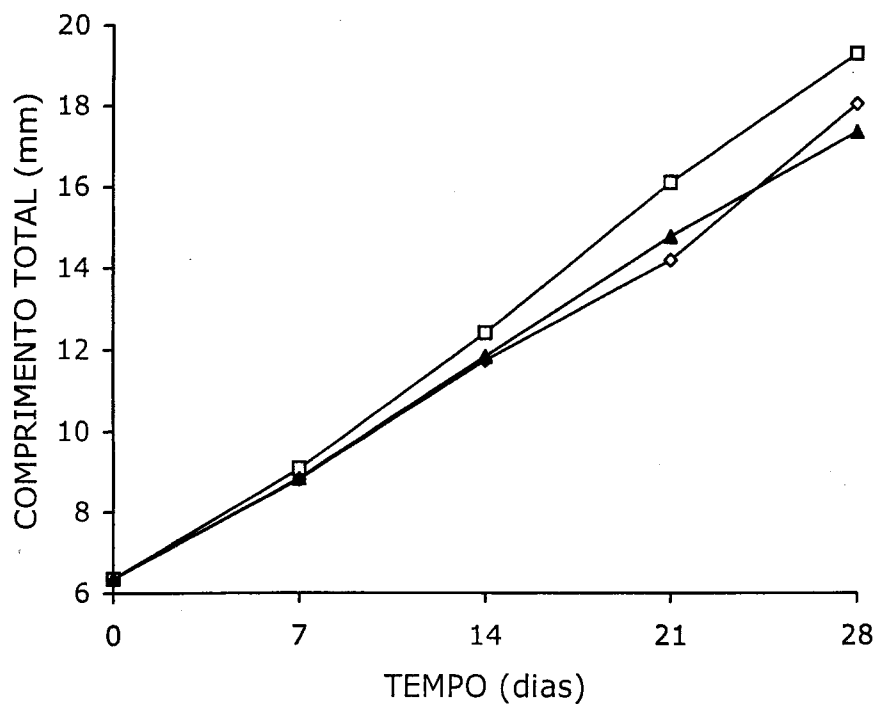


FIGURA 6.8. Crescimento larvar na experiência 10 (ver legenda da figura 6.7).

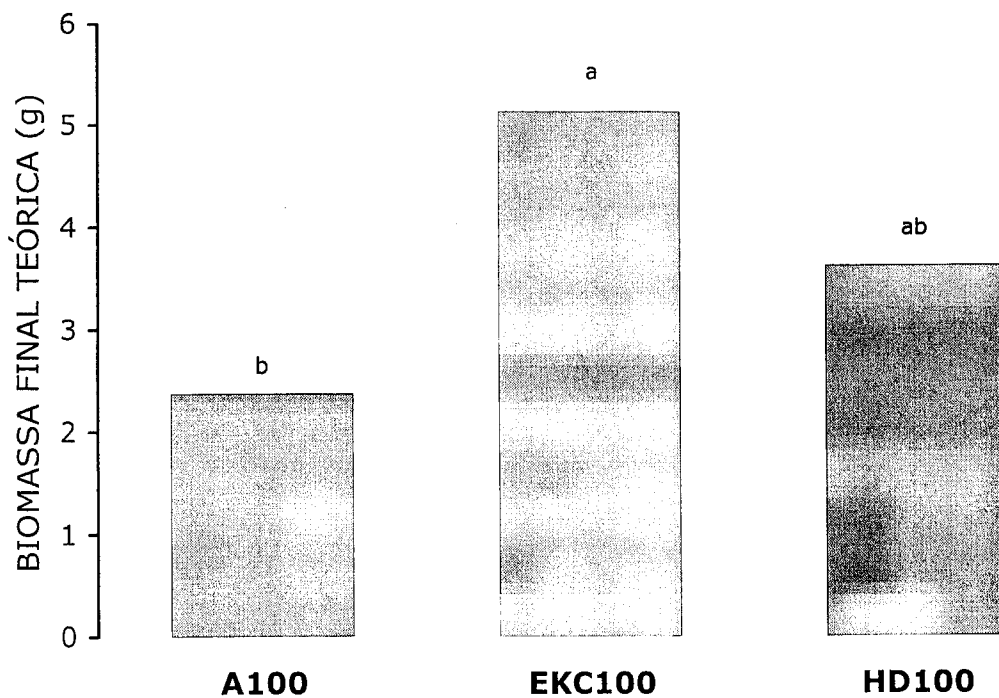


FIGURA 6.9. Biomassa final teórica na experiência 10 (valores partilhando a mesma letra não são estatisticamente diferentes, $P>0,05$).

dieta essa que conduziu a resultados satisfatórios em juvenis da mesma espécie. Em larvas de peixe vermelho (*Carassius auratus*) o mesmo tipo de dieta provocou mortalidade superior a 90% nos primeiros nove dias de alimentação exógena, mas proporcionou níveis elevados de sobrevivência (>90%) e um crescimento apreciável quando fornecida a partir do 9º dia (Mousseau, 1988). Para a mesma espécie, e com uma dieta semelhante, é ainda referida uma sobrevivência de 9% ao 17º dia de alimentação exógena, valor que melhora significativamente (41-48%) se metade da caseína da dieta for incorporada na forma hidrolisada (Szlaminska et al., 1993).

Os resultados obtidos na experiência 8 com a dieta à base de caseína nativa como única fonte proteica (dieta S0) foram bastante superiores aos relatados nos estudos acima mencionados. Apesar do grupo alimentado com essa dieta ter sofrido uma mortalidade importante, a sobrevivência registada (30% ao 21º dia) foi muito superior à observada por Mousseau (1988) e Szlaminska et al. (1993) em idênticas condições experimentais (respectivamente menos de 10% ao 9º dia e 9% ao 17º dia). Além disso, também o crescimento larvar foi melhor do que o obtido pelos referidos autores: 10,5 mm e 13,3 mm de comprimento médio aos 7º e 14º dias respectivamente contra cerca de 7,5 mm ao 7º dia (Mousseau, 1988) e 9,2 mm ao 14º dia (Szlaminska et al., 1993). A explicação para os melhores resultados obtidos no presente trabalho poderá, em parte, estar relacionada com a inclusão de fosfatidilcolina nas dietas, tendo em consideração o carácter essencial dos fosfolípidos dietários na sobrevivência inicial e no crescimento das larvas (Radünz-Neto et al., 1994; Geurden et al., 1995).

Os resultados da experiência 8 evidenciam a importância da forma como é fornecida a caseína no rendimento zootécnico larvar. A figura 6.10 resume a influência do grau de solubilidade da proteína e do teor de hidrolisado da dieta na biomassa final, critério em que melhor são evidenciadas as diferenças observadas. A inclusão de caseinato de sódio na dieta, em particular num nível correspondente a 25% de substituição da caseína nativa, melhorou eficazmente a performance larvar. Parece provável que a adição do caseinato de sódio torne as dietas mais facilmente digeríveis pelas larvas. Szlaminska et al. (1993) sugeriram que, apesar do potencial digestivo das larvas, a consistência dura da caseína poderia limitar a sua utilização, e que formas com consistência menos dura seriam mais facilmente digeridas pelas enzimas proteolíticas. Por outro lado, a adição de caseína hidrolisada parece só ser vantajosa quando o azoto solúvel não excedeu os 25% do azoto total, e no caso desta não ter contribuído para a totalidade da solubilidade.

Além disso, qualquer que tivesse sido a percentagem de azoto solúvel da dieta, sempre que este foi integralmente fornecido pelo hidrolisado os resultados finais foram inferiores aos observados com a dieta contendo apenas a caseína nativa. Esta situação verificou-se nos grupos alimentados com as dietas S25H100, S50H100 e S75H100, neste último grupo ocorrendo mesmo a mortalidade completa no decurso do período experimental. Neste aspecto os resultados estão em desacordo com os de Szlaminska *et al.* (1993), uma vez que estes autores constataram melhor sobrevivência final com dietas contendo 50 e 100% de caseína hidrolisada em substituição da caseína nativa do que com a dieta incluindo apenas a caseína nativa.

Saliente-se que as três referidas dietas, assim como as dietas S50H50 e S75H50 que conduziram também a resultados pouco satisfatórios, continham níveis elevados da fracção correspondente aos aminoácidos livres (ver capítulo 7, tabela 7.4), o que poderá ter sido uma das principais causas desses resultados, tal como foi discutido no capítulo anterior.

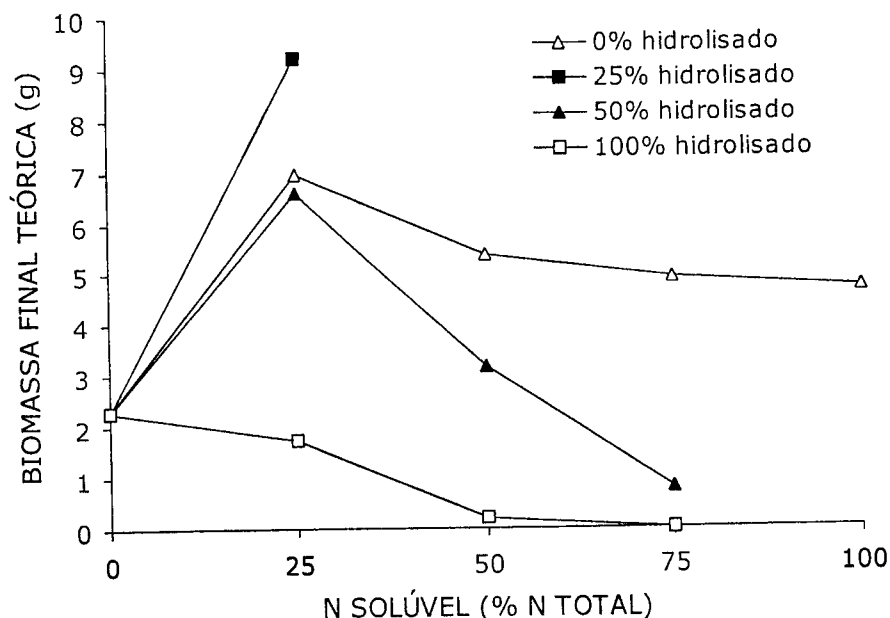


FIGURA 6.10. Efeito da percentagem de azoto (N) solúvel e de hidrolisado da dieta na biomassa final teórica (experiência 8).

Alguns autores propõem a utilização do coeficiente de variação do peso final (ou do comprimento final), conjuntamente com o peso final (ou o comprimento final),

como parâmetro para aferir a qualidade das dietas para larvas (Rösch, 1989; Szlaminska *et al.*, 1990). Tal sugestão baseia-se na importância atribuída à rápida aceitação e ingestão do alimento pelas larvas que, segundo Rösch (1989), será um dos principais factores de que depende a qualidade da dieta. Baixos valores do coeficiente de variação reflectem maior homogeneidade no crescimento das larvas e serão indicadores de boa qualidade da dieta, ao contrário de valores elevados. No presente caso, os valores mais baixos do coeficiente de variação do peso final estiveram invariavelmente associados às dietas que conduziram aos melhores crescimentos, registando-se valores abaixo de 30%, que é considerado o valor em torno do qual os coeficientes traduzirão uma homogeneidade aceitável (Gatesoupe *et al.*, 1999).

A análise dos resultados obtidos com a série de dietas com 25% de azoto solúvel apoia a hipótese formulada anteriormente (capítulos 4 e 5) sobre a existência de um nível óptimo de incorporação de hidrolisado, a partir do qual os efeitos passarão a ser negativos. A dieta S25H25 continha as três formas de caseína em proporção idêntica às de uma dieta base usada por outros autores, possibilitando um termo de comparação, razão pela qual foi seleccionada. Relativamente aos trabalhos desses autores, realizados em condições experimentais similares, obtiveram-se neste trabalho, de um modo geral, resultados um pouco melhores do que os referidos por Escaffre *et al.* (1997) e por Gouillou-Coustans *et al.* (1998), semelhantes aos verificados por Radünz-Neto *et al.* (1996) e Geurden *et al.* (1997) e ligeiramente piores do que os de Radünz-Neto *et al.* (1994).

O segundo objectivo da experiência 8 consistia na determinação do momento a partir do qual as larvas estariam aptas a utilizar eficazmente a caseína nativa. De acordo com o conjunto dos resultados obtidos, a caseína nativa teria sido particularmente mal utilizada durante a primeira semana de alimentação exógena. Nesse período, o fornecimento de uma dieta contendo 25% de formas alternativas de caseína foi imprescindível para assegurar um rendimento zootécnico satisfatório, o qual pôde ser ainda significativamente melhorado protelando o fornecimento dessa dieta por mais uma semana. Após o período de tempo correspondente às duas primeiras semanas de alimentação exógena à base desta dieta, as larvas teriam adquirido a capacidade para utilizar de modo eficaz a caseína nativa. Neste sentido, confirmaram-se as observações que apontavam para uma mais eficiente utilização da caseína nativa pelas larvas dos ciprinídeos partir do 9º dia após a abertura do esófago (Mousseau, 1988) e por juvenis (Sen *et al.*, 1978), comparativamente às larvas no início da alimentação exógena. Curiosamente,

Pector *et al.* (1993) não observaram qualquer melhoria na utilização de dietas à base de caseína nativa por juvenis de peixe-gato (*Clarias gariepinus*), relativamente a larvas no início da alimentação exógena.

Nas experiências 9 e 10 procurou verificar-se o efeito do tipo de hidrolisado de caseína sobre o rendimento larvar. Comparando os resultados obtidos entre os grupos alimentados com dietas de igual composição em experiências diferentes (dietas S25H25 e A25, respectivamente nas experiências 8 e 9, e dietas S25H100 e A100, respectivamente nas experiências 8 e 10), constata-se uma grande disparidade. O facto das larvas serem provenientes de posturas diferentes poderá explicar parte da variabilidade observada. A diferença mais relevante – a grande mortalidade ocorrida na experiência 9 durante a segunda semana – foi, porém, completamente inesperada tendo em consideração os resultados da experiência 8. Um aumento brusco e acentuado da mortalidade no decurso da experiência foi relatado por Radünz-Neto (1993), sendo atribuído a um abaixamento do teor de oxigénio dissolvido na água. No caso presente, outra explicação poderá estar relacionada com o facto dos ovos serem originários da primeira postura da fêmea utilizada para o efeito, sendo frequente ovos das primeiras posturas terem uma qualidade inferior, que se reflecte na qualidade das larvas.

Na experiência 9 verificou-se uma enorme variabilidade intra-grupo na sobrevivência final. Na medida em que esta grande variabilidade e a baixa sobrevivência geral ocorrida poderão ter sido determinantes para a ausência de diferenças significativas entre os grupos, os resultados não deverão ser considerados conclusivos.

Na experiência 10 a tendência para o decréscimo progressivo da sobrevivência dos vários grupos ao longo do período experimental foi semelhante à ocorrida na experiência 8 com dietas similares (que incluíam hidrolisados como única fonte de proteína solúvel) ou com dietas com maior quantidade total de hidrolisado. Ao contrário da experiência 9, verificou-se na experiência 10 uma influência do tipo de hidrolisado na performance larvar, sendo os melhores resultados obtidos com a dieta EKC100. Segundo os dados fornecidos pela Sigma, e de acordo com as análises por nós efectuadas (ver 2ª parte, capítulo 7, figura 7.4), o hidrolisado utilizado nesta dieta continha, comparativamente aos usados nas outras dietas, um teor bastante elevado de di- e tripéptidos e um teor reduzido de aminoácidos livres. Assim, estes resultados apoiam os obtidos por Zambonino-Infante *et al.* (1997), que mostram que a inclusão de di- e tripéptidos nas dietas tem um efeito positivo

no rendimento larvar. Além disso, os resultados confirmaram o efeito negativo da inclusão de níveis elevados de aminoácidos livres, tal como foi discutido no capítulo anterior.

Concluindo, os resultados descritos neste capítulo mostraram que a forma como a caseína foi fornecida afectou significativamente o rendimento larvar, evidenciando a deficiente utilização da caseína nativa pelas larvas sobretudo durante a primeira semana de alimentação. Ficou, assim, demonstrada a importância da solubilidade e da hidrólise da caseína, tendo-se obtido os melhores resultados com a dieta em que 25% da caseína era solúvel, da qual 25% era hidrolisada (45% de caseína nativa, 11,25% de caseinato de sódio e 3,75% de hidrolisado de caseína). Tal como no capítulo anterior, os resultados deste capítulo sugerem igualmente que as características dos hidrolisados, como é o caso do grau de hidrólise, terão influência na performance larvar.

2^a PARTE

CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO AZOTADA DO ALIMENTO

7. CARACTERIZAÇÃO DA FRACÇÃO AZOTADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS E DO ALIMENTO VIVO PARA LARVAS

7.1. INTRODUÇÃO

A identificação das formas sob as quais ocorre o azoto do alimento vivo, associada ao conhecimento do tipo de moléculas que as larvas terão capacidade de digerir e absorver, tem sido reconhecida como um passo fundamental no sentido da formulação de um alimento artificial adequado aos primeiros estados de desenvolvimento dos peixes (Dabrowski, 1984a; Hayashi *et al.*, 1985; Rønnestad *et al.*, 1999; Holt, 2000).

Apesar disso, apenas Hayashi *et al.* (1985) abordaram objectivamente esta questão, fornecendo dados preliminares sobre a partição do azoto de rotíferos e copépodes, e sugerindo um estudo mais aprofundado das fracções encontradas. No que diz respeito às dietas artificiais para larvas, não se tem efectuado a caracterização da fracção azotada, apesar do interesse crescente que tem suscitado a utilização de hidrolisados proteicos.

No presente capítulo caracteriza-se o perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais usadas nos ensaios zootécnicos descritos nos capítulos anteriores. A mesma caracterização é feita para o alimento vivo empregue na cultura larvar dos peixes, e para uma dieta de referência para larvas de ciprinídeos com a qual se têm registado resultados zootécnicos incontestavelmente melhores do que os obtidos com qualquer outra dieta artificial (Charlon e Bergot, 1984; Szlaminska *et al.*, 1990; Escaffre *et al.*, 1997). Utilizando toda a informação fornecida pelo conjunto dos ensaios realizados, procurou clarificar-se a relação entre o perfil de distribuição do azoto das dietas e os resultados zootécnicos, assim como a importância das diferentes fracções azotadas na expressão desses resultados.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

As fontes proteicas das dietas utilizadas nas experiências dos capítulos anteriores foram analisadas quanto ao seu teor em azoto total, azoto solúvel em tampão fosfato (pH 8,0) e azoto solúvel em água (pH 5,3), de acordo com os métodos descritos no capítulo 2 (pontos 2.5.4 e 2.5.6). No caso da experiência 1, apenas

foram analisadas as fontes proteicas de quatro das nove dietas. O mesmo tipo de determinação foi efectuado em náuplios de artémia recém-eclodidos (INVE, tipo AF), rotíferos alimentados com a alga *Nannochloropsis* sp., rotíferos sujeitos a um período de jejum de 24 horas (após terem sido alimentados com a mesma microalga) e fígado de bovino.

Para cada amostra, procedeu-se à determinação do perfil de distribuição dos pesos moleculares da porção azotada solúvel em tampão fosfato, por HPLC, como se descreve no capítulo 2 (ponto 2.5.7). Com base nos tempos de retenção dos padrões utilizados, o perfil de cada amostra foi dividido em quatro grupos, correspondentes às seguintes fracções solúveis: fracção S1, com tempo de retenção inferior a 10 min, que incluirá proteínas e polipéptidos de elevado peso molecular (2530–67000 Da); fracção S2, com tempo de retenção entre 10–12 min, que incluirá polipéptidos de peso molecular mais baixo (500–2530 Da); fracção S3, com tempo de retenção entre 12–13 min, que incluirá essencialmente di- e tripéptidos (200–500 Da); fracção S4, com tempo de retenção superior a 13 min, que incluirá principalmente aminoácidos livres (<200 Da).

Com base nestes resultados, nos teores de azoto total e solúvel e na proporção dietária das matérias primas, estabeleceu-se o perfil de distribuição do azoto de cada dieta experimental e da dieta de referência para ciprinídeos (dieta levedura/fígado). De acordo com esse perfil, o azoto foi distribuído em cinco fracções: I (insolúvel em tampão fosfato, pH 8,0), S1 (solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção <10 min), S2 (solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção 10-12 min), S3 (solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção 12-13 min) e S4 (solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção >13 min). O alimento vivo foi caracterizado de forma semelhante.

Para facilitar a comparação entre as dietas experimentais, a dieta de referência e o alimento vivo, procedeu-se a uma análise de componentes principais. Esta análise foi efectuada utilizando como variáveis activas as fracções azotadas acima mencionadas. A sobrevivência e o peso final dos peixes alimentados com cada dieta experimental foram incluídos na análise como variáveis suplementares, de modo a não interferir na determinação das componentes principais (construção dos eixos), garantindo assim uma observação objectiva da sua relação com as variáveis activas (Philippeau, 1986). As coordenadas das variáveis suplementares, nos planos definidos pelas componentes principais, foram as correlações parciais dessas

variáveis com cada uma das componentes principais. Essas correlações foram calculadas a partir da regressão:

$$y \text{ (variável suplementar)} = b_0 + b_1 \times 1cp + b_2 \times 2cp + b_3 \times 3cp + b_i \times exp_i$$

em que $1cp$, $2cp$ e $3cp$ são as componentes principais extraídas da matriz de dados (que incluiu apenas as variáveis activas) e i variou de 1 a $n-1$ experiências (exp) realizadas. As últimas parcelas ($b_i \times exp_i$) foram incluídas no modelo para anular o efeito do factor experiência sobre a expressão das variáveis suplementares. Assim, as correlações parciais das variáveis suplementares com os regressores $1cp$, $2cp$ e $3cp$ constituem uma boa estimativa da correlação linear entre estas variáveis, não afectadas pela variabilidade entre as diferentes experiências.

7.3. RESULTADOS

Nas tabelas 7.1 e 7.2 apresentam-se os teores em azoto total e azoto solúvel, respectivamente das matérias primas usadas como fontes proteicas das dietas e do alimento vivo.

Para a maioria das matérias primas, assim como para a artémia, o teor de azoto solúvel não foi substancialmente diferente a pH 8,0 ou pH 5,3. A caseína e o fígado de bovino constituíram as únicas excepções, apresentando valores de solubilidade do azoto muito mais baixos a pH 5,3 do que a pH 8,0. No caso do alimento vivo, o teor de azoto total na artémia foi mais elevado do que o encontrado nos rotíferos. Nestes, o teor de azoto total não variou após a permanência em jejum durante 24 horas, tendo-se contudo verificado um decréscimo no teor de azoto solúvel.

Nas figuras 7.1 a 7.7 apresentam-se os cromatogramas da fracção azotada solúvel a pH 8,0 das matérias primas e do alimento vivo.

Na farinha de peixe e no hidrolisado comercial de farinha de peixe (CPSP) o azoto solúvel distribuiu-se principalmente pelas fracções S2 e S3 (figura 7.1), enquanto que nos hidrolisados de farinha de peixe preparados no nosso laboratório se distribuiu de um modo mais repartido pelas quatro fracções (figura 7.2). Destes hidrolisados (P, PP e PT), todos eles produzidos a partir da mesma farinha de peixe, aquele que apresentou um grau de hidrólise superior foi o hidrolisado PP, o que é evidenciado pela proporção mais elevada da fracção S4.

TABELA 7.1. Azoto total (N total) e azoto solúvel (N solúvel) das fontes proteicas das dietas experimentais e de fígado de bovino utilizado em dietas de referência para ciprinídeos.

	N total (% ms)	N solúvel a pH 8,0 (% do N total)	N solúvel a pH 5,3 (% do N total)
Farinha de peixe	12,5	22,1	21,0
CPSP	12,1	72,4	73,2
Hidrolisado P	9,4	100	100
Hidrolisado PT	10,3	100	100
Hidrolisado PP	10,0	100	100
Caseína	15,3	64,8	0,3
Caseinato de sódio	15,0	73,8	88,2
N-Z Amine A*	15,7	100	100
N-Z Amine EKC*	15,7	100	100
N-Z Amine HD*	15,7	100	100
Levedura Protibel	8,5	18,5	13,0
Fígado de bovino	10,8	61,4	18,0

ms – matéria seca; *hidrolisado de caseína.

TABELA 7.2. Azoto total (N total) e azoto solúvel (N solúvel) de náuplios de artémia e rotíferos.

	N total (% ms)	N solúvel a pH 8,0 (% do N total)	N solúvel a pH 5,3 (% do N total)
Artémia	8,9	54,0	64,7
Rotíferos alimentados	6,8	60,8	nd
Rotíferos em jejum	6,5	46,5	nd

ms – matéria seca; nd - não determinado.

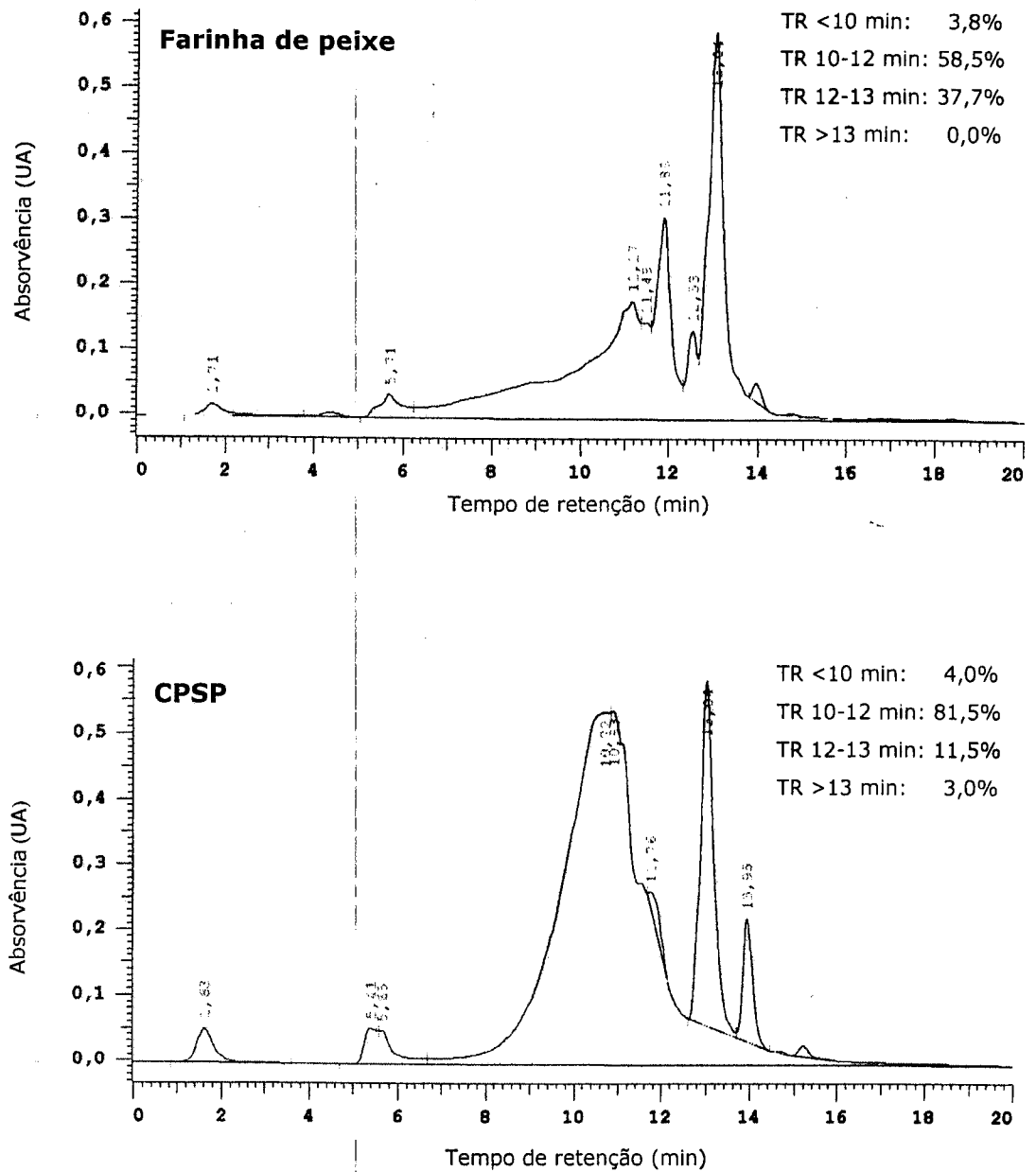


FIGURA 7.1. Cromatogramas da fracção solúvel da farinha de peixe e do CPSP (TR – tempo de retenção).

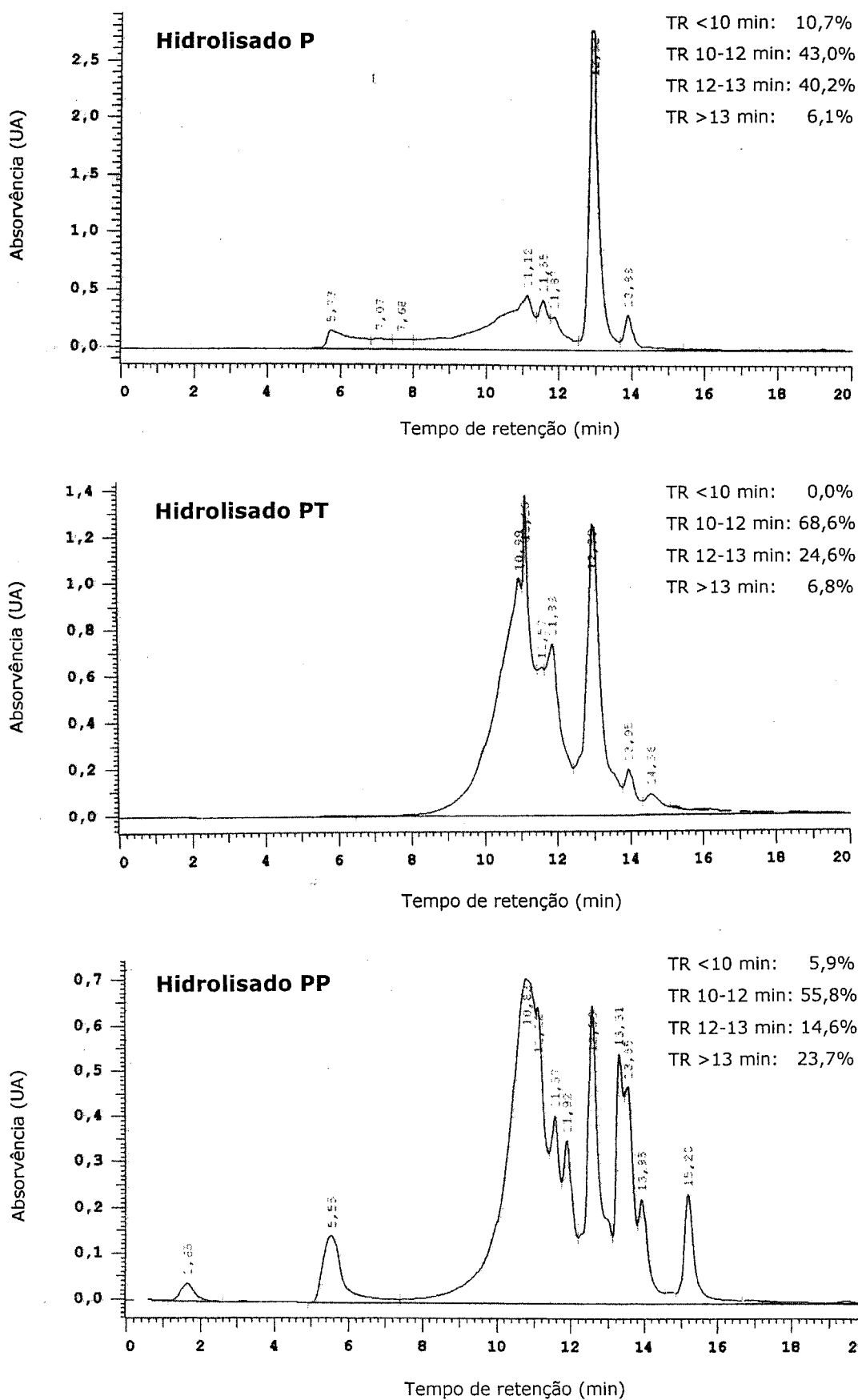


FIGURA 7.2. Cromatogramas dos hidrolisados P, PT e PP (TR - tempo de retenção).

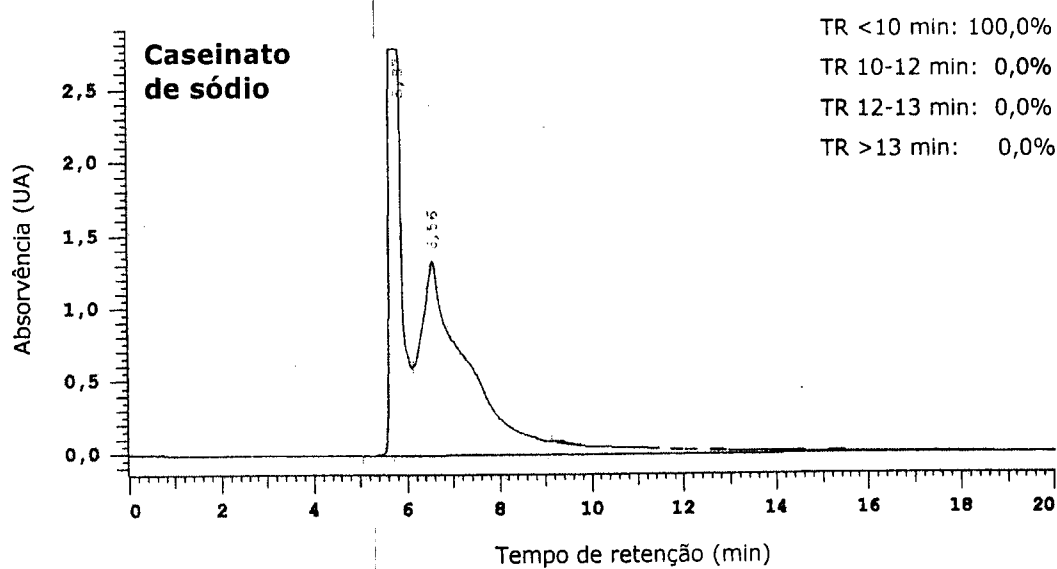
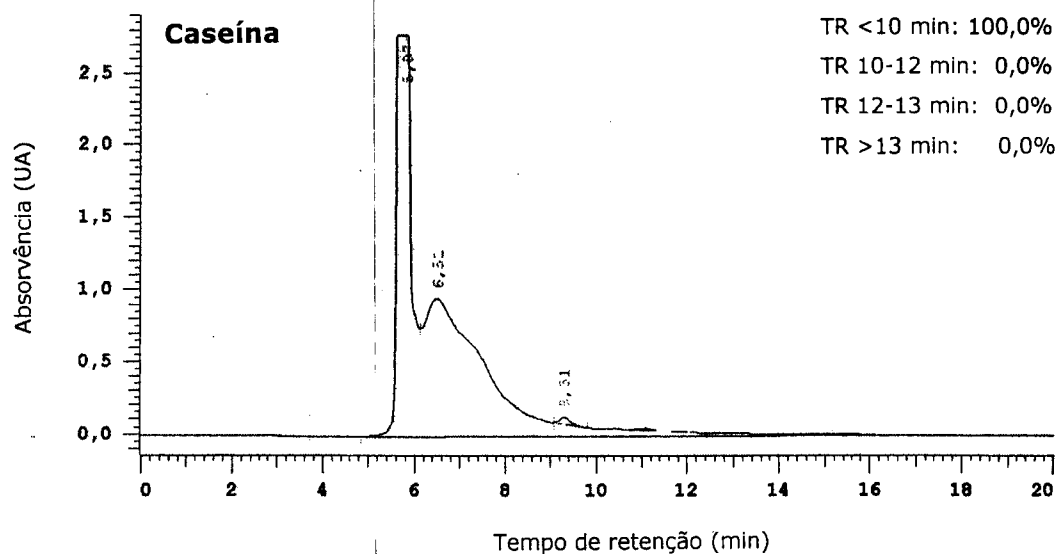


FIGURA 7.3. Cromatogramas da fracção solúvel da caseína e do caseinato de sódio (TR – tempo de retenção).

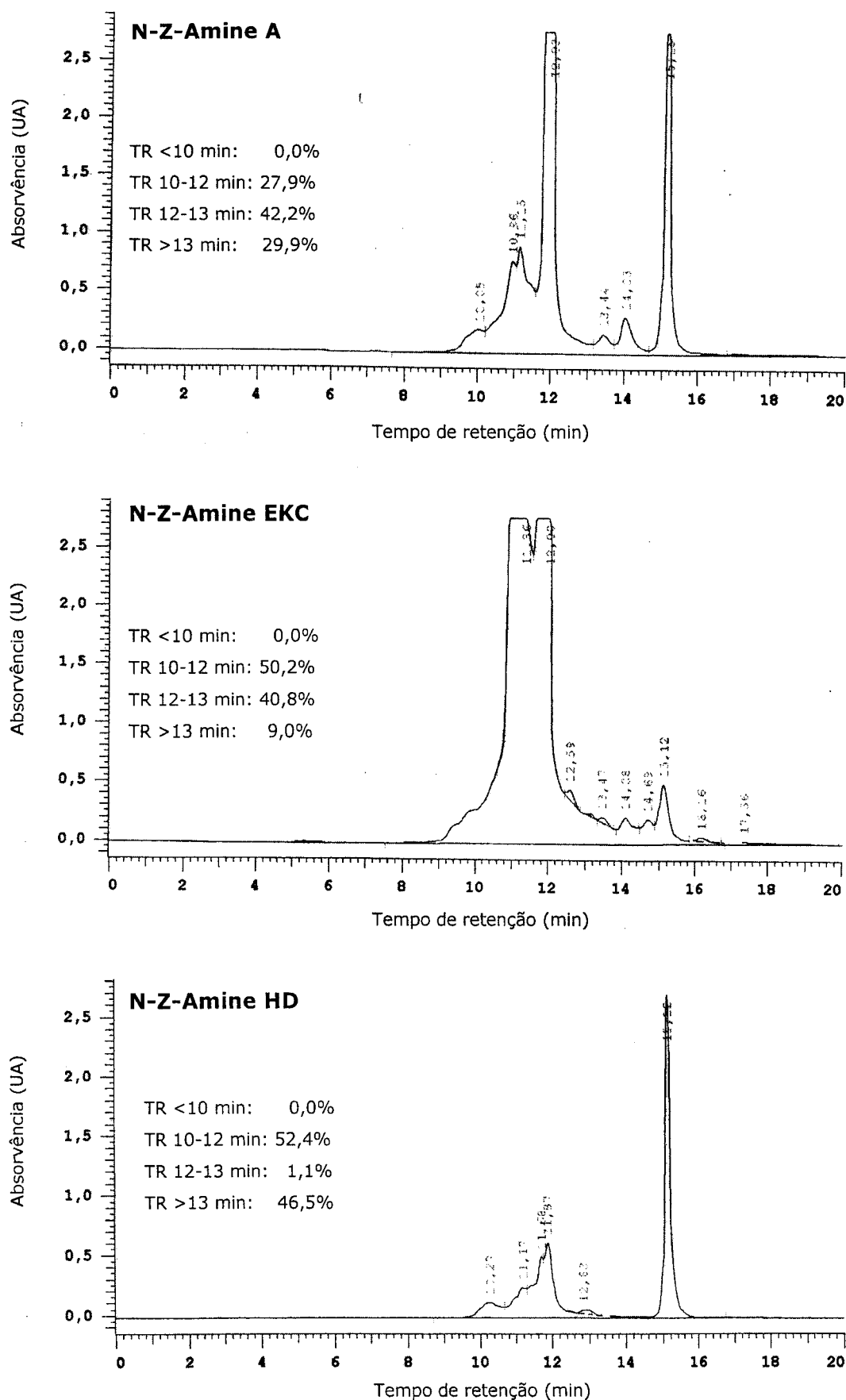


FIGURA 7.4. Cromatogramas dos hidrolisados de caseína (TR – tempo de retenção).

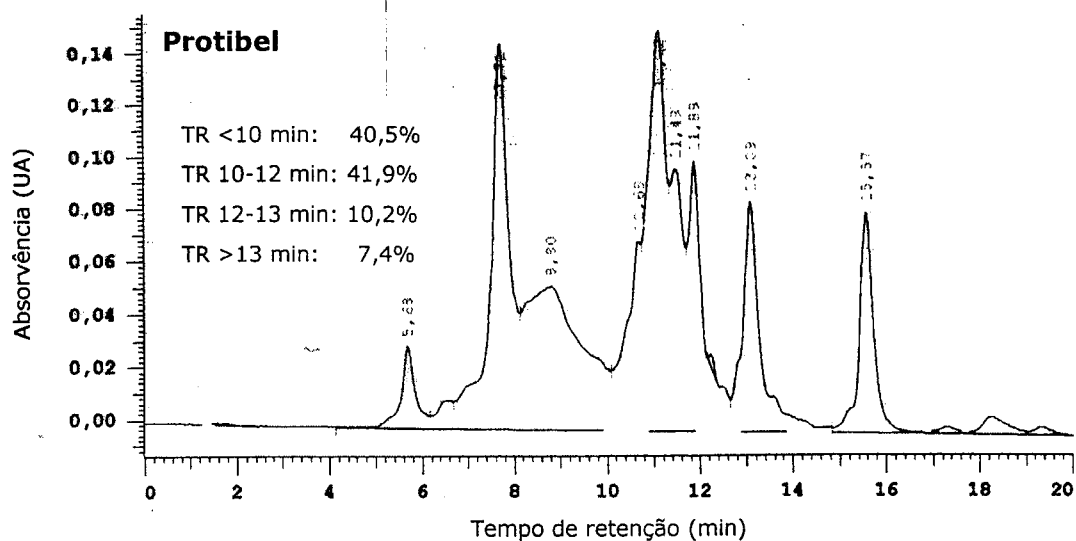


FIGURA 7.5. Cromatograma da fracção solúvel da levedura Protibel (TR – tempo de retenção).

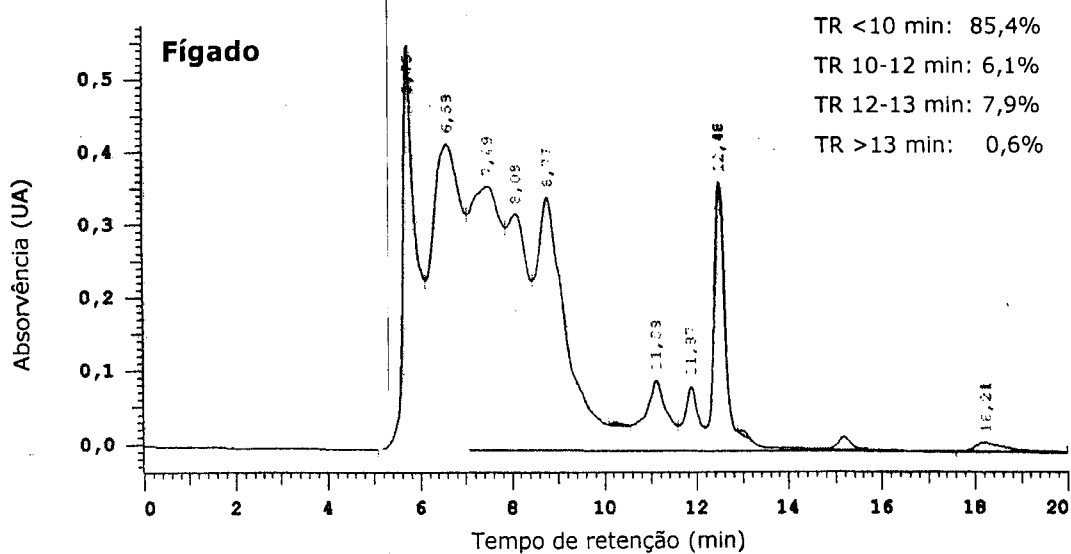


FIGURA 7.6. Cromatograma da fracção solúvel de fígado de bovino (TR – tempo de retenção).

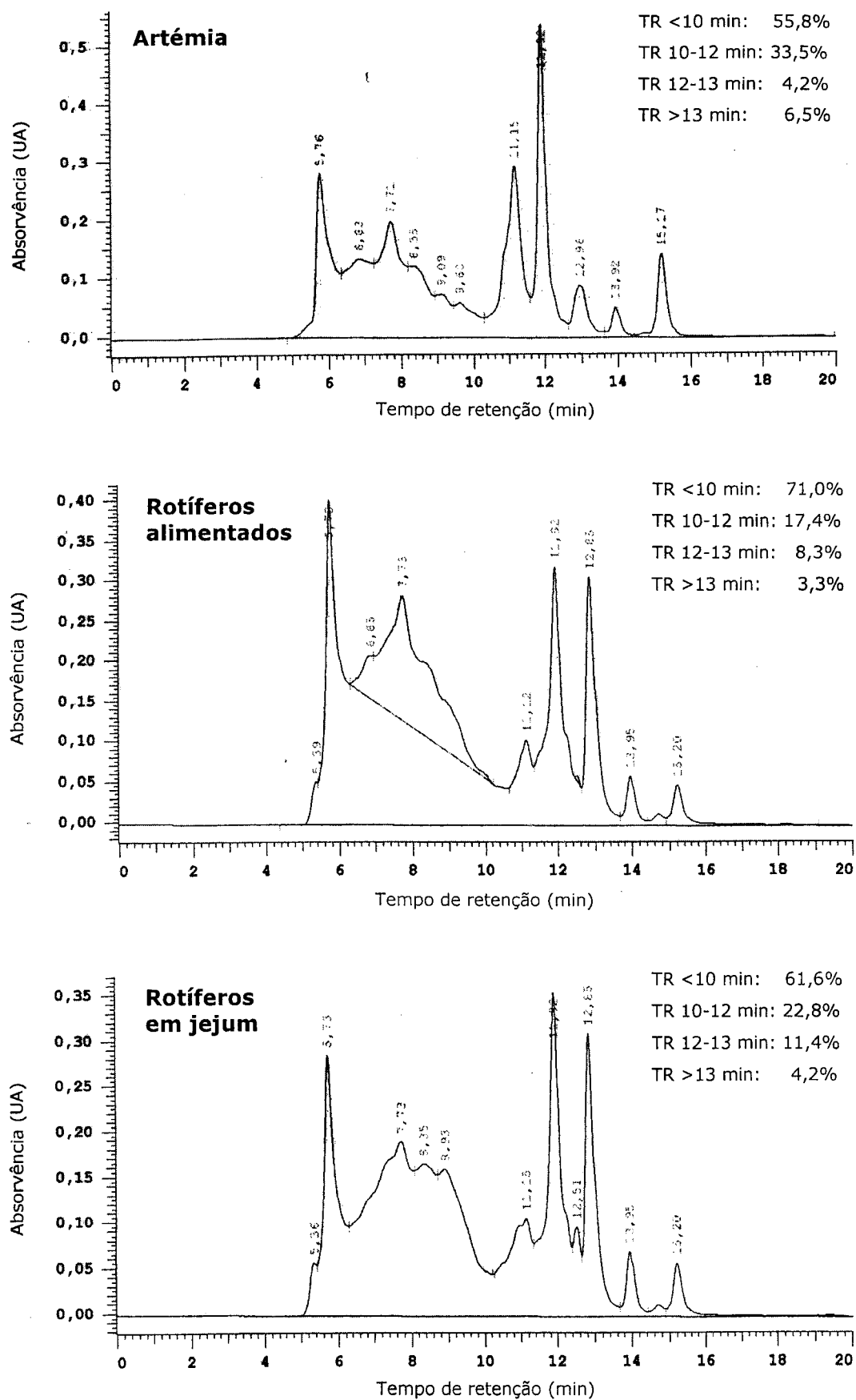


FIGURA 7.7. Cromatogramas da fracção solúvel de náuplios de artémia recém-eclodidos e rotíferos (TR - tempo de retenção).

A caseína e o caseinato de sódio apresentaram o mesmo perfil de distribuição de azoto (figura 7.3), como seria de esperar, com o azoto solúvel totalmente incluído na fracção S1. Pelo contrário, em qualquer dos hidrolisados de caseína a fracção S1 foi nula (figura 7.4). Estes hidrolisados distinguiram-se sobretudo ao nível da proporção da fracção S4, que foi bastante elevada no hidrolisado N-Z-Amine HD, medianamente elevada no N-Z-Amine A e baixa no N-Z-Amine EKC. Além disso, a proporção da fracção S3 foi semelhante e bastante elevada nos hidrolisados N-Z-Amine A e N-Z-Amine EKC, e muito reduzida no hidrolisado N-Z-Amine HD.

Na porção solúvel da levedura Protibel mais de 82% do azoto repartiu-se em partes idênticas pelas fracções S1 e S2, estando o restante incluído nas fracções S3 e S4 também em partes idênticas (figura 7.5). No fígado de bovino a fracção S1 contribuiu para cerca de 85% do azoto solúvel, estando a fracção S4 reduzida a 0,6% (figura 7.6).

Os cromatogramas da artémia e de ambos os tipos de rotíferos mostraram uma semelhança notável entre si, estando os principais picos cromatográficos presentes nos três registos (figura 7.7). Em qualquer dos casos, as fracções S1 e S2 corresponderam a 84-89% do azoto solúvel. O restante distribuiu-se em proporções mais ou menos idênticas nas fracções S3 e S4 na artémia, e cerca de 3/4 na fracção S3 e 1/4 na fracção S4 nos rotíferos.

Nas tabelas 7.3 e 7.4 apresentam-se os perfis de distribuição do azoto, respectivamente do alimento vivo e da dieta de referência para ciprinídeos e das dietas experimentais. Nas figuras 7.8A e 7.9A estão representadas as dietas artificiais e o alimento vivo nos planos definidos pelas 1ª e 2ª e pelas 1ª e 3ª componentes principais, respectivamente, e nas figuras 7.8B e 7.9B representa-se a organização das variáveis activas e suplementares nesses mesmos planos.

Para a análise de componentes principais entendeu-se apropriado englobar as fracções S1 e S2 numa única fracção (S1+S2), correspondente à soma das proporções das duas iniciais. A constituição de uma única fracção solúvel correspondente às proteínas, polipéptidos e oligopéptidos parece justificável, do ponto de vista nutricional, pelo facto de não existirem mecanismos específicos de transporte para qualquer dessas moléculas, como existem para os di-/tripéptidos e para os aminoácidos, e porque qualquer uma delas é convertível nas fracções directamente absorvíveis ao nível intestinal. Além disso, os motivos para esta decisão prenderam-se ainda com a elevada correlação ($r=-0,74$) existente entre

estas duas fracções (S1 e S2), o que tornaria redundante para a análise a sua inclusão separada.

O plano definido pelas 1ª e 2ª componentes principais explicam 91,8% da informação, constituindo o plano principal, pelo que o plano definido pelas 1ª e 3ª componentes principais apenas ajuda no esclarecimento de algumas relações não reveladas no plano formado pelas duas primeiras. Relativamente às variáveis suplementares, testaram-se os valores não transformados e os valores sujeitos a várias transformações, tendo-se optado pela representação correspondente àqueles que apresentavam a correlação mais significativa com as componentes principais. Assim, para a sobrevivência utilizaram-se os dados não transformados e para o peso os dados após transformação logarítmica, em ambos os casos apenas significativamente correlacionados com as 1ª e 2ª componentes principais.

TABELA 7.3. Distribuição do azoto (% do azoto total) na artémia, rotíferos (a: alimentados; j: em jejum) e na dieta de referência para ciprinídeos (dieta LF: levedura/fígado).

Dietas	IA	I	S1	S2	S3	S4
Artémia	35,3	46,0	30,1	18,1	2,3	3,5
Rotíferos a	-----	39,2	43,2	10,6	5,0	2,0
Rotíferos j	-----	53,5	28,6	10,6	5,3	2,0
LF	84,7	61,3	28,7	5,9	2,3	1,9

IA - fracção insolúvel em água (pH 5,3)

I - fracção insolúvel em tampão fosfato (pH 8,0)

S1 - fracção solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção <10 min

S2 - fracção solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção 10-12 min

S3 - fracção solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção 12-13 min

S4 - fracção solúvel a pH 8,0 com tempo de retenção >13 min

TABELA 7.4. Distribuição do azoto (% do azoto total) nas dietas experimentais (legenda na tabela 7.3).

	Dietas	IA	I	S1	S2	S3	S4
EXP. 1	Y	78,0	73,1	6,7	9,8	6,1	4,3
	FH	26,8	27,6	2,9	59,0	8,3	2,2
	C	67,5	31,8	37,5	26,0	3,7	1,0
	CH1	11,5	12,0	1,3	41,4	27,5	17,9
EXP. 2	HO ₍₁₎	87,0	81,5	7,5	7,8	1,9	1,4
	H30	64,2	61,1	5,7	27,2	4,3	1,7
	H50	51,6	49,8	4,8	37,9	5,7	1,8
	H70	40,7	40,1	4,0	47,1	6,8	2,0
	H100	26,8	27,6	2,9	59,0	8,3	2,2
EXP. 3	HO ₍₁₎	87,0	81,5	7,5	7,8	1,9	1,4
	H30	64,2	61,1	5,7	27,2	4,3	1,7
	H50	51,6	49,8	4,8	37,9	5,7	1,8
	H70	40,7	40,1	4,0	47,1	6,8	2,0
EXP. 4	HO ₍₂₎	79,0	77,9	0,8	12,9	8,3	0,0
	HP25	59,2	58,4	3,3	20,5	16,3	1,5
	HP50	39,6	39,0	5,8	27,9	24,2	3,0
	HP75	19,8	19,5	8,2	35,5	32,2	4,6
	HPP50	39,5	38,9	3,4	34,4	11,5	11,9
EXP. 5	HO ₍₂₎	79,0	77,9	0,8	12,9	8,3	0,0
	HP10	71,1	70,1	1,8	15,9	11,5	0,6
	HPP10	71,1	70,1	1,4	17,2	9,0	2,4
	HP30	55,3	54,6	3,8	21,9	17,9	1,8
	HPP30	55,3	54,5	2,4	25,8	10,2	7,1
EXP. 6	HO ₍₂₎	79,0	77,9	0,8	12,9	8,3	0,0
	HP30	55,3	54,6	3,8	21,9	17,9	1,8
	HPT30	56,0	55,2	0,6	29,1	13,1	2,0
EXP. 7	HO ₍₂₎	79,0	77,9	0,8	12,9	8,3	0,0
	HP30	55,3	54,6	3,8	21,9	17,9	1,8
	HPT30	56,0	55,2	0,6	29,1	13,1	2,0
	HPP30	55,3	54,5	2,4	25,8	10,2	7,1
EXP. 8	S0	99,7	35,2	64,8	0,0	0,0	0,0
	S25	78,0	33,0	67,0	0,0	0,0	0,0
	S25H25	77,1	31,3	62,3	1,8	2,7	1,9
	S25H50	76,1	29,6	57,6	3,6	5,4	3,8
	S25H100	74,3	26,2	48,3	7,1	10,8	7,6
	S50	56,1	30,7	69,3	0,0	0,0	0,0
	S50H50	52,6	24,0	50,4	7,1	10,8	7,7
	S50H100	49,2	17,4	32,0	14,1	21,4	15,2
	S75	34,0	28,5	71,5	0,0	0,0	0,0
	S75H50	29,2	18,4	43,3	10,7	16,2	11,5
	S75H100	24,4	8,6	15,9	21,1	31,9	22,6
	S100	11,8	26,2	73,8	0,0	0,0	0,0
EXP. 9	A25	77,1	31,3	62,3	1,8	2,7	1,9
	EKC25	77,1	31,3	62,3	3,2	2,6	0,6
	HD25	77,1	31,3	62,3	3,4	0,1	3,0
EXP. 10	A100	74,3	26,2	48,3	7,1	10,8	7,6
	EKC100	74,3	26,2	48,3	12,8	10,4	2,3
	HD100	74,3	26,2	48,3	13,4	0,3	11,9

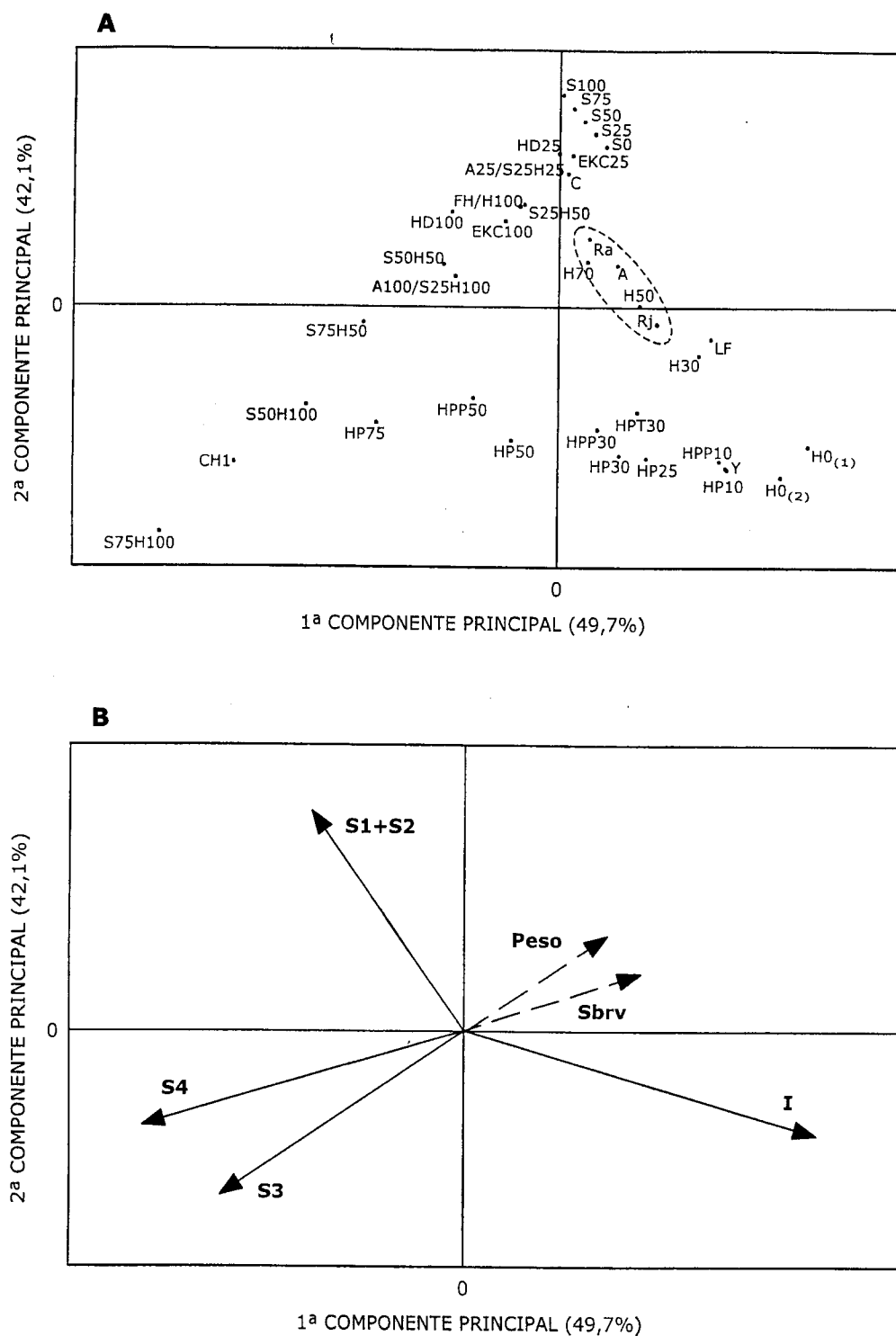


FIGURA 7.8. Representação das dietas e das variáveis no plano definido pelas 1ª e 2ª componentes principais (A – artémia, Ra – rotíferos alimentados, Rj – rotíferos em jejum, LF – dieta levedura/fígado, Sbrv – sobrevivência). As variáveis suplementares estão representadas a tracejado. Entre parêntesis indica-se a informação explicada por cada componente principal.

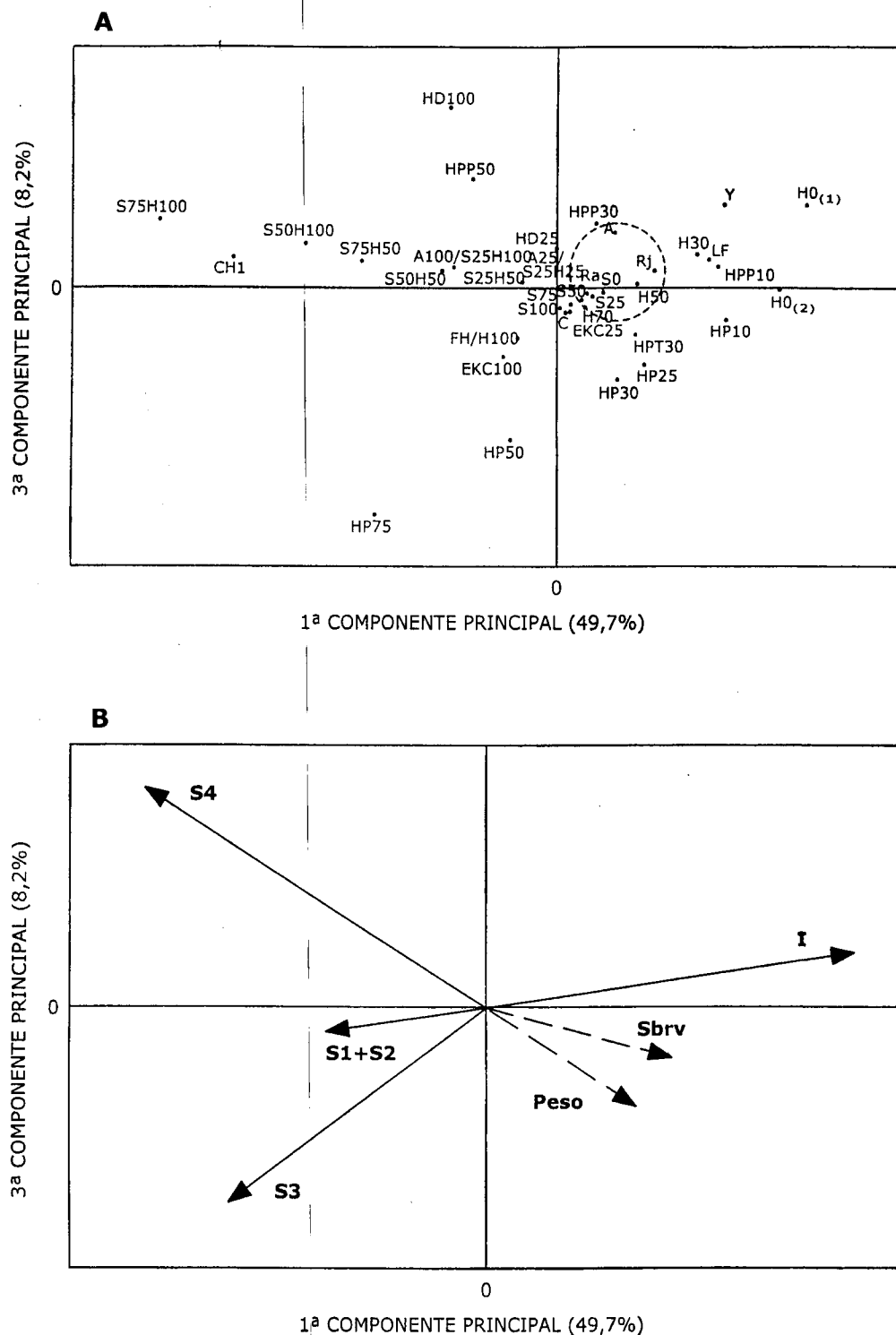


FIGURA 7.9. Representação das dietas e das variáveis no plano definido pelas 1ª e 3ª componentes principais (A – artémia, Ra – rotíferos alimentados, Rj – rotíferos em jejum, LF – dieta levedura/fígado, Sbrv – sobrevivência). As variáveis suplementares estão representadas a tracejado. Entre parêntesis indica-se a informação explicada por cada componente principal.

O alimento vivo, relativamente à maioria das dietas experimentais, apresenta teores intermédios das fracções I e S1+S2, e baixos teores das fracções S3 e S4 (tabelas 7.3 e 7.4, figuras 7.8A e 7.9A). A dieta de referência (dieta LF) possui uma composição semelhante à do alimento vivo (tabelas 7.3 e 7.4), o que é evidenciado pela sua proximidade em relação àquele, em ambos os planos definidos pelas componentes principais (figuras 7.8A e 7.9A). Entre as dietas experimentais, aquelas cuja composição mais se assemelhou à do alimento vivo foram as que melhor crescimento larvar proporcionaram no conjunto dos ensaios efectuados com a carpa (caso das dietas H70, H50, S25H25, S25H50, EKC25 e C). Além disso, de um modo geral, em cada experiência, quanto mais dissemelhante era a composição da dieta experimental e do alimento vivo, pior foi o resultado zootécnico obtido com essa dieta. Verifica-se ainda, que as dietas que de uma forma geral conduziram aos piores resultados se caracterizavam principalmente, em relação ao alimento vivo, por teores muito elevados das fracções S3 e/ou S4. O caso mais extremo foi o da dieta S75H100 (experiência 8), com a qual todas as larvas morreram ao fim de uma semana.

A relação entre as variáveis activas e as variáveis suplementares (figura 7.8B e 7.9B) reforça a ideia da importância fundamental que as fracções S3 e S4 terão na performance zootécnica. Na figura 7.8B os dois parâmetros zootécnicos estão representados na mesma direcção mas em sentidos opostos das fracções S3 e S4, o que significa que teores mais elevados destas fracções estiveram associados a piores resultados zootécnicos. A figura 7.9B mostra que esta associação foi mais forte com a fracção S4 do que com a S3. Em relação às variáveis suplementares, é ainda de realçar o facto da sua representação no plano principal indicar o alimento vivo como proporcionando a melhor performance zootécnica, apesar deste não ter contribuído para a determinação das coordenadas dessas variáveis (uma vez que não foram atribuídos valores de crescimento e sobrevivência correspondentes à artémia, aos rotíferos e à dieta de referência).

7.4. DISCUSSÃO

O processo digestivo nas larvas dos peixes caracteriza-se pela ausência da função gástrica nos primeiros estados do desenvolvimento (Govoni *et al.*, 1986). Durante esse período o alimento é digerido apenas ao nível intestinal, antes de ser absorvido. O pH do meio intestinal das larvas dos peixes é de cerca de 8, como foi demonstrado por medição directa (Walford e Lam, 1993; Reitan *et al.*, 1998), o que

está de acordo com os estudos sobre a actividade das enzimas aí secretadas. Por essa razão, procedeu-se, no presente trabalho, à determinação da solubilidade do azoto do alimento e à caracterização da fracção solúvel a pH 8. Deste modo é possível conhecer a forma sob a qual a proteína dietária se torna disponível para digestão enzimática ao nível intestinal, assim como a fracção que poderá ser directamente absorvida.

A diferença entre os resultados obtidos na experiência 8 (capítulo 6) com a dieta contendo apenas a caseína nativa e as dietas em que esta foi parcialmente substituída por caseinato de sódio, e o facto destas duas fontes proteicas diferirem praticamente só ao nível da solubilidade em água (a caseína nativa quase completamente insolúvel e o caseinato quase completamente solúvel), poderiam indiciar um efeito deste factor. Por essa razão, todas as dietas e o alimento vivo foram também caracterizados quanto à solubilidade em água. Além disso, a solubilidade em água poderá também dar indicação do potencial de lixiviação do azoto das dietas durante o período em que as partículas alimentares permanecem em contacto com a água antes de serem ingeridas pelas larvas, o que poderia ter utilidade na interpretação de alguns resultados.

Do nosso conhecimento, não existem dados disponíveis relativos à porção solúvel das farinhas de peixe com os quais possamos comparar os nossos resultados. No entanto, uma comparação aproximada pode ser efectuada com os dados de Stone e Hardy (1986) e Stone *et al.* (1989), referentes a análises realizadas em amostras homogeneizadas de peixe fresco. De acordo com esses autores, cerca de 10% do azoto será solúvel em ácido tricloroacético. Porém, esta determinação exclui os péptidos de maior tamanho e proteínas, que precipitam por acção desse ácido, enquanto que os valores por nós determinados (21-22%) incluirão essas moléculas, o que poderá ajudar a explicar as diferenças observadas. Por outro lado, com base nos trabalhos dos referidos autores, os aminoácidos livres contribuiriam para cerca de 2-3% do azoto total, enquanto o valor determinado para a fracção S4 no presente estudo foi nulo.

Para o CPSP (hidrolisado comercial de farinha de peixe) os teores de azoto total e azoto solúvel são semelhantes aos referidos pelo produtor (SOPROPÊCHE, França) e confirmados por Bouchez e Azzi (1991). No que diz respeito à fracção solúvel, o CPSP é caracterizado como um produto que contém um conjunto equilibrado de péptidos de elevado peso molecular e um baixo teor de aminoácidos livres (SOPROPÊCHE, França). De acordo com as análises por nós efectuadas, essa

fracção será essencialmente formada por poli- e oligopéptidos (85,5%), com os di-/tripéptidos e os aminoácidos a contribuírem respectivamente para cerca de 11,5% e 3,0% do azoto solúvel.

Relativamente aos hidrolisados produzidos no nosso laboratório, o teor em aminoácidos livres muito mais elevado do hidrolisado PP deve-se ao facto deste ter sido obtido através da digestão da farinha de peixe pela pancreatina. A pancreatina inclui exopeptidases, que actuam sobre as ligações dos aminoácidos terminais dos péptidos, levando a uma maior produção de aminoácidos livres, enquanto que a pepsina e a tripsina (utilizadas para a obtenção dos outros hidrolisados) são endopeptidases, actuando apenas no interior da cadeia peptídica.

Segundo Lorient (1982), a caseína é praticamente insolúvel a pH entre cerca de 4 e 5, e completamente solúvel a pH acima de 6, e o caseinato de sódio é completamente solúvel em água. No presente trabalho confirmou-se a quase total insolubilidade da caseína a pH 5,3. Contudo, nem para a caseína a pH 8 nem para o caseinato de sódio a ambos os valores de pH estudados, se obteve uma solubilidade total, tendo esta variado entre cerca de 65 e 88%. Em ambos os produtos verificou-se uma tendência para formarem agregados quando em contacto com as soluções aquosas, o que poderá ter contribuído para uma maior dificuldade de solubilização.

Nos hidrolisados de caseína, os perfis de distribuição do azoto solúvel por nós obtidos foram diferentes dos referidos pelo produtor (SIGMA), que refere valores muito superiores de aminoácidos livres. Apesar disso, as proporções de aminoácidos livres entre os hidrolisados foram praticamente as mesmas, quer considerando os valores obtidos neste trabalho (para a fracção S4) ou os fornecidos pela SIGMA. Na realidade, a caracterização feita pela SIGMA refere-se apenas a péptidos até 1000 Da, excluindo péptidos de peso molecular mais elevado, o que deverá explicar a aparente subavaliação da fracção S4 por nós efectuada. Uma caracterização semelhante, limitada aos péptidos abaixo de um determinado peso molecular, foi efectuada por Boza *et al.* (1994), que para o efeito procederam a uma ultrafiltração prévia do material solúvel de modo a excluir os péptidos de tamanho superior ao pretendido.

Em relação aos perfis de distribuição do azoto solúvel da levedura Protibel e do fígado de bovino não existem, uma vez mais, quaisquer referências que permitam algum tipo de comparação. Dados do produtor da levedura Protibel estabelecem em

50% da matéria seca o teor da proteína bruta (Pector *et al.*, 1993), o que equivale a 8,0% de azoto total, valor similar ao obtido neste trabalho. No caso do fígado de bovino, o aspecto que nos parece mais relevante é a diferença de solubilidade do azoto consoante o pH a que esta foi determinada. De acordo com Bernier *et al.* (1988), as vísceras comercializadas dos animais, caso do fígado de bovino, são ricas em proteínas do tecido conjuntivo como o colagénio e a elastina. Segundo os autores estas proteínas são insolúveis ou muito dificilmente solúveis em água, o que deverá explicar a baixa solubilidade do azoto do fígado a pH 5,3 em comparação com a solubilidade a pH 8.

O teor de azoto total determinado para o alimento vivo está dentro da gama de valores encontrados na literatura, os quais apresentam uma grande variação: 5,5-11,6% da matéria seca para rotíferos alimentados com microalgas (Watanabe *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1985; Gatesoupe, 1986a; Dendrinis e Thorpe, 1987; Frolov *et al.*, 1991; Frolov e Pankov, 1992; Makridis e Olsen, 1999) e 6,0-11,4% da matéria seca para náuplios recém-eclodidos de artémia (Grabner *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1983; Gatesoupe, 1986a; Pan *et al.*, 1991; García-Ortega *et al.*, 1998).

Relativamente ao conteúdo em azoto solúvel do alimento vivo poucas referências estão disponíveis. No caso de náuplios de artémia, Grabner *et al.* (1981) estimaram em 58,9% do azoto total aquele que seria solúvel em água, valor que é semelhante ao encontrado no presente trabalho. Para os rotíferos, Hayashi *et al.* (1985) calcularam que mais de 70% do azoto total seria solúvel a pH 7,5 (em tampão fosfato), percentagem que é substancialmente mais elevada do que aquela por nós determinada a pH 8,0. Por outro lado, Hjelmeland *et al.* (1993) estimaram o azoto solúvel a pH 7,3 em apenas 30% do azoto total dos rotíferos.

No que diz respeito aos rotíferos, o teor de azoto solúvel nos rotíferos alimentados foi consideravelmente mais elevado do que nos mantidos em jejum, apesar do teor de azoto total ser similar nas duas situações. Parece provável que a presença das microalgas no tubo digestivo, eventualmente ricas em formas proteicas solúveis e/ou em fase de digestão, possa ter contribuído para este resultado. Frolov e Pankov (1992) registaram um importante decréscimo na proporção de aminoácidos livres de rotíferos logo após 8 h de jejum, muito antes de haver alterações notáveis ao nível do teor proteico (estas só detectadas ao fim de 48 h de jejum), atribuindo-o à mobilização dos aminoácidos livres como primeira fonte energética em caso de falta de alimento. Contudo, deverá ser tido em conta que no referido trabalho os

rotíferos não sujeitos a jejum foram mantidos, previamente à sua recolha para análise, num meio sem alimento para evacuação das algas presentes no tubo digestivo. Dabrowski e Rusiecki (1983) apontaram também uma redução do teor de aminoácidos livres de náuplios de artémia, mas só após um jejum de 94 h. No presente trabalho, o decréscimo do teor de azoto solúvel dos rotíferos em jejum não foi acompanhado por uma redução apreciável da fracção correspondente aos aminoácidos livres (tabela 7.3, fracção S4). Neste caso o decréscimo reflectiu-se praticamente apenas na fracção S1, o que poderá estar directamente relacionado com a ausência de microalgas no tubo digestivo. O facto dos cromatogramas da porção solúvel dos rotíferos alimentados e dos rotíferos em jejum diferirem fundamentalmente apenas quanto à proporção da fracção S1 (figura 7.7), que foi consideravelmente mais elevada nos rotíferos alimentados, parece apoiar esta hipótese.

A grande semelhança entre os cromatogramas da fracção solúvel dos rotíferos e da artémia revela que estes dois organismos são muito idênticos quanto às formas sob as quais o azoto que os constitui se tornará disponível para as larvas, ao nível intestinal.

Hayashi *et al.* (1985) tinham já chamado a atenção para a necessidade de um estudo aprofundado da fracção azotada solúvel das presas para as larvas dos peixes, sugerindo que as diferentes formas de azoto fossem incluídas nas dietas artificiais nas mesmas proporções em que ocorrem no alimento vivo.

Os aminoácidos livres do alimento vivo têm sido alvo de alguma atenção, pelo facto de alguns autores os considerarem a principal fonte energética das larvas dos peixes marinhos após o esgotamento das reservas endógenas (Fyhn, 1989, 1993; Rønnestad, 1992; Rønnestad *et al.*, 1998, 1999). Segundo vários autores os aminoácidos livres de rotíferos e artémia representariam 1,7 a 4,0% da matéria seca (Gatesoupe, 1986a; Pan *et al.*, 1991; Frolov e Pankov, 1992). Os valores obtidos neste trabalho, tendo como base a fracção S4 dos cromatogramas, foram mais baixos do que os encontrados por aqueles autores, estimando-se em 0,8-0,9% para os rotíferos e 2,0% para a artémia. Apesar disso, Gatesoupe (1986a) refere igualmente para os rotíferos valores equivalentes a menos de metade dos calculados para a artémia.

Relativamente às restantes formas sob as quais ocorre o azoto no alimento vivo não existiam dados disponíveis até ao momento, segundo o nosso conhecimento.

No entanto, há algum tempo que vinha sendo reconhecida uma potencial importância nutricional relacionada com a capacidade das larvas dos peixes absorverem di- e tripéptidos (Plakas e Katayama, 1981; Govoni *et al.*, 1986), facto que foi recentemente confirmado (Zambonino Infante *et al.*, 1997). Além disso, foi também demonstrada a capacidade das larvas absorverem macromoléculas proteicas intactas ao nível da parte posterior do intestino (revisão de Govoni *et al.*, 1986; Escaffre *et al.*, 1989), embora se desconheçam as implicações nutricionais directas desse fenómeno. Por outro lado, conjuntamente com o tipo de moléculas que poderão ser absorvidas ao nível intestinal sem hidrólise prévia, será útil conhecer o tipo de moléculas presente no alimento vivo que servirá de substracto às proteases larvares.

Como foi anteriormente referido, as dietas experimentais que proporcionaram os melhores resultados zootécnicos foram as que tinham uma composição mais semelhante à do alimento vivo, constatando-se ainda que as fracções S3 e S4 pareciam ser as de maior importância na expressão desses resultados.

De uma maneira geral, nas diversas experiências, verifica-se que todas as dietas em que a proporção da fracção S4 (principalmente constituída por aminoácidos livres) foi igual ou superior a cerca de 7% do azoto total conduziram a maus resultados zootécnicos, comparativamente com as dietas que continham um menor teor dessa fracção. Nas experiências 5 e 7, por exemplo, a dieta HPP30 proporcionou resultados significativamente piores do que as dietas HP30 e HPT30, distinguindo-se destas sobretudo por um teor em S4 mais elevado, e superior a 7% do azoto total (tabela 7.4). Na experiência 8 verificou-se que a fracção S4 apenas foi vantajosa quando presente nas dietas numa baixa proporção (dietas S25H25 e S25H50 *versus* dieta S25), a partir da qual os resultados foram tanto piores quanto maior a proporção de S4 (figuras 7.8 e 7.9). Cahu e Zambonino Infante (1995a) observaram efeitos negativos na sobrevivência larvar do robalo quando 10% da fonte proteica foi substituída por uma mistura de aminoácidos livres, o que está de acordo com os valores encontrados para a fracção S4 a partir do qual os resultados pioram.

Segundo Plakas e Katayama (1981) o efeito negativo de níveis dietários elevados de aminoácidos livres será devido à saturação dos mecanismos de transporte envolvidos na absorção dos aminoácidos e a processos de competição pelos transportadores, em consequência de um excesso de aminoácidos se encontrar simultaneamente disponível para absorção. Por outro lado, Hardy (1991) atribuiu

esse efeito negativo à absorção prematura de alguns aminoácidos essenciais presentes na forma livre, relativamente a outros incorporados nos péptidos ou em proteínas intactas, argumentando que o crescimento seria mais eficiente quando todos os aminoácidos essenciais estivessem simultaneamente disponíveis nos tecidos na proporção correcta. Segundo o autor, a absorção prematura de aminoácidos essenciais poderá estar relacionada com a proporção de péptidos e aminoácidos livres na dieta.

Tal como para a fracção S4, também em relação à S3 (principalmente constituída por di- e tripéptidos) parece haver um nível de incorporação na dieta que não será conveniente ultrapassar. De facto, dietas com teor muito elevado da fracção S3, como foi o caso das dietas HP50 (com 24,2%) e HP75 (com 32,2%), conduziram a resultados zootécnicos inferiores aos obtidos com a dieta HP25 (com 16,3%), apesar do teor da fracção S4 ser semelhante em todas elas e bastante abaixo do limite dos 7% (1,5-4,6%). Zambonino Infante *et al.* (1997) registaram uma melhor performance com larvas de robalo com uma dieta em que 15% do azoto total foi fornecido sob a forma de di- e tripéptidos, mas verificaram igualmente uma redução da performance quando o nível aumentou para 30%, o que confirma a existência de um limite para a incorporação dietária destas moléculas.

Nos humanos, uma grande parte da absorção directa dos di- e tripéptidos é também mediada por mecanismos de transporte, independentes dos existentes para os aminoácidos (revisão de Bernier *et al.*, 1988). Assim, um excesso de di- e tripéptidos poder-se-á revelar igualmente prejudicial, quer devido à saturação de eventuais mecanismos de transporte dessas moléculas ou, de forma indirecta, ao facto delas serem rapidamente digeridas em aminoácidos livres, e ser o excesso destes a comprometer a performance larvar.

Os resultados zootécnicos obtidos na experiência 10 parecem ainda indicar a necessidade de um equilíbrio adequado das fracções S3 e S4, sobretudo quando a proporção desta última é já elevada. Esta hipótese parece justificável, tendo em vista a possibilidade de uma rápida produção de aminoácidos livres a partir dos di- e tripéptidos ao nível intestinal.

Relativamente à restante fracção solúvel (fracção S1+S2) não é possível retirar ilações tão claras como em relação às fracções S3 e S4. Esta fracção funcionará como a principal fonte de azoto solúvel, disponível para ser hidrolisada nas fracções directamente absorvíveis (S3 e S4), estando por isso mais correlacionada com a

fracção insolúvel (figuras 7.8B e 7.9B). De todas as fracções, será aquela que menos estará directamente associada aos resultados zootécnicos, dada a muito baixa relação com a sobrevivência e o peso (figuras 7.8B). Em todo o caso, não será totalmente de excluir a possibilidade de alguma relevância directa desta fracção, considerando a capacidade das larvas para absorver macromoléculas proteicas ao nível intestinal, como foi atrás referido.

A fracção I apresenta já uma maior relação com os parâmetros zootécnicos (figura 7.8B e 7.9B). Uma dieta com elevado teor da fracção I deverá ser mais dificilmente digerível pelas proteases larvares, ao contrário de uma dieta com uma porção insolúvel menor. As dietas usadas nas experiências 2 e 3 variaram principalmente quanto à fracção I (e também quanto à S1+S2), sendo os melhores resultados obtidos quando o teor dessa fracção foi cerca de metade do azoto total, à semelhança do que acontece com a artémia.

A solubilidade do azoto em água (pH 5,3) não foi incluída na análise de componentes principais, por ser na maior parte dos casos muito idêntica à solubilidade a pH 8. Porém, na experiência 8, a solubilidade do azoto em água variou bastante entre as dietas, em virtude da substituição da caseína nativa (praticamente insolúvel em água) pelo caseinato de sódio (solúvel em água) em níveis variáveis. Comparando a performance larvar obtida com as dietas S0, S25, S50, S75 e S100, que variavam apenas quanto à insolubilidade do azoto em água, os melhores resultados registaram-se para um teor de azoto insolúvel entre 56-77% (dietas S25 e S50). O aspecto mais relevante foi a fraca sobrevivência larvar observada com a dieta S0 (em que quase 100% do azoto era insolúvel), comparativamente à obtida com as outras dietas, e o facto da má utilização dessa dieta se verificar sobretudo durante a primeira semana de alimentação. Este resultado demonstra claramente a vantagem de algum do azoto da dieta ser fornecido sob a forma solúvel em água. Parece admissível que, após a ingestão das partículas alimentares, seja necessária a solubilização em água de algum do azoto dietário ao nível do intestino anterior, para garantir uma apropriada subsequente digestão. Este facto seria particularmente relevante nas fases iniciais da passagem para a alimentação exógena, quando é mais importante a estimulação das enzimas digestivas por acção do próprio alimento.

Atendendo ao conjunto dos trabalhos em que foram utilizados hidrolisados proteicos em dietas para larvas de peixe, os resultados zootécnicos obtidos nem sempre têm sido concordantes. De facto, se em alguns casos a incorporação de

hidrolisados em níveis moderados nas dietas conduziu a melhores performances larvares (Cahu e Zambonino Infante, 1995a; Zambonino Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; experiência 2 do presente trabalho), outros houve em que tal não resultou em qualquer vantagem ou produziu mesmo efeitos negativos (Kolkovski e Tandler, 2000; experiências 5 e 7 do presente trabalho). Resultados aparentemente contraditórios são também referidos a propósito do efeito do nível de incorporação dos hidrolisados na dieta. Day *et al.* (1997) registaram uma correlação positiva entre o rendimento larvar e o nível dietário do hidrolisado, obtendo o melhor resultado quando este constituiu a única fonte proteica da dieta. Pelo contrário, outros trabalhos sugerem a existência de um nível óptimo de inclusão dos hidrolisados na dieta (Zambonino Infante *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; experiências 2, 3 e 8 do presente trabalho), sendo evidenciado um efeito fortemente negativo quando eles são usados como única fonte proteica (Szlaminska *et al.*, 1993; Kolkovski e Tandler, 2000; experiências 1 e 2 do presente trabalho). O conjunto dos resultados agora apresentados mostra que o efeito dos hidrolisados dependerá não apenas do seu nível de inclusão na dieta como também das características desses hidrolisados, o que ajudará a explicar as aparentes contradições encontradas.

Como conclusão, os resultados do presente capítulo evidenciaram a semelhança entre o perfil de distribuição do azoto dos dois organismos usados como alimento vivo para as larvas dos peixes (artémia e rotíferos), e permitiram constatar que, de um modo geral, quanto mais idênticos eram os perfis das dietas artificiais e do alimento vivo, melhor foram os resultados zootécnicos obtidos com essas dietas. Destaca-se também a importância fundamental que as fracções S3 e S4 parecem ter na determinação da qualidade das dietas. Verificou-se a vantagem da inclusão destas fracções em baixos teores nas dietas, mas igualmente a desvantagem da incorporação de teores elevados. De acordo com a gama de valores por nós utilizada, o limite a partir do qual o teor destas fracções se tornará prejudicial estaria situado entre cerca de 11-18% do azoto total para a fracção S3 e cerca de 7% do azoto total para a fracção S4, consideradas isoladamente. Relativamente às restantes fracções, os resultados indicam ainda que o teor de azoto solúvel a pH 8 (que é o pH existente no intestino das larvas) e o teor de azoto solúvel em água deverão ser igualmente tidos em consideração para a formulação de uma dieta larvar adequada.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho procuramos contribuir de algum modo para o esclarecimento do efeito da forma da proteína dietária no rendimento zootécnico das larvas de peixes. De forma sintetizada, apresentam-se as conclusões que entendemos poder retirar com base nos resultados obtidos.

1. **A forma como a proteína da dieta foi fornecida teve uma influência evidente no rendimento zootécnico das larvas.** Esta conclusão aplica-se às duas espécies estudadas, carpa e robalo. O facto de ambas as espécies apresentarem respostas similares com o mesmo tipo de dietas sugere a possibilidade de extrapolação dos presentes resultados a outras espécies produzidas em aquacultura.
2. **O principal factor que influenciou o rendimento zootécnico larvar foi o equilíbrio entre as diferentes fracções azotadas da dieta:** proteína insolúvel, polipéptidos, di/tripéptidos e aminoácidos livres. Misturas de fontes proteicas hidrolisadas e não hidrolisadas conduziram geralmente a melhores resultados do que cada uma delas utilizada isoladamente, na medida em que proporcionaram um maior equilíbrio entre as diferentes fracções azotadas.
3. **Sempre que os hidrolisados proteicos são incorporados nas dietas, tanto o nível de incorporação como o tipo de hidrolisado deverão ser tomados em consideração.** Em pós-larvas de robalo alimentadas com dietas contendo níveis elevados de farinha de peixe hidrolisada pela pepsina (50 ou 75% do azoto da dieta) o crescimento foi significativamente pior do que com níveis de hidrolisado mais baixos (0 ou 25% do azoto da dieta). Além disso, para o mesmo nível de incorporação de farinha de peixe hidrolisada (50% do azoto da dieta) o crescimento foi significativamente melhor quando a farinha de peixe foi hidrolisada pela pepsina do que pela pepsina/pancreatina. Resultados similares foram obtidos em larvas de robalo e de carpa, quando 30% do azoto dietário foi fornecido por esses mesmos hidrolisados.
4. **Com dietas purificadas formuladas à base de caseína, tanto a solubilidade como a hidrólise tiveram um efeito muito evidente na sobrevivência e no crescimento larvares.** A caseína nativa (insolúvel em água) foi ineficazmente utilizada pelas larvas de carpa, em particular durante a

primeira semana de alimentação exógena, conduzindo a uma fraca performance zootécnica. Pelo contrário, foram obtidos bons resultados quando 25% da caseína da dieta foi fornecida sob a forma solúvel, 25% da qual era hidrolisada. Além disso, verificou-se que o tipo de hidrolisado de caseína utilizado poderia igualmente influenciar a performance larvar, sendo realçada a importância do grau de hidrólise da proteína.

5. **Os organismos usados de forma generalizada como alimento vivo para as larvas dos peixes – o rotífero *Brachionus plicatilis* e o crustáceo *Artemia* – apresentam um perfil de distribuição de azoto muito semelhante.** De acordo com o perfil determinado, cerca de 50-60% do azoto total será solúvel a pH 8 (o pH do intestino das larvas), do qual 84-89% será constituído por proteínas, poli- e oligopéptidos, 4-11% por di- e tripéptidos e 3-6% por aminoácidos livres.
6. **De um modo geral, quanto mais semelhantes foram os perfis de distribuição do azoto das dietas experimentais e do alimento vivo, melhores foram os resultados zootécnicos obtidos com essas dietas.** Tendo em consideração o perfil de distribuição do azoto das dietas experimentais, a fracção correspondente aos di-/tripéptidos e, principalmente, a fracção constituída pelos aminoácidos livres parecem ter sido aquelas que maior expressão tiveram nos resultados zootécnicos obtidos. A inclusão destas fracções nas dietas será vantajosa quando em níveis relativamente baixos, mas revelar-se-á prejudicial em níveis mais elevados. De acordo com a gama de concentrações existente no conjunto das dietas utilizadas, o limite a partir do qual estas fracções tiveram um efeito negativo evidente foi cerca de 15% do azoto total para a fracção constituída por di-/tripéptidos e cerca de 7% do azoto total para a fracção constituída pelos aminoácidos livres.
7. **Para além das questões relacionadas com a fisiologia digestiva das larvas, o presente trabalho poderá contribuir para a formulação de dietas artificiais mais adequadas.** Essa formulação deverá utilizar o perfil de distribuição do azoto do alimento vivo como referência, tendo em consideração um equilíbrio apropriado entre as fracções azotadas da dieta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoe, H., Ikeda, K., Saito, T., 1974. Nutrition of protein in young carp – II. Nutritive value of protein hydrolyzates. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 40: 375-379.
- Appelbaum, S., 1985. Rearing of the Dover sole, *Solea solea* (L.), through its larval stages using artificial diets. *Aquaculture*, 49: 209-221.
- Appelbaum, S., Adron, J.W., George, S.G., Mackie, A.M., Pirie, B.J.S., 1983. On the development of the olfactory and the gustatory organs of the Dover sole, *Solea solea*, during metamorphosis. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 63: 97-108.
- Araba, M. & Dale, N.M., 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poultry Science*, 69: 76-83.
- Barahona-Fernandes, M.H., 1978. L'élevage intensif des larves et des juvéniles du bar (*Dicentrarchus labrax* (L.)): données biologiques, zootechniques et pathologiques. *Thèse, Université d'Aix-Marseille II*, 208 pp.
- Barahona-Fernandes, M.H. & Girin, M., 1976. Preliminary tests on the optimal pellet-adaptation age for sea bass larvae (Pisces, *Dicentrarchus labrax* L. 1758). *Aquaculture*, 8: 283-290.
- Barahona-Fernandes, M.H., Girin, M., Métailler, R., 1977. Expériences de conditionnement d'alevins de bar (Pisces, *Dicentrarchus labrax*) à différents aliments composés. *Aquaculture*, 10: 53-63.
- Barnabé, G., 1976. Élevage larvaire du loup (*Dicentrarchus labrax* (L.)); Pisces, Serranidae) à l'aide de l'aliment sec composé. *Aquaculture*, 9: 237-252.
- Barnabé, G., 1989. L'élevage du loup et de la daurade. In *Aquaculture* (Coord. G. Barnabé), Vol. II, p. 676-720. Technique et Documentation, Lavoisier – Paris.
- Barnabé, G. & René, F., 1972. Reproduction contrôlée du loup *Dicentrarchus labrax* (Linné) et production en masse d'alevins. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 275D: 2741-2744.
- Baragi, V. & Lovell, R.T., 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115: 478-484.
- Baskerville-Bridges, B. & Kling, L.J., 2000. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture*, 189: 109-117.
- Beccaria, C., Diaz, J.P., Connes, R., Chatain, B., 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture*, 99: 339-354.
- Berge, G.M. & Storebakken, T., 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145: 205-212.
- Bergot, P., 1986. Élevage larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): alimentation artificielle. In *Aquaculture of Cyprinids* (Ed. R. Billard & J. Marcel), p. 227-234. INRA, Paris.
- Bernier, J.J., Adrian, J., Vidon, N., 1988. *Les aliments dans le tube digestif*. Doin Éditeurs, Paris.
- Blaxter, J.H.S., 1969. Development: eggs and larvae. In *Fish Physiology* (Ed. W.S Hoar & D.J. Randall), Vol. III, p. 177-252. Academic Press, London.
- Bouchez, P. & Azzi, D., 1991. Biotechnology: use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. In *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste* (Ed. C.B. Cowey & C.Y. Cho), p. 91-101. University of Guelph, Ontario.

- Boulhic, M. & Gabaudan, J., 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*, 102: 373-396.
- Boza, J.J., Jiménez, J., Martínez, O., Suárez, M.D., Gil, A., 1994. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and Guinea pigs. *J. Nutr.*, 124: 1978-1986.
- Bromley, P.J. & Howell, B.R., 1983. Factors influencing the survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L., during the change from live to compound feeds. *Aquaculture*, 31: 31-40.
- Bryant, P.L. & Matty, A.J., 1981. Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) larvae to artificial diets. 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. *Aquaculture*, 23: 275-286.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 213-222.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L., 1995a. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 209-214.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L., 1995b. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 431-437.
- Cahu, C.L. & Zambonino Infante, J.L., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.*, 5: 151-160.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J., Escaffre, A.M., Bergot, P., Kaushik, S., 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 169: 1-7.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171: 109-119.
- Calzada, A., Medina, A., González de Canales, M.L., 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J. Fish Biol.*, 53: 340-365.
- Cañavate, J.P. & Fernández-Díaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*, 174: 255-263.
- Cavalier, F., 1989. Alimentation artificielle des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) en conditions expérimentales. Aspects zootéchniques et morphologiques. *Thèse, Université des Sciences et Techniques du Languedoc*, 168 pp.
- Charlon, N., 1990. Technologie: automatisation de l'élevage larvaire en eau douce. *Aqua Revue*, 33, 6 pp.
- Charlon, N. & Bergot, P., 1984. Rearing system for feeding fish larvae on dry diets. Trial with carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 41: 1-9.
- Charlon, N. & Bergot, P., 1986. An improved automatic dry food dispenser for fish larvae. *Prog. Fish-Cult.*, 48: 156-158.

- Charlon, N., Durante, H., Escaffre, A.M., Bergot, P., 1986. Alimentation artificielle des larves de carpe (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 54: 83-88.
- Chatain, B., 1987. La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. II. Influence des anomalies de développement sur la croissance de la larve. *Aquaculture*, 65: 175-181.
- Chatain, B. & Dewavrin, G., 1989. Influence des anomalies de développement sur la mortalité de la larve de *Dicentrarchus labrax* au cours du sevrage. *Aquaculture*, 78: 55-61.
- Clark, J., Murray, K.R., Stark, J.R., 1986. Protease development in Dover sole (*Solea solea* (L.)). *Aquaculture*, 53: 253-262.
- Conceição, L.E.C., 1997. Growth in early life stages of fishes: an explanatory model. *Thesis, University of Wageningen*, 209 pp.
- Cousin, J.C.B. & Baudin Laurencin, F., 1985. Morphogenèse de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture*, 47: 305-319.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgeloos, P., 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*, 155: 149-164.
- Coves, D., Dewavrin, G., Breuil, G., Devauchelle, N., 1991. Culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In *CRC Handbook of Mariculture* (Ed. J.P.McVey), Vol. II, p. 3-20. CRC Press, Inc., Florida.
- Cunha, I., 1996. Comportamiento trófico y fisiología energética de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) en condiciones de cultivo. *Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela*, 283 pp.
- Dabrowska, H., Grudniewski, C., Dabrowski, K., 1979. Artificial diets for common carp: effect of the addition of enzyme extracts. *Prog. Fish-Cult.*, 41: 196-200.
- Dabrowski, K., 1984a. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 24: 807-833.
- Dabrowski, K., 1984b. Influence of initial weight during the change from live to compound feed on the survival and growth of four cyprinids. *Aquaculture*, 40: 27-40.
- Dabrowski, K., 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A: 639-655.
- Dabrowski, K. & Glogowski, P., 1977. The role of exogenic proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia*, 54: 129-134.
- Dabrowski, K. & Poczyczyński, P., 1988. Comparative experiments on starter diets for grass carp and common carp. *Aquaculture*, 69: 317-332.
- Dabrowski, K. & Rusiecki, M., 1983. Content of total and free amino acids in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture*, 30: 31-42.
- Dabrowski, K., Dabrowska, H., Grudniewski, C., 1978. A study of the feeding of common carp larvae with artificial food. *Aquaculture*, 13: 257-264.
- Day, O., Jones, D.A., Howell, B.R., 1993. Trypsin activity in Dover sole (*Solea solea*) larvae after ingesting *Artemia* nauplii, a microencapsulated diet, microalgae and polystyrene beads. *EAS Special Publication* nº 19: 345.

- Day, O.J., Howell, B.R., Jones, D.A., 1997. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquaculture Research*, 28: 911-921.
- Dendrinós, P. & Thorpe, J.P., 1987. Experiments on the artificial regulation of the amino acid and fatty acid contents of food organisms to meet the assessed nutritional requirements of larval, post-larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture*, 61: 121-154.
- Dendrinós, P., Dewan, S., Thorpe, J.P., 1984. Improvement in the feeding efficiency of larval, post larval and juvenile Dover sole (*Solea solea* L.) by the use of staining to improve the visibility of *Artemia* used as food. *Aquaculture*, 38: 137-144.
- Dhert, P., González-Félix, M., Van Ryckeghem, K., Geurden, I., Thysen, F., Lebegue, E., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1999. Cofeeding of phospholipids to turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae as a tool to reduce live food consumption. *Aquaculture Nutrition*, 5: 237-245.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 161: 169-186.
- Díaz, M., Moyano, F.J., García-Carreño, F.L., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.*, 5: 461-471.
- EIFAC, 1971. Salmon and trout feeds and feeding. *EIFAC Technical Paper*, 12, 29 pp.
- Escaffre, A.M., Bergot, P., Szlaminska, M., 1989. Site of absorption of protein macromolecules in the intestine of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) fry. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 36: 263-271.
- Escaffre, A.M., Zambonino Infante J.L., Cahu, C.L., Mambrini, M., Bergot, P., Kaushik, S.J., 1997. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 153: 63-80.
- Espe, M., & Lied, E., 1994. Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis? *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A: 249-254.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., Veiga, M., 1984. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
- Fernández-Díaz, C. & Yúfera, M., 1995. Capacity of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae to break down dietary microcapsules. *Aquaculture*, 134: 269-278.
- Fiogbe, E. & Kestemont, P., 1993. Protein and amino acid requirements in goldfish larvae (*Carassius auratus*). *Proceedings EIFAC Workshop on Methodology for Determination of Nutrient Requirements in Fish*, p.14.
- Fontagné, S., Pruszyński, T., Corraze, G., Bergot, P., 1999. Effect of coconut oil and tricaprilyn vs. triolein on survival, growth and fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 179: 241-251.

- Frolov, A.V. & Pankov, S.L., 1992. The effect of starvation on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 72: 343-356.
- Frolov, A.V., Pankov, S.L., Geradz, K.N., Pankova, S.A., Spektorova, L.V., 1991. Influence of the biochemical composition of food on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 97: 181-202.
- Fyhn, H.J., 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy. *Aquaculture*, 80: 111-120.
- Fyhn, H.J., 1993. Multiple functions of free amino acids during embryogenesis in marine fishes. In *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (Ed. B.T. Walter & H.J. Fyhn), p. 299-308. University of Bergen, Bergen.
- Fyhn, H.J., Finn, R.N., Helland, S., 1993. Nutritional value of phyto- and zooplankton as live food for marine fish larvae. In *Fish Farming Technology* (Ed. H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen, K. Tvinnereim), p. 121-126. Balkema, Rotterdam.
- García-Ortega, A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, H., Huisman, E.A., Sorgeloos, P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture*, 161: 501-514.
- García-Ortega, A., Verreth, J.A.J., Van Hoornick, A., Segner, H., 2000. Heat treatment affects protein quality and protease activity in decapsulated cysts of *Artemia* when used as starter food for larvae of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Nutrition*, 6: 25-31.
- Gatesoupe, F.J., 1986a. The effect of starvation and feeding on the free amino acid composition of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*. *Océanis*, 12: 207-222.
- Gatesoupe, F.J., 1986b. Évolution des teneurs en acides aminés libres dans les larves de bar et de turbot. *Ichthyophysiologica Acta*, 10: 253-265.
- Gatesoupe, F.J. & Luquet, P., 1981. Weaning of the sole (*Solea solea*) before metamorphosis. *Aquaculture*, 26: 259-368.
- Gatesoupe, F.J., Girin, M., Luquet, P., 1977. Recherche d'une alimentation artificielle adaptée à l'élevage des stades larvaires des poissons. II. Application à l'élevage larvaire du bar et de la sole. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.*, 4: 59-66.
- Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., Bergot, P., 1999. Ontogenèse, développement et physiologie digestive chez les larves de poissons. In *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés* (Ed. J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot, R. Métailler), Cap. III (12): 249-264. INRA-IFREMER, França.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J., Bergot, P., 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 131: 303-314.
- Geurden, I., Charlon, N., Marion, D., Bergot, P., 1997. Influence of purified soybean phospholipids on early development of common carp. *Aquacult. Int.*, 5: 137-149.
- Girin, M., 1979. Feeding problems and the technology of rearing marine fish larvae. In *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Ed. J.E. Halver & K. Tiews), Vol. I, p. 547-554. Heenemann, Berlin.

- Girin, M., Barahona-Fernandes, M.H., Le Roux, A., 1975. Larval rearing of sea bass (*Dicentrarchus labrax* (L.)) with a high survival. *Int. Counc. Explor. Sea, Doc. Comm. Meet. 1975/G:14*, 8 pp.
- Girin, M., Métailler, R., Nedelec, J., 1977. Accoutumance de jeunes soles (*Solea solea*) à différents aliments inertes après achèvement de la métamorphose. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.*, 4: 35-50.
- Gouillou-Coustans, M.F., Bergot, P., Kaushik, S.J., 1998. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 161: 453-461.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16: 59-77.
- Grabner, M., Wieser, W., Lackner, R., 1981. The suitability of frozen and freeze-dried zooplankton as food for fish larvae: a biochemical test program. *Aquaculture*, 26: 85-94.
- Hardy, R.W., 1991. Fish hydrolysates: production and use in aquaculture feeds. In *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop* (Ed. D.M. Akiyama & R.K.H. Tan), p. 109-115. American Soybean Association.
- Hayashi, T., Suitani, Y., Murakami, M., Yamaguchi, K., Konosu, S., 1985. Nitrogen distribution in marine zooplankton as diets for fish larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51: 1047.
- Hjelmeland, K., Ugelstad, I., Olsen, Y., 1993. Proteolytic activity and *post mortem* autolysis in prey for marine fish larvae. In *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (Ed. B.T. Walter & H.J. Fyhn), p. 229-232. University of Bergen, Bergen.
- Holt, G.J., 2000. Symposium on recent advances in larval fish nutrition. *Aquaculture Nutrition*, 6: 141.
- Izquierdo, M.S., 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 2: 183-191.
- Kanazawa, A., Teshima, S.I., Inamori, S., Matsubara, H., 1983. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 32: 109-114.
- Kanazawa, A., Koshio, S.A., Teshima, S.I., 1989. Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. *J. World Aquac. Soc.*, 20: 31-37.
- Kaushik, S.J. & Dabrowski, K., 1983. Nitrogen and energy utilization in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) fed casein, amino acids or a protein-free diet. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 23: 741-754.
- Kentouri, M., Divanach, P., Paris, J., 1984. Approche du comportement trophique des larves du sar (*Diplodus sargus*), de la daurade (*Sparus auratus*), du charax (*Puntazzo puntazzo*) et du marbré (*Lithognathus mormyrus*). In *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés* (Ed. G. Barnabé & R. Billard), p. 139-159. INRA, Paris.
- Kolkovski, S. & Tandler, A., 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6: 11-15.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm., 1993a. The effect of dietary enzymes with age on protein and lipid assimilation and deposition in *Sparus aurata* larvae. In

- Fish Nutrition in Practice* (Ed. Kaushik, S.J. & Luquet, P.), p. 569-578. INRA, Paris (Les colloques n°61).
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Gertler, A., 1993b. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 203-209.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A., 1997a. Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Aquacult. Int.*, 5: 527-536.
- Kolkovski, S., Koven, W., Tandler, A., 1997b. The mode of action of artemia in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 155: 193-205.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo, M.S., 1997c. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 148: 313-322.
- Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D., Dabrowski, K., 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched *Artemia* nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6: 199-206.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melenotictus*) larvae. *Aquaculture*, 161: 491-499.
- Lauff, M. & Hofer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.
- López-Alvarado, J. & Kanazawa, A., 1994. Effect of dietary arginine levels on growth of red sea bream larvae fed diets supplemented with crystalline amino acids. *Fisheries Science*, 60: 435-439.
- Lorient, D., 1982. Les propriétés fonctionnelles des protéines animales. In *Protéines Animales. Extraits, Concentrés et Isolats en Alimentation Humaine* (Coord. C.M. Bourgeois & P. Le Roux), p. 8-36. Technique et Documentation, Lavoisier - Paris.
- Luquet, P., 1971. Efficacité des protéines en relation avec leur taux d'incorporation dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel. *Ann. Hydrobiol.*, 2: 175-186.
- Mackie, A.M. & Mitchell, A.I., 1985. Identification of gustatory feeding stimulants for fish-applications in aquaculture. In *Nutrition and Feeding in Fish* (Ed. C.B. Cowey, A.M. Mackie, J.G. Bell), p. 177-189. Academic Press, London.
- Makridis, P. & Olsen, Y., 1999. Protein depletion of the rotifer *Brachionus plicatilis* during starvation. *Aquaculture*, 174: 343-353.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Gómez, M.G.U., Nelis, H., De Leenheer, A., Sorgeloos, P., 1996. Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. *J. Fish Biol.*, 49: 573-583.
- Métailler, R. & Alliot, E., 1978. Alimentation larvaire des poissons marins à l'aide de proies inertes. *Océanis*, 4: 405-421.
- Métailler, R., Manant, C., Depierre, C., 1979. Microparticules alimentaires inertes destinées à l'élevage larvaire des poissons marins. Utilisations des alginates. In

- Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Ed. J.E. Halver & K. Tiews), Vol. II, p. 181-190. Heenemann, Berlin.
- Métailler, R., Menu, B., Morinière, P., 1981. Weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*) using artificial diets. *J. World Maricul. Soc.*, 12: 111-116.
- Métailler, R., Cadena-Roa, M., Person-Le Ruyet, J., 1983. Attractive chemical substances for the weaning of Dover sole (*Solea vulgaris*): qualitative and quantitative approach. *J. World Maricul. Soc.*, 14: 679-684.
- Meyers, S.P., 1979. Formulation of water-stable diets for larval fishes. In *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Ed. J.E. Halver & K. Tiews), Vol. II, p. 13-20. Heenemann, Berlin.
- Mousseau, L., 1988. Mise au point de régimes semi-synthétiques pour l'élevage larvaire des Cyprinidés. Essai sur le Carassin (*Carassius auratus* L.). *DESS, Université de Caen*, 27 pp.
- Moyano, F.J. & Sarasquete, M.C., 1993. A screening on some digestive enzyme activities of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *EAS Special Publication* nº 19: 416.
- Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.
- Munilla-Moran, R. & Stark, J.R., 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 81: 315-327.
- Munilla-Moran, R., Stark, J.R., Barbour, A., 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 88: 337-350.
- New, M., 1991. Turn of the millennium aquaculture. Navigating troubled waters or riding the crest of the wave? *World Aquaculture*, 22: 28-49.
- Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L., Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 179: 195-201.
- Pan, B.S., Lan, C.C., Hung, T.Y., 1991. Changes in composition and proteolytic enzyme activities of *Artemia* during early development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 725-730.
- Pector, R., Caers, G., Blommaert, V., De Schrijver, R., Ollevier, F., 1993. The use of Protibel as a substitute for casein in artificial diets for larvae and juveniles of the African catfish, *Clarias gariepinus*. In *Fish Nutrition in Practice* (Ed. Kaushik, S.J. & Luquet, P.), p. 613-618. INRA, Paris (Les colloques nº61).
- Pedini, M., 2000. Bridging the gap. Can aquaculture meet the additional demand for fishery products? *FAO Aquaculture Newsletter*, 24: 4-9.
- Peres, H. & Oliva-Teles, A., 1999. Influence of temperature on protein utilization in juvenile european seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170: 337-348.
- Péres, A., Cahu, C., Zambonino Infante, J., Le Gall, M., Quazuguel, P., 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the development stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 237-242.

- Pérez, L., Gonzalez, M., Jover, M., Fernández-Carmona, J., 1997. Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate. *Aquaculture*, 156: 183-193.
- Person-Le Ruyet, J. & Bergot, P., 1999. Aliments inertes pour larves de poissons. In *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés* (Ed. J. Guillaume, S. Kaushik, P. Bergot, R. Métailler), Cap. III (14): 285-296. INRA-IFREMER, França.
- Person-Le Ruyet, J., Menu, B., Cadena-Roa, M., Métailler, R., 1983. Use of expanded pellets supplemented with attractive chemical substances for the weaning of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. World Aquac. Soc.*, 14: 676-678.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Le Ven, L., 1989. Early weaning of sea bass larvae using a commercial microparticle. *EAS Special Publication* nº 10: 205-206.
- Person-Le Ruyet, J., Alexandre, J.C., Thébaud, L., Mugnier, C., 1993a. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey? *J. World Aquac. Soc.*, 24: 211-224.
- Person-Le Ruyet, J., Fischer, C., Thébaud, L., 1993b. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) weaning and on-growing onto Sevbar. In *Fish Nutrition in Practice* (Ed. Kaushik, S.J. & Luquet, P.), p. 623-628. INRA, Paris (Les colloques nº61).
- Philippeau, G., 1986. Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales? STAT-ITCF, France.
- Plakas, S.M. & Katayama, T., 1981. Apparent digestibilities of amino acids from three regions of the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio*) after ingestion of a protein and a corresponding free amino acid diet. *Aquaculture*, 24: 309-314.
- Radünz-Neto, J., 1993. Détermination des besoins nutritionnels en acides gras essentiels chez les larves de carpe (*Cyprinus carpio* L.). Thèse, Université Bordeaux I, 122 pp.
- Radünz-Neto, J., Charlon, N., Escaffre, A.M., Corraze, G., Bergot, P., 1993. Effet de l'huile de foie de morue sur la survie et la croissance des larves de cyprinidés (*Carassius auratus* L., *Cyprinus carpio* L.). In *Fish Nutrition in Practice* (Ed. Kaushik, S.J. & Luquet, P.), p. 541-550. INRA, Paris (Les colloques nº61).
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N., Bergot, P., 1994. Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 128:153-161.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Bergot, P., Kaushik, S.J., 1996. Estimation of essential fatty acid requirements of common carp larvae using semi-purified artificial diets. *Arch. Anim. Nutr.*, 49: 41-48.
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155: 105-118.
- Reitan, K.I., Hoehne, K., Kjørsvik, E., 1998. Gut pH in developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. In *Recent Advances in Finfish & Crustacean Nutrition*, Programme & Abstracts VIII International Symposium on Nutrition and Feeding of Fish, p. 230.

- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171: 293-308.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino Infante, Cahu, C., Dinis, M.T., 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup, 1858). *Aquaculture*, 179: 465-473.
- Robin, J.H., 1989. The quality of living preys for fish larval culture: preliminary results on mineral supplementation. In *Aquaculture - a biotechnology in progress* (Ed. N. De Paw, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins), vol. 2, p. 769-774. EAS, Bredene, Belgium.
- Rønnestad, I., 1992. Utilization of free amino acids in marine fish eggs and larvae. *Thesis, University of Bergen*, 90 pp.
- Rønnestad, I., Koven, W., Tandler, A., Harel, M., Fyhn, H.J., 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 162: 157-170.
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N., 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, 177: 201-216.
- Rösch, R., 1989. Coefficient of variation of final length as indicator of the quality of starter diets for fish larvae. *EAS Special Publication* nº 10: 221-222.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yúfera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130: 79-92.
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Bell, J.G., 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155: 119-129.
- Segner, H., Rösch, R., Schmidt, H., Von Poeppinghausen, K.J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.*, 35: 249-263.
- Segner, H., Rösch, R., Verreth, J., Witt, U., 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquac. Soc.*, 24: 121-134.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, 119: 471-486.
- Sen, P.R., Rao, N.G.S., Ghosh, S.R., Rout, M., 1978. Observations on the protein and carbohydrate requirements of carps. *Aquaculture*, 13: 245-255.
- Silvestre, M.P.C., Hamon, M., Yvon, M., 1994. Analysis of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2783-2789.
- Stone, F.E. & Hardy, R.W., 1986. Nutritional value of acid-stabilized and liquefied fish protein. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 797-803.
- Stone, F.E., Hardy, R.W., Shearer, K.D., Scott, T.M., 1989. Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 76: 109-118.

- Szlaminska, M., Escaffre, A.M., Alami-Durante, H., Charlon, N., Bergot, P., 1990. Casein in the place of beef liver in artificial diets for common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquat. Living Resour.*, 3: 229-234.
- Szlaminska, M., Escaffre, A.M., Charlon, N., Bergot, P., 1993. Preliminary data on semisynthetic diets for goldfish (*Carassius auratus* L.) larvae. In *Fish Nutrition in Practice* (Ed. Kaushik, S.J. & Luquet, P.), p. 607-612. INRA, Paris (Les colloques n°61).
- Takeuchi, T., Ohkuma, N., Ishida, S., Ishizuka, W., Tomita, M., Hayasawa, H., Miyakawa, H., 1998. Development of micro-particle diet for marine fish larvae. *Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition*, VII Int. Symp. Nutrition and Feeding of Fish (abstract O 47).
- Tonheim, S.K., Koven, W., Rønnestad, I., 2000. Enrichment of *Artemia* with free methionine. *Aquaculture*, 190: 223-235.
- Tulli, F. & Tibaldi, E., 1997. Changes in amino acids and essential fatty acids during early larval rearing of dentex. *Aquacult. Int.*, 5: 229-236.
- Ueberschär, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development* (Ed. B.T. Walter & H.J. Fyhn), p. 233-239. University of Bergen, Bergen.
- Verreth, J., Eding, E.H., Rao, G.R.M., Huskens, F., Segner, H., 1993. A review of feeding practices, growth and nutritional physiology in larvae of the catfishes *Clarias gariepinus* and *Clarias batrachus*. *J. World Aquac. Soc.*, 24: 135-144.
- Vu, T.T., 1983. Étude histoenzymologique des activités protéasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture*, 32: 57-69.
- Walford, J. & Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109: 187-205.
- Walford, J., Lim, T.M., Lam, T.J., 1991. Replacing live foods with microencapsulated diets in the rearing of seabass (*Lates calcarifer*) larvae: do the larvae ingest and digest protein-membrane microcapsules? *Aquaculture*, 92: 225-235.
- Watanabe, T. & Kiron, V., 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124: 223-251.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
- Yúfera, M., Pascual, E., Fernández-Díaz, C., 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. *Aquaculture*, 177: 249-256.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M.C., Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., García-Gallego, M., Parra, G., 2000. Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6: 143-152.
- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C., 1994a. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 399-408.

- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C., 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 209-212.
- Zambonino Infante, J.L. & Cahu, C.L., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.*, 129: 1195-1200.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.*, 127: 608-614.