Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Mestrado em Controlo de Qualidade

Optimização do Teor Lipídico da Dieta de Juvenis de Linguado (*Solea senegalensis*)

Pedro Alexandre Coelho Borges

Dezembro de 2008

Mestrado em Controlo de Qualidade

2008

Faculdade de Farmácia

Optimização do Teor Lipídico da Dieta de Juvenis de Linguado (*Solea senegalensis*)

Área: Água e Alimentos

Orientadora:
Prof. Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira
Co-orientadora:
Prof. Doutora Luísa Maria Pinheiro Valente

ÍNDICE

Abreviaturas iii

Agradecimentos iv

Abstract v

Resumo vi

Índice de Tabelas e Figuras vii

I - Revisão Bibliográfica 1

1 - INTRODUÇÃO 2

2 - MACRONUTRIENTES E SUA UTILIZAÇÃO 6

3 - LÍPIDOS 11

4 - ÁCIDOS GORDOS 13

4.1 - BIOSSÍNTESE E CONVERSÃO DE ÁCIDOS GORDOS 16

4.2 - ÁCIDOS GORDOS E DIETAS ENERGÉTICAS 20

5 - DEPOSIÇÃO E BIOSSÍNTESE LIPÍDICA NOS PEIXES 23

II – Parte Experimental 30

1 – INTRODUÇÃO 31

2 – BIOLOGIA DA ESPÉCIE 33

3 – MATERIAL E MÉTODOS 35

3.1 – DIETAS EXPERIMENTAIS 35

3.2 – ENSAIO DE CRESCIMENTO 36

3.3 – ANÁLISES QUÍMICAS 37

3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

4 - RESULTADOS 40

5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 45

III – Referências Bibliográficas 52

IV - Anexos 61

Anexo I – Determinação do Teor de Matéria Seca 61

Anexo II – Determinação da Energia Bruta 62

Abreviaturas

AA – Ácido araquidónico

ACoAC - Acetil-CoA carboxilase

ATP – Adenosina trifosfato

DHA – Ácido docosahexaenóico

EFA – Ácido gordo essencial

EPA – Ácido eicosapentaenóico

FAME - Éster metílico de ácido gordo

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FAS – Ácido gordo sintetase

FID - Detector de ionização de chama

FIT – *Fat-inducing transcript*

G6P – Glicose-6-fosfato

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

HDL – Lipoproteínas de elevada densidade

HUFA – Ácido gordo altamente insaturado

LN – Ácido linoleico

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LNA – Ácido linolénico

ME – Enzima málica

MS – Matéria seca

MUFA – Ácido gordo monoinsaturado

NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido

PUFA – Ácido gordo polinsaturado

SFA – Ácido gordo saturado

TAG – Triacilglicerol

VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade

Agradecimentos

À Prof.ª Doutora Beatriz Oliveira, pela disponibilidade, orientação e sempre bom humor com que acompanhou todo o meu trabalho.

À Prof.ª Doutora Luísa Valente, a co-orientadora deste trabalho, que já me conhece há alguns anos e desde então tem vindo a ajudar-me a apurar o sentido crítico e, principalmente, a organização.

À Prof.ª Doutora Susana Casal, que com os seus conhecimentos e disponibilidade possibilitou a realização de parte deste trabalho.

Às minhas amigas "laboratoriais", as futuras doutoradas Cláudia e Joana e as mestrandas Sílvia e Catarina, que merecem uma especial menção, uma vez que esta tese é fruto da nossa convivência e trabalho. Durante este tempo sempre me apoiaram e tornaram os longos serões de trabalho muito mais agradáveis e fáceis, com a sua boa disposição.

À minha família, que me apoiou sempre nas minhas escolhas.

A todos os meus amigos que, sem saber, são parte essencial para eu me manter focado nos meus objectivos.

À minha namorada, que sempre me apoiou e ajudou quando precisava.

Abstract

Over the last years, several aspects of Senegalese sole culture have been developed and optimized but dietary lipid level for optimal growth has never been determined. Hence, five isonitrogenous diets (56% dietary protein) with increasing dietary lipid levels (4, 8, 12, 16 and 20% DM) were fed to satiation to triplicate groups of 20 fish (mean initial weight of 10g). Fifteen tanks were randomly assigned one of the five diets. Feed was distributed using automatic feeders, and fish were fed over a 16-weeks period. At the end of the experiment fish fed on diets containing the two lowest dietary lipid levels (4 and 8%) showed a 3-fold body weight increase with significantly higher daily growth index than fish fed higher lipid levels (1.2 vs 0.8). Moreover, these fish displayed a significantly lower dry feed intake (12g/kg/day) and feed conversion ratio (1.0) compared to fish fed higher lipids levels (16-19g/kg/day and 2.0, respectively). Low dietary lipid levels (<12%) significantly improved nutrient retention and gain and hence growth, without major effects on whole body composition. Despite the slight alteration in n-3 PUFA muscle content in the fish fed low fat diets, this fish fed low dietary lipid still remains a rich n-3 PUFA product and generally maintained its nutritional value. These results evidenced a low lipid tolerance of Senegalese sole juveniles and suggest a maximal dietary inclusion level of 8% lipids for both optimal growth and nutrient utilization without compromising flesh quality.

Resumo

Nestes últimos anos, diversos aspectos do cultivo do linguado (*Solea senegalensis*) têm vindo a ser melhorados, mas o teor de lípidos ideal nunca foi testado para esta espécie. Neste trabalho, cinco dietas isoproteicas (56% MS) com diferentes teores lipídicos (4, 8, 12, 16 e 20% MS) foram distribuídas *add libitum* por grupos em triplicado de 20 peixes (peso médio inicial de 10g) que foram distribuídos aleatoriamente por quinze tanques. O alimento foi distribuído usando alimentadores automáticos durante um período de cerca de 16 semanas. No fim do ensaio, os peixes alimentados com as dietas com os teores mais baixos de lípidos (4 e 8% de lípidos) demonstraram um peso final três vezes superior ao inicial e uma taxa de crescimento diária significativamente superior à dos peixes alimentados com as dietas com teores lipídicos superiores (1,2 vs 0,8). Adicionalmente, estes peixes mostraram um consumo de matéria seca e uma conversão alimentar (12g/kg/dia e 1.0) inferior aos peixes alimentados com dietas com teores lipídicos superiores ou iguais a 12% (16-19g/kg/dia e 2.0, respectivamente) As dietas com os níveis lipídicos mais baixos (<12%) melhoraram significativamente a retenção e ganho de nutrientes e, consequentemente, o crescimento, sem provocar efeitos na composição corporal. Apesar da pequena alteração do teor de n-3 PUFA no músculo dos peixes alimentados com as dietas de baixo teor lipídico, este peixe mantém a sua qualidade nutricional e continua a ser um produto rico em n-3 PUFA.

Estes resultados evidenciam uma baixa tolerância lipídica dos juvenis do linguado (*Solea senegalensis*) e sugerem uma inclusão máxima de 8% de lípidos na dieta para maximizar o crescimento sem comprometer a qualidade final do pescado.

Índice de Tabelas e Figuras

Tabelas

Tabela I – Produção e utilização mundial de peixe (excluindo a China) 3

Tabela II – Ingredientes e composição aproximada das dietas com diferentes teores lipídicos (4, 8, 12, 16 e 20%) 35

Tabela III – Efeito da incorporação de diferentes teores lipídicos no crescimento e consumo, após 112 dias, em linguado (média e desvio padrão (n=3)) 41

Tabela IV – Composição corporal (% ou kJ/g em peso fresco), retenção (% do consumo) e ganho nutricional (g/kg/dia) de linguado alimentado com dietas com diferentes teores lipídicos durante 112 dias (média e desvio padrão (n=3)) 42

Tabela V – Índices somáticos (%), lípidos totais dos tecidos em peso fresco (%PF) e classes de ácidos gordos no músculo (g/100g ácido gordo) de linguado alimentado com dietas com diferentes teores lipídicos durante 112 dias (média e desvio padrão (n=6, excepto para os índices somáticos onde n=9)) 43

Figuras

Figura 1- Utilização e consumo de pescado e crescimento da população a nível mundial, excluindo a China 4

Figura 2 – Principais classes de lípidos, excluindo os esteróis 12

Figura 3 – Ácido gordo polinsaturado 13

Figura 4 – Ácido palmítico 14

Figura 5 – Exemplo de um MUFA, ácido oleico 15

Figura 6 – Ácido eicosapentaenóico 15

Figura 7 – Ponto de fusão de alguns ácidos gordos 16

Figura 8 – Diagrama representativo das principais vias de bioconversão dos ácidos gordos e prostaglandinas 17

Figura 9 – Consequência de elevados níveis de lípidos na dieta 21

Figura 10 - Processos bioquímicos envolvidos na lipogénese 24

Figura 11– Distribuição espacial do *Solea Senegalensis* 33

Figura 12 – Tanques e alimentadores do circuito fechado onde foi realizado o ensaio (CIIMAR, Porto) 36

Figura 13 – Estufa 61

Figura 14 – Esquema de uma bomba calorimétrica 62

I - Revisão Bibliográfica

1 – INTRODUÇÃO

O peixe proveniente da aquicultura desempenha, actualmente, um papel preponderante, quer a nível da alimentação humana, quer enquanto motor económico. Desde os primórdios da civilização que o cultivo de peixe tem sido importante, remontando a sua prática a 3500-4000 A.C. na China antiga (Stickney, 1994). De facto, actualmente, a China é o maior produtor de pescado (FAO, 2006). Na Europa, a aquicultura surgiu na idade Média (500-1500 D.C.), quando os peixes eram colocados nos pequenos lagos que cercavam os castelos, para mais tarde serem consumidos. Verificou-se que, quando não eram apanhados, se reproduziam, descobrindo-se uma forma simples de aquicultura (Hoffmann, 2005). Nessa altura, apenas a nobreza e o clero é que tinham capacidade económica para financiar a pesca e o consumo de peixe fresco, independentemente de viverem perto da costa. Com o aumento populacional e a evolução cultural, as exigências nutricionais aumentaram, levando a um consumo generalizado de peixe e, consequentemente, a um aumento de toda a indústria associada.

Em 2004, a produção global de pescado, excluindo a China, proveniente quer de captura quer da aquicultura, atingiu cerca de 95 milhões de toneladas. A China é, de longe, o maior produtor de pescado do mundo, com cerca de 47,5 milhões de toneladas produzidas em 2004. Contudo, estudos indicam que estas estatísticas estão sobrestimadas (FAO, 2006). Por isso, as tabelas apresentadas neste trabalho são representativas de todo o mundo, com excepção da China.

A aquicultura adquire cada vez mais um papel crucial no fornecimento de peixe para o consumo humano, que é já de 13,3kg *per capita*. Como se pode observar na Tabela I, a produção global de pescado manteve-se praticamente constante desde 2000. As oscilações nas capturas, provocadas por fenómenos climáticos e esgotamento dos *stocks*,

têm contribuído para o desenvolvimento e importância da aquicultura na produção global de pescado. Após o aumento verificado nas capturas de peixe marinho entre 1998 e 2000 - de 64,7 milhões de toneladas para 72 milhões de toneladas – seguiu-se um ligeiro decréscimo nos anos seguintes. Este decréscimo deve-se, essencialmente, ao declínio dos *stocks* naturais, em cerca de 12%, de duas das principais zonas de pesca: o Pacífico sudeste e o Pacífico noroeste (FAO, 2006). Aliada a esta delapidação dos recursos naturais está o aumento contínuo da população e, consequentemente, a procura de proteína.

Tabela I – Produção e utilização mundial de peixe (excluindo a China) (FAO, 2006)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	(Milhões de toneladas)					
Produção						
Águas interiores						
Captura	6,6	6,7	6,5	6,6	6,8	7
Aquicultura	6	6,5	7	7,6	8,3	8,8
Total	12,6	13,3	13,5	14,2	15,1	15,8
Marinho						
Captura	72	69,8	70,2	67,2	71,3	69,7
Aquicultura	4,9	5,3	5,6	6,1	6,6	6,6
Total	76,9	75,2	75,8	73,3	77,9	76,3
Total Captura	78,6	76,6	76,7	73,8	78,1	76,7
Total Aquicultura	10,9	11,9	12,6	13,8	14,9	15,4
Total Pesca	99,5	99,4	99,3	97,5	93	92,1
Utilização						
Consumo humano	63,9	65,7	65,7	67,5	69,9	69
Outros fins	25,7	22,7	13,7	20,1	24	23,1
Consumo *per capita* (kg)	13,3	13,9	13,3	13,4	13,5	13,4

Excluindo a China, o crescimento da população mundial tem vindo a aumentar mais rapidamente do que as capturas totais. Como resultado, o consumo *per capita* sofreu um declínio, passando de cerca de 14,6 em 1987 para 13,3kg em 2000 (Figura 1). De acordo com as estatísticas da *Food and Agriculture Organization* (FAO), a contribuição da aquicultura para o fornecimento global de peixe, crustáceos e moluscos continua a crescer,

aumentando de 3,9% em 1970, para 29,9% em 2002. O crescimento da aquicultura supera, claramente, qualquer outro sector de produção animal (FAO, 2006). Em todo o mundo, o sector tem crescido a uma taxa média de 8,9% por ano desde 1970, comparado com apenas 1,2% da pesca e 2,8% da produção de carne de animais terrestres, neste mesmo período. Contudo, os primeiros sinais de saturação deste mercado começam a aparecer, demonstrando que talvez este crescimento tenha atingido o seu máximo, exceptuando para algumas espécies.

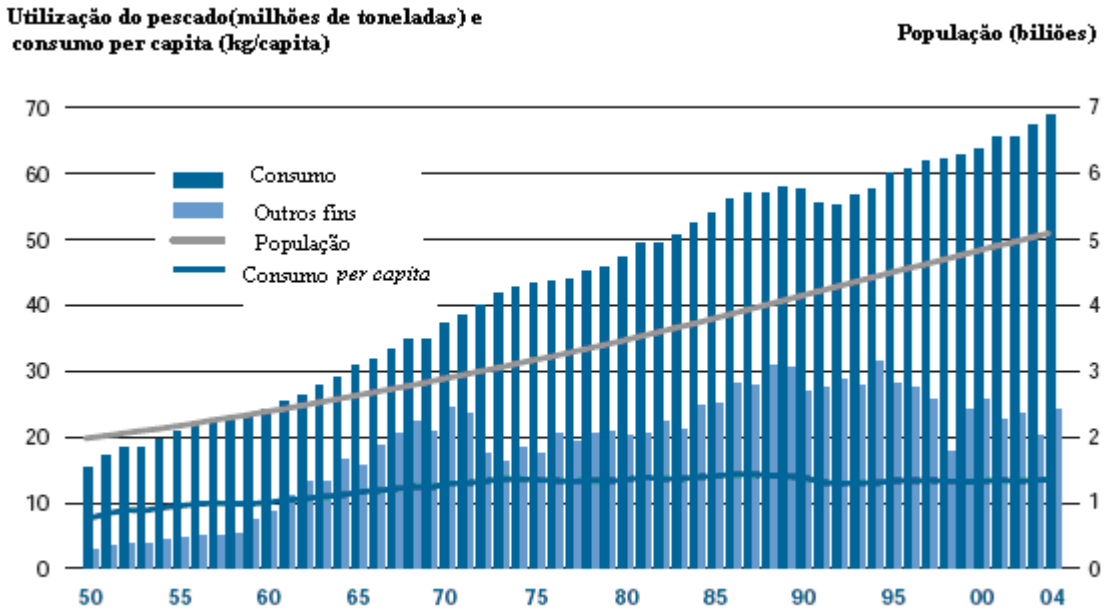

Figura 1- Utilização e consumo de pescado e crescimento da população a nível mundial, excluindo a China (FAO, 2006)

O crescimento da indústria aquícola levou a que, principalmente em salmonídeos, os métodos de produção fossem melhorados, reduzindo-se significativamente os tempos de produção. Desde 1975 que, na Noruega, o salmão do Atlântico tem sido seleccionado com vista a melhorar as suas taxas de crescimento. Conjuntamente, optimizaram-se as dietas e reduziu-se o ciclo de produção em cerca de 1,5 anos. Para obter um crescimento máximo dos exemplares, com um consumo mínimo de proteína animal, as dietas comerciais têm aumentado a incorporação de gordura, para que a proteína seja direccionada,

principalmente, para o crescimento e não dispendida em gastos energéticos (*protein sparing*). Este facto assume grande importância uma vez que este é o nutriente de maior custo. Desde que Lee e Putnam (1973) descreveram os benefícios da utilização de lípidos para poupar proteína, em salmonídeos, que se tornou prática habitual na indústria o uso de dietas com altos teores lipídicos (Hillestead *et al.*, 1998). Apesar destas dietas reduzirem os custos de produção, têm-se verificado problemas de excesso de deposição lipídica e alteração da qualidade do músculo em termos de frescura, armazenamento e características físicas e organolépticas dos peixes, principalmente salmonídeos, alimentados com este tipo de ração (Sheehan, 1996; Gjedrem *et al*., 1997). Um excesso de deposição lipídica conduz a um decréscimo do rendimento de carcaça e pode alterar a qualidade organoléptica do músculo (Fauconneau *et al.*, 1993; Regost *et al.*, 2001 a, b). Para além de todos os problemas associados ao excesso de deposição de gordura causados pela dieta, o peixe continua a ser um produto benéfico para quem o consome, devido ao seu alto teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) n-3 (Connor, 2000).

2 – MACRONUTRIENTES E SUA UTILIZAÇÃO

A forma como os peixes utilizam os nutrientes está directamente relacionada com factores como a espécie, fase de desenvolvimento, sexo e estadio de maturação sexual, temperatura da água, frequência de alimentação e qualidade da dieta. Os nutrientes podem ser classificados em macronutrientes, dos quais fazem parte as proteínas, os lípidos e os hidratos de carbono, e micronutrientes, onde se incluem as vitaminas e os minerais. Todos os animais necessitam de energia e é através da metabolização destes macronutrientes da dieta que a obtêm.

As proteínas são usadas, essencialmente, para a produção de novas proteínas (crescimento e reprodução) ou para substituição de outras já existentes (manutenção). Contudo, quando em excesso, podem ser utilizadas para fins energéticos (oxidação) (Wilson *et al.*, 2002). As proteínas são os principais componentes dos tecidos do peixe, representando cerca de 65–75% do peso corporal, expresso em matéria seca. A proteína é digerida para obtenção dos aminoácidos, que são absorvidos no tracto intestinal e usados para os fins acima descritos. Os peixes não necessitam, propriamente, de proteína no seu sentido mais lato, mas sim de uma mistura equilibrada de aminoácidos. Grande parte dos trabalhos usam dietas semi-purificadas ou purificadas para estimar as necessidades proteicas brutas, onde, através de uma curva dose-resposta se estima a quantidade mínima de proteína necessária para obter o crescimento máximo (Wilson e Halver, 1986). Os peixes em geral, e os carnívoros em particular, têm necessidades proteicas muito superiores às dos mamíferos ou das aves (Cowey e Sargent, 1972). Esta observação levou a que muitos investigadores sugerissem que a eficiência de utilização da proteína seria menor nos peixes do que noutros vertebrados. Contudo, Tacon e Cowey (1985) verificaram que estes requisitos, quando expressos relativamente ao consumo e tamanho (g

proteína/kg peso corporal/dia) eram similares. Como referido anteriormente, o perfil de aminoácidos deverá ser adequado para obter um crescimento óptimo. De forma a saber quais os aminoácidos indispensáveis e os dispensáveis, podem ser feitos ensaios para determinar os requisitos de aminoácidos, de um ponto de vista qualitativo. Num dos primeiros trabalhos realizados nesta área (Halver, 1957) compararam-se dietas com 70% de aminoácidos cristalinos, baseando-se no perfil de aminoácidos da proteína do ovo de galinha, proteína do ovo de salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*) e proteína do saco vitelino de salmão real. A dieta baseada na proteína de ovo de galinha foi a que promoveu um maior crescimento e eficiência alimentar sendo, por isso, usada como dieta controlo para estabelecer o requisito qualitativo de aminoácidos para o salmão real (Halver *et al*., 1959). Foram determinados, de entre os 18 aminoácidos mais comuns, quais os essenciais, comparando as taxas de crescimento de peixes alimentados com a dieta controlo e as dietas deficientes apenas num dos dezoito aminoácidos. Depois deste trabalho inovador, outros autores, utilizando o método aqui descrito, estabeleceram os requisitos para outras espécies (Wilson e Halver, 1986) e identificaram os mesmos 10 aminoácidos considerados indispensáveis para a maior parte dos animais: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

Os lípidos e os hidratos de carbono são, preferencialmente, usados por qualquer animal para fins energéticos. Os hidratos de carbono, apesar de serem uma fonte de energia relativamente fácil de utilizar, como o amido, não são muito utilizados pelos peixes, principalmente os marinhos, que são maioritariamente carnívoros. O amido é um polímero de açúcares simples, com ligações α-glicosídicas entre si, não sendo preciso um grande número de enzimas para a sua transformação em monómeros simples. As proteínas, por sua vez, são normalmente constituídas por cerca de 20 aminoácidos, sendo preciso uma grande diversidade de proteases específicas para reconhecer ligações entre diferentes

aminoácidos. Tendo isto em conta, seria de esperar que os hidratos de carbono fossem utilizados preferencialmente como fonte de energia. Contudo, a explicação para a sua fraca utilização por parte dos peixes marinhos é bastante simples: milhares de anos num ambiente pobre em hidratos de carbono e hábitos alimentares maioritariamente carnívoros levaram a que este nutriente não fosse devidamente aproveitado. A anatomia do tracto intestinal dos peixes evoluiu segundo o tipo de regime alimentar para optimizar a ingestão, digestão e assimilação dos nutrientes (Rust *et al.*, 2002). A alimentação dos peixes herbívoros é constituída, essencialmente, por fontes vegetais; nos omnívoros a sua alimentação é uma mistura de fontes vegetais e animais. Um peixe carnívoro consome fontes animais, consumindo raramente ou nunca fontes vegetais directamente e por isso mesmo tem uma dieta muito menos variada que a de um herbívoro ou de um omnívoro. Por outro lado, a densidade nutricional dos alimentos ingeridos é muito maior, necessitando de ingerir uma quantidade inferior para obter a mesma quantidade de nutrientes que um herbívoro ou um omnívoro. Tal como em mamíferos, o tipo de regime alimentar levou a uma diferenciação, quer a nível anatómico quer a nível enzimático que, consequentemente, leva a uma diferente utilização dos nutrientes, em especial dos hidratos de carbono. Em peixes, parece não haver nenhum requisito em hidratos de carbono (Wilson, 1994; Stone, 2003). Diversos autores constataram, após a ingestão de hidratos de carbono, que uma grande parte das espécies era intolerante à glicose, principalmente as carnívoras, as mais apreciadas pelos consumidores. Testes de glicose intraperitoniais e orais demonstraram que os peixes herbívoros e omnívoros são mais eficientes na utilização da glicose do que os peixes carnívoros (Stone, 2003). Quando alimentados com uma composição superior a 10% de hidratos de carbono digeríveis na dieta, diversas espécies carnívoras exibem sintomas semelhantes a animais diabéticos, não conseguindo regular a concentração de glicose no sangue (Wilson *et al.*, 1994). Adicionalmente, verificou-se que

níveis superiores a 10% resultavam em hiperglicemia, tamanho aumentado do fígado e do teor em glicogénio em truta arco-íris e salmão Atlântico (Brauge *et al.*, 1994; Hauler, 1995). De facto, devido a estas constatações, inicialmente pensou-se que os peixes não tinham a capacidade de sintetizar insulina ou que os seus níveis seriam tão baixos que não seriam capazes de regular a concentração de glicose no sangue (Palmer e Ryman, 1972); a insulina e o glucagão são duas hormonas chave na regulação dos níveis plasmáticos de glicose (Mommsen, 2000; Hemre *et al.*, 2002). Contudo, com o aparecimento de técnicas radioimunológicas, verificou-se que alguns peixes tinham valores em jejum idênticos aos de humanos (Stone, 2003). Apesar da existência de insulina a sua ordem de grandeza, em termos de actividade e quantidade, é bem distinta para diversas espécies, quando comparada com os valores de humanos, quer em níveis de jejum como pós-alimentação. Contudo, uma das explicações para a fraca utilização da glicose e a intolerância observada em algumas espécies parece residir nos transportadores de glicose. Em mamíferos, existem diversos tipos de transportadores de glicose no músculo, sendo dois dos principais o GLUT-1 e GLUT-4: o GLUT-1 facilita a entrada da glicose independentemente da acção da insulina; o GLUT-4 é dependente da acção da insulina para a entrada de glicose e é o responsável pelo efeito hipoglicémico em mamíferos (Wright *et al.* 2000). Este último, segundo alguns estudos, parece não existir em peixes (Stone, 2003).

Também se deve ter em consideração as propriedades físicas e a complexidade molecular dos hidratos de carbono. Conforme a fonte, a sua utilização é variável. Em dietas para peixe a principal fonte de hidratos de carbono é, normalmente, o amido proveniente, essencialmente, de fontes vegetais. Dependendo da fonte (trigo, centeio, batata) a estrutura do amido é diferente, podendo alterar a sua disponibilidade (Stone, 2003).

Aparentemente, o uso de hidratos de carbono como fonte energética para poupança de proteína parece ser uma opção no caso de peixes herbívoros ou omnívoros (Stone, 2003). A fraca utilização dos hidratos de carbono dietéticos pelos peixes carnívoros sugere que a formulação das suas dietas deve ter, como principal fonte energética, os lípidos. Como consequência, as dietas para peixes carnívoros serão sempre mais dispendiosas do que para peixes omnívoros ou herbívoros.

3 - LÍPIDOS

Os lípidos são, sem sombra de dúvida, as biomoléculas mais estudadas, sendo a sua importância e função muito frequentemente debatida em artigos científicos e conferências, no âmbito da nutrição de peixes. Este facto pode levar a pensar que estes são os nutrientes mais importantes e sobre os que mais se sabe. No entanto, sabe-se menos sobre as necessidades nutricionais em lípidos no peixe, ou mesmo de outro animal, do que qualquer dos outros nutrientes, daí haver tanta investigação na temática dos lípidos (Sargent *et al.*, 2002).

Podem enquadrar-se diversas moléculas naquilo a que se chama lípidos. Quimicamente, os lípidos são biomoléculas orgânicas formadas basicamente por carbono, hidrogénio e oxigénio, embora este numa percentagem muito mais baixa. Para além destes elementos, podem conter fósforo, azoto e enxofre. É um grupo de substâncias muito heterogéneas com apenas duas características em comum:

1 – São insolúveis ou parcialmente solúveis em água

2 – São solubilizadas em solventes orgânicos, como éter, clorofórmio, benzeno, etc.

Os lípidos desempenham funções biológicas de extrema importância, quer a nível estrutural (membranas celulares), quer como reserva energética (gordura corporal). Podem ainda, entre outras funções, funcionar como mensageiros (hormonas).

À semelhança do que acontece nos vertebrados superiores, também as principais classes de lípidos nos peixes são os triacilgliceróis (TAG), lípidos de armazenamento, e os fosfolípidos constituintes das membranas celulares (Figura 2).

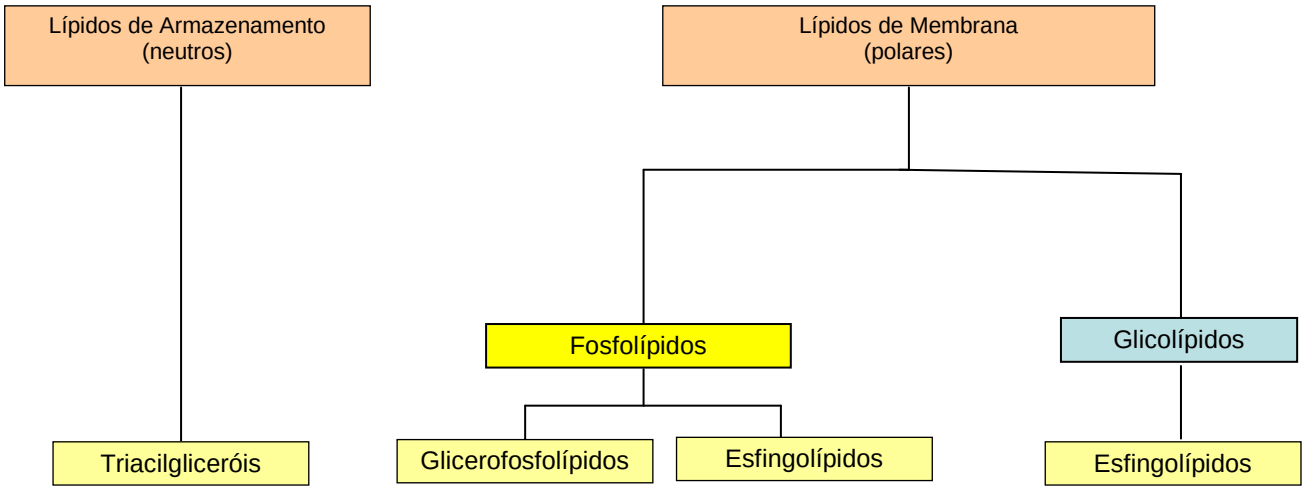

Figura 2 – Principais classes de lípidos, excluindo os esteróis (adaptado de Nelson e Cox, 2000)

Os TAG são triésteres de glicerol e de três ácidos gordos, enquanto os fosfolípidos são ésteres de dois ácidos gordos e de um ácido fosfórico, associado a outro álcool (geralmente etanolamina, colina, serina ou inositol) por uma ligação diéster (Nelson e Cox, 2000). Os TAG constituem as principais reservas lipídicas nos peixes. Desta forma, a energia armazenada é menos susceptível à oxidação do que os hidratos de carbono ou as proteínas (De Silva e Anderson, 1995). Nas espécies marinhas podem-se ainda encontrar outras classes de lípidos, nomeadamente as ceras e os esteróis, onde o colesterol é, sem dúvida, o mais representativo e ao qual se atribui maior importância devido às suas funções biológicas (Sargent *et al.*, 2002).

4 – ÁCIDOS GORDOS

Com a excepção do colesterol, todas as restantes classes lipídicas referidas contêm ácidos gordos, esterificados com um grupo álcool, como no caso dos glicéridos, e com o grupo amina, no caso dos esfingolípidos. Os ácidos gordos são designados com base no comprimento das suas cadeias carbonadas, grau de insaturação (número de ligações duplas) e pela posição das ligações duplas. Logo, C14:0 e C16:0 designam ácidos gordos com 14 e 16 carbonos, respectivamente, e sem ligações duplas. O primeiro número é referente ao número de carbonos que constituem a cadeia carbonada do ácido gordo, sendo o seguinte referente ao número de ligações duplas existentes. Quando há ligações duplas, elas são assinaladas utilizando-se dois tipos de nomenclatura distinta. O termo C18:1n-7 designa um ácido gordo com 18 carbonos cuja ligação dupla se encontra no carbono nº 7 a contar do grupo metilo da molécula. A designação C18:1 Δ^{11} representa o mesmo ácido gordo, mas neste tipo de nomenclatura, as ligações duplas são assinaladas por Δ, sendo a posição da ligação dupla contada a partir do carbono do grupo carboxilo. Ao longo deste trabalho será adoptada a primeira nomenclatura (contagem das ligações a partir do carbono do grupo metilo).

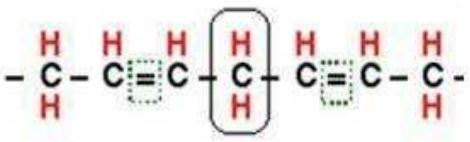

Figura 3 – Ácido gordo polinsaturado

Nos PUFA, com duas ou mais ligações, geralmente numa configuração *cis*, as ligações duplas são interrompidas por um CH_2 (Figura 3). Logo, ao especificar a posição da primeira ligação dupla toda a restante estrutura fica definida e apenas para as formas conjugadas esta regra não se aplica.

Por vezes, na literatura podem ser encontradas designações diferentes para certos ácidos gordos. Geralmente, esses nomes reflectem a origem desses ácidos gordos, tal como

o ácido palmítico (C16:0), que é abundante no óleo de palma, ou o ácido oleico (C18:1n-9) que pode ser encontrado abundantemente no azeite. Também podem ser encontrados na literatura nomes greco-latinos mais formalizados, tais como ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3), reflectindo estas designações o número de carbonos (20 e 22) e de ligações duplas (5 e 6).

De acordo com o número de ligações duplas que possuem, os ácidos gordos podem classificar-se em ácidos gordos saturados (SFA; sem ligações duplas), monoinsaturados (MUFA; apenas com uma ligação dupla), PUFA (2 a 6 ligações duplas), ou então altamente insaturados (HUFA). Este último é um termo mais usado em aquicultura, não havendo uma clara definição do termo, embora, segundo Sargent *et al.* (2002), possam ser definidos como ácidos gordos com cadeias carbonadas de 20 ou mais carbonos e com mais de duas ligações duplas.

Os SFA estão naturalmente presentes em todas as gorduras animais e possuem cadeias carbonadas com 14 a 24 carbonos. São bastante abundantes nas membranas celulares, principalmente o ácido palmítico (C16:0), representado na Figura 4, esteárico (C18:0) e, em menor quantidade, araquídico (C20:0).

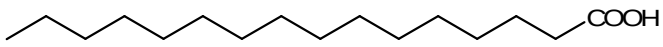

Figura 4 – Ácido palmítico

À semelhança dos SFA, os MUFA são encontrados naturalmente em todos os animais, possuindo cadeias carbonadas com cerca de 14 a 24 carbonos. Igualmente, surgem com maior frequência nas membranas celulares com cadeias carbonadas de C16, C18 e, em menor extensão, C20 (Figura 5).

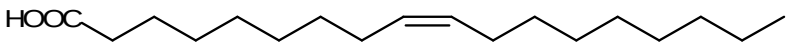

Figura 5 – Exemplo de um MUFA, ácido oleico

Os PUFA podem ser encontrados em grande número em organismos marinhos, principalmente algas. Estes PUFA são geralmente da série n-3, contudo representantes da série n-6 e n-9 também podem ser encontrados. Nos peixes, os PUFA importantes são o ácido araquidónico (AA, C20:4n-6) e o seu precursor metabólico, o ácido linoleico (LN, C18:2n-6), juntamente com o ácido eicosapentaenóico, representado na Figura 6 (EPA; C20:5n-3), o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3) e o precursor de ambos, o ácido linolénico (LNA; C18:3n-3).

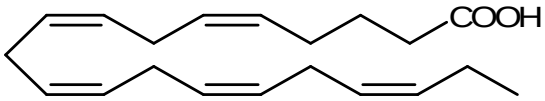

Figura 6 – Ácido eicosapentaenóico

Tal como na maioria dos vertebrados estudados até à data, o AA, o EPA e o DHA são ácidos gordos essenciais (EFA) para um desenvolvimento normal dos peixes. As suas funções bioquímicas, celulares e fisiológicas são idênticas em peixes e em vertebrados superiores, sendo basicamente: 1 - manter a integridade funcional e estrutural das membranas celulares; 2 - precursores de um grupo de hormonas biologicamente activas, conhecidas como eicosanóides. Estes últimos são produzidos por quase todo os tecidos do corpo e estão envolvidos numa grande variedade de mecanismos fisiológicos.

Os lípidos são, usualmente, bem ou muito bem digeridos. A excepção acontece com ácidos gordos de elevado ponto de fusão, que são sólidos à temperatura à qual os peixes se encontram. O ponto de fusão dos TAG depende essencialmente da composição em ácidos gordos dos mesmos. Como consequência dos seus baixos pontos de fusão

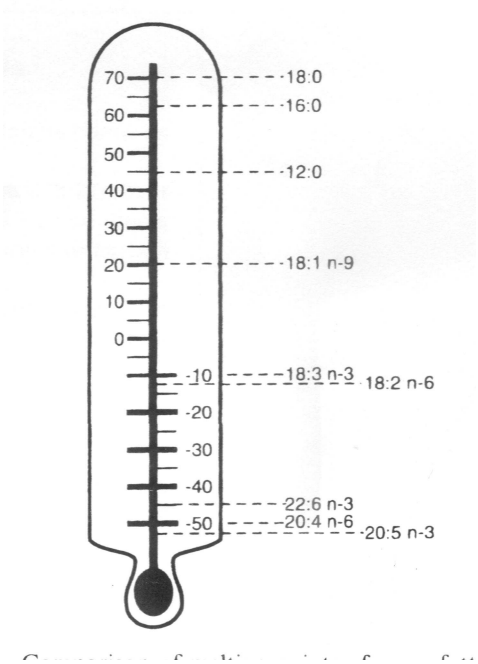

Figura 7 – Ponto de fusão de alguns ácidos gordos

(Figura 7), os PUFA são particularmente bem digeridos. No salmão atlântico, os seus coeficientes de digestibilidade são de 90-98%, quando ingeridos como ácidos gordos livres. Por sua vez os SFA são pior utilizados, com estes valores de digestibilidade a baixar significativamente com o aumento da cadeia carbonada. Por exemplo, em salmão atlântico, quando se comparam os coeficientes de digestibilidade do ácido mirístico (C14:0) com o do ácido esteárico (C18:0) estes baixam de 70 para 50% respectivamente (Corraze, 2001).

4.1 – BIOSSÍNTESE E CONVERSÃO DE ÁCIDOS GORDOS

A inclusão de lípidos na dieta, na maior parte das espécies, promove uma melhor utilização da proteína devido ao aumento da energia não proteica. Contudo, só a relação óptima entre os níveis de energia e proteína é insuficiente para garantir o crescimento saudável do peixe. Devido a processos bioquímicos, inerentes à biologia da espécie, alguns ácidos gordos envolvidos em importantes funções biológicas não podem ser sintetizados *de novo*, os denominados EFA (NRC, 1993). Nos peixes, a síntese de ácidos gordos ocorre principalmente no fígado. Os principais ácidos gordos sintetizados *de novo* são o C16:0, o C18:0 e o C14:0. Os ácidos gordos (neossintetizados ou fornecidos pela dieta) podem ser transformados em ácidos gordos de cadeia mais longa e/ou mais insaturada, dentro de certos limites. Os MUFA, como o C18:1n-9, são sintetizados pela acção da Δ^9-dessaturase. No caso dos PUFA, a bioconversão compreende reacções de

elongação (adição de unidades de dois átomos de carbono) e dessaturação (adição de duplas ligações), asseguradas sucessivamente pelas dessaturases Δ^6, Δ^5 e talvez a Δ^4 (Figura 8).

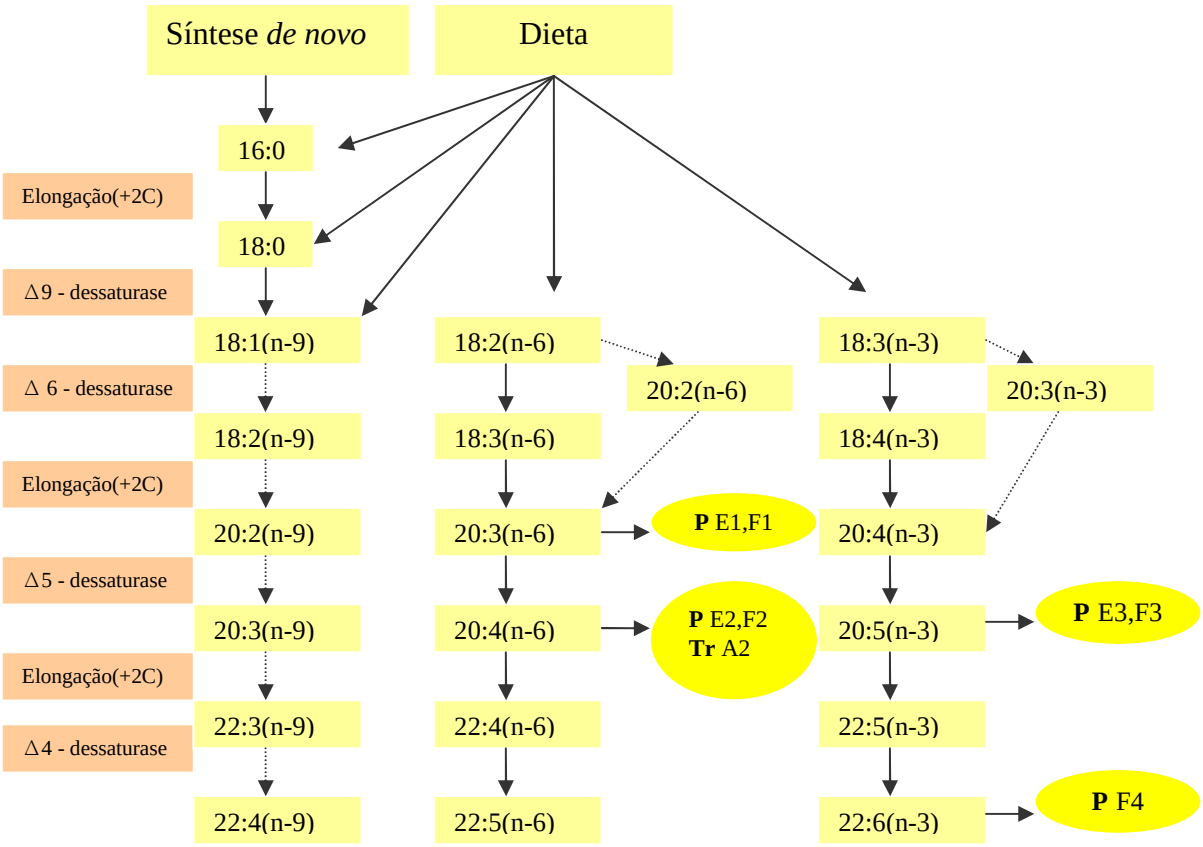

Figura 8 – Diagrama representativo das principais vias de bioconversão dos ácidos gordos e prostaglandinas. As linhas a cheio representam as principais vias; a tracejado as de menor importância. As séries n-9 ocorrem apenas nos peixes de água doce aquando de deficiências em EFA. **P**-prostaglandina; **Tr**-tromboxanos (adaptado de Corraze, 2001).

Nos peixes, estes sistemas não foram ainda completamente caracterizados mas as dessaturases são, de certa forma, pouco específicas, decrescendo a sua afinidade da série n-3 para a série n-9. O aparecimento de HUFA da série n-9, que é raro mesmo nos peixes de água doce, só acontece em caso de deficiências nos ácidos gordos 18:2n-6 e 18:3n-3, constituindo assim um critério de deficiência (Corraze, 2001).

A necessidade em determinados ácidos gordos depende da espécie considerada e da fase de desenvolvimento do peixe (Izquierdo, 1996). À semelhança de outros animais, os peixes também não são capazes de sintetizar LNA (C18:3n-3) e LN (C18:2n-6) *de novo,* sendo essencial o seu fornecimento na dieta (NRC, 1993; Corraze, 2001). As formas biológicas destes EFA são geralmente os metabolitos C20 e C22, ou seja os ácidos gordos 20:4n-6 (AA), 20:5n-3 (EPA) e 22:6n-3 (DHA), designados por ácidos gordos altamente insaturados (HUFA), biossintetizados a partir dos precursores LN e LNA (Sargent *et al*., 2002).

As espécies marinhas selvagens têm uma dieta à base de pequenos peixes, naturalmente ricos em EPA e DHA provenientes do zooplâncton, via fitoplâncton. Assim sendo, estas espécies ao longo da sua evolução não sentiram a necessidade de converter o LNA para obter estes ácidos gordos, diminuindo ou quase anulando a actividade das enzimas envolvidas nessas reacções, especialmente a Δ^5 e Δ^4-dessaturase. (Sargent *et al*., 2002). Em resultado deste processo evolutivo natural, as necessidades em EFA n-3 apenas podem ser supridas pelo fornecimento de EPA e DHA através da dieta. Contudo, teorias recentes apontam que a inserção da dupla ligação em C4, no DHA, não é directa a partir do 22:5n-3. Aparentemente, não existe uma enzima Δ^4-dessaturase, logo é necessário um elongamento da cadeia para 24 carbonos, seguida de dessaturação pela Δ^6-dessaturase e posterior β-oxidação (Bell *et al.*, 2003b). É possível que existam isoenzimas Δ^6--dessaturases com especificidade para diferentes substratos, na conversão de LNA para 18:4n-3 e 24:5n-3 para 24:6n-3, pois em alguns tecidos de truta arco-íris não se encontram os metabolitos finais dos dois passos em que estas enzimas entraram (Bell *et al.*, 2003b). Experiências em ratos e humanos demonstraram ser a mesma enzima a actuar em C18 e C24 (D´Andrea *et al.*, 2002).

As elevadas necessidades em HUFA nos peixes marinhos não significam o total desaparecimento de todas as vias de bioconversão envolvendo os C18. No rodovalho, o LN continua a ter um papel essencial, que pode ser explicado por uma capacidade de bioconversão residual, permitindo a síntese de HUFA intermediários, como o C20:3n-6, importante precursor das prostaglandinas.

Os peixes de água doce apresentam uma capacidade de bioconversão dos C18 em HUFA comparável à dos mamíferos, o que torna os LNA e LN os únicos realmente essenciais para estes animais (Corraze, 2001).

As necessidades quantitativas em EFA são muito difíceis de definir com precisão. Na formulação de um regime alimentar, que cubra as necessidades em EFA de determinada espécie de peixe, é necessário ter um conhecimento prévio da série de ácidos gordos principal para a espécie (n-3 ou n-6), assim como a sua capacidade de bioconversão. Muitas das dificuldades em compreender a bioquímica dos ácidos gordos e optimizar os seus teores nas dietas poderão estar relacionadas com interacções competitivas entre os PUFA, da série n-6 e n-3, e os MUFA, e entre os ácidos gordos com diferente número de carbonos e aqueles que apresentam graus de insaturação distintos da mesma série, nomeadamente entre o EPA e o DHA (Sargent *et al*., 2002).

Embora alguns destes processos possam ainda não ser suficientemente claros e apesar das diferenças quanto às necessidades em EFA entre os peixes marinhos e de água doce, nas espécies cultivadas é possível modelar a composição lipídica muscular através da composição da dieta (Corraze, 2001; Sargent *et al*., 2002). As várias espécies de teleósteos continuam a ser uma importante fonte alimentar de ácidos gordos n-3 e n-6, o que as torna especialmente atractivas sob o ponto de vista da saúde humana, tendo sido demonstrado por vários estudos que, através de alterações nas proporções destas duas famílias de PUFA, se pode influenciar o perfil dos eicosanóides nos humanos. A

possibilidade de modelar o teor lipídico dos peixes abre assim novas perspectivas de melhoria do seu valor nutritivo, enquanto produto alimentar.

4.2 – ÁCIDOS GORDOS E DIETAS ENERGÉTICAS

O papel mais importante dos lípidos, em todos os organismos, é a sua capacidade de gerar energia na forma de ATP através da β-oxidação mitocondrial. Este processo celular já está bem descrito em peixes (Sargent *et al.*, 1989). Os lípidos, especialmente os ácidos gordos, são uma fonte importante de energia, especialmente em peixes marinhos carnívoros, onde mais de 20% do seu peso seco é constituído por ácidos gordos (sardinha, arenque). Os hidratos de carbono são escassos na sua dieta, no meio natural, tendo um papel pouco preponderante como fonte energética. Todavia existem excepções, como a carpa herbívora, peixe de água doce, capaz de digerir material vegetal que, para além de açúcares simples, possua polissacarídeos complexos como a celulose, a quitina e a lenhina, que apenas são digeridos devido a uma flora intestinal muito específica (Watanabe, 1982). A deficiente capacidade de digerir e utilizar os hidratos de carbono da dieta nas espécies carnívoras deve-se provavelmente a uma adaptação a um meio pobre em hidratos de carbono. Assim, as dietas formuladas para aquicultura contêm predominantemente lípidos e proteínas, com pequenas quantidades de vitaminas e minerais. Contudo, algumas espécies de peixes omnívoros de água quente possuem elevado potencial para utilizar os hidratos de carbono, sendo por isso também incorporados nas suas dietas (Stone, 2003). Como a proteína é o composto mais dispendioso na formulação de uma dieta são incorporados apenas os teores mínimos para garantir um crescimento máximo dos exemplares, cabendo aos lípidos a função de gerar energia. Desta forma, grande parte da proteína alimentar irá ser convertida em proteína muscular, a que geralmente se atribui o nome de *protein sparing*. Com base neste fenómeno, a indústria tem incorporado teores

cada vez mais elevados de lípidos, fornecendo dietas altamente energéticas. Apesar do *protein sparing* estar bem documentado, ainda não foi determinado, com precisão, até que ponto este é efectivo para a maior parte das espécies de peixe cultivadas, continuando as formulações das dietas a aumentar os níveis de lípidos (Sargent *et al*., 2002). O uso de dietas ricas em lípidos é controverso, uma vez que o efeito de *protein sparing* é responsável não só pelo aumento de peso, como também pelo aumento da adiposidade (Figura 9). Há evidências de que níveis elevados de lípidos na dieta aumentam a deposição destes nos peixes e alteram a qualidade do músculo em termos de frescura, estabilidade de armazenamento e propriedades físicas e organolépticas (Sheehan *et al.*, 1996; Gjedrem, 1997; Einen e Skrede, 1998). A redução dos ciclos de produção é ainda um dos principais objectivos da indústria aquícola, tendo em conta a competitividade e exigências do mercado. Os trabalhos nesta área resumem-se essencialmente às quatro espécies mais cultivadas: salmão do Atlântico, truta arco-íris, dourada e robalo. Contudo, em ensaios de nutrição, peixes como o rodovalho, bacalhau, linguado, sargo e pargo são actualmente alvo de investigação de forma a diversificar o mercado, que começa a estar saturado para as espécies produzidas em larga escala.

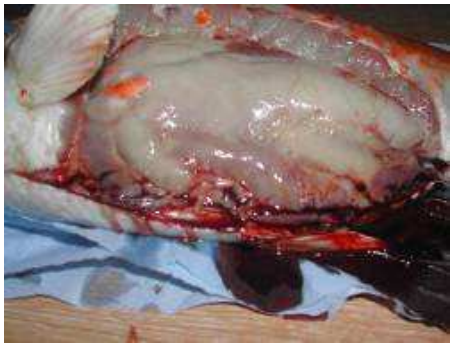

Figura 9 – Consequência de elevados níveis de lípidos na dieta

Na truta arco-íris, peixes alimentados com 21% de lípidos aumentaram o crescimento em relação a peixes que consumiram dietas que continham 8 e 11% de lípidos, respectivamente (Luzzana *et al.*, 1994). Em salmão do Atlântico testaram-se teores mais elevados de lípidos, verificando-se que dietas com 37 e 48% de lípidos aumentaram mais o crescimento do que uma dieta que continha 31% de lípidos (Hemre e Sandnes, 1999). Contudo, é necessário saber até que ponto este efeito no crescimento poderá ser

obtido através do aumento do teor lipídico de uma dieta. Um estudo realizado por Perez e Oliva-Teles (1999) em robalo mostrou que os peixes alimentados com uma dieta com 24% de lípidos cresciam mais do que os peixes que continham, quer níveis inferiores (12 e 18%), quer níveis superiores (30%) de lípidos. Em rodovalho, existem igualmente evidências de que níveis superiores a 20% prejudicam o crescimento, verificando-se uma diminuição na taxa de crescimento (Cacerez-Martinez *et al*., 1984; Regost *et al*., 2001b). Já em halabote não se verificou nenhum efeito negativo na taxa de crescimento quando se fornece dietas com teores lipídicos até 28% (Berge e Storebaken, 1991; Aksnes *et al*., 1996; Grisdale-Helland e Helland, 1998; Martins *et al*., 2007). A quantidade de lípidos numa dieta, capaz de promover este efeito de *protein sparing,* é muito dependente da espécie e da sua forma de metabolizar os nutrientes da dieta. O estado de desenvolvimento dos animais também influencia a quantidade de lípidos a introduzir na dieta (Salhi *et al.*, 1994; Vergara *et al.*, 1999). A optimização de todos os parâmetros de uma dieta (dimensão, lípidos totais, hidratos de carbono, minerais, etc.) deve ser cuidadosamente avaliada e aplicada, de forma consciente, para suprir as necessidades nutricionais e potenciar o crescimento.

5 - DEPOSIÇÃO E BIOSSÍNTESE LIPÍDICA NOS PEIXES

As principais etapas do metabolismo lipídico nos peixes são actualmente conhecidas e apresentam grandes semelhanças com as dos mamíferos (Sheridan, 1988; Corraze, 2001). Os lípidos da dieta, sobretudo os TAG, são hidrolisados no lúmen do intestino, por lipases pancreáticas, a ácidos gordos livres e a 2-monoacilgliceróis. Os ácidos gordos absorvidos são re-esterificados nos enterócitos em TAG e fosfolípidos. Os lípidos re-sintetizados são maioritariamente incorporados em partículas de natureza lipoproteica, análogas aos quilomicrons dos mamíferos e às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Estas lipoproteínas são transportadas, principalmente através do sistema linfático, para o fígado. Parte dos ácidos gordos absorvidos podem ainda ser transportados conjugados com a albumina, via sistema porta. Esta via parece ser apenas importante em situações de re-alimentação, após um jejum prolongado, e quando as concentrações de glicerol são limitantes (Santinha *et al.*, 1999). No fígado, os lípidos provenientes da dieta, assim como os que são sintetizados *de novo* por esse órgão, são esterificados para formar novas lipoproteínas. Tal como nos vertebrados superiores, o transporte dos lípidos do fígado em direcção aos tecidos é assegurado por 3 categorias de lipoproteínas plasmáticas: VLDL, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de elevada densidade (HDL) (Sheridan, 1988). As lipoproteínas em circulação sofrem uma transformação intra-vascular pela acção das enzimas lipoproteína lipase e lecitina--colesterol-acil-transferase (Sheridan, 1988). Os TAG, constituintes dos quilomicrons e das VLDL, são hidrolisados neste processo, permitindo que os ácidos gordos libertados sejam armazenados nos tecidos ou utilizados com fins energéticos.

Nos mamíferos, o armazenamento dos lípidos provenientes da dieta, assim como os que são sintetizados *de novo* efectua-se, essencialmente, num tecido bem específico: o

tecido adiposo. No entanto, nos peixes a deposição lipídica pode ter lugar em vários tecidos: tecido hepático, adiposo perivisceral, muscular e até mesmo no tecido subcutâneo (Figura 10).

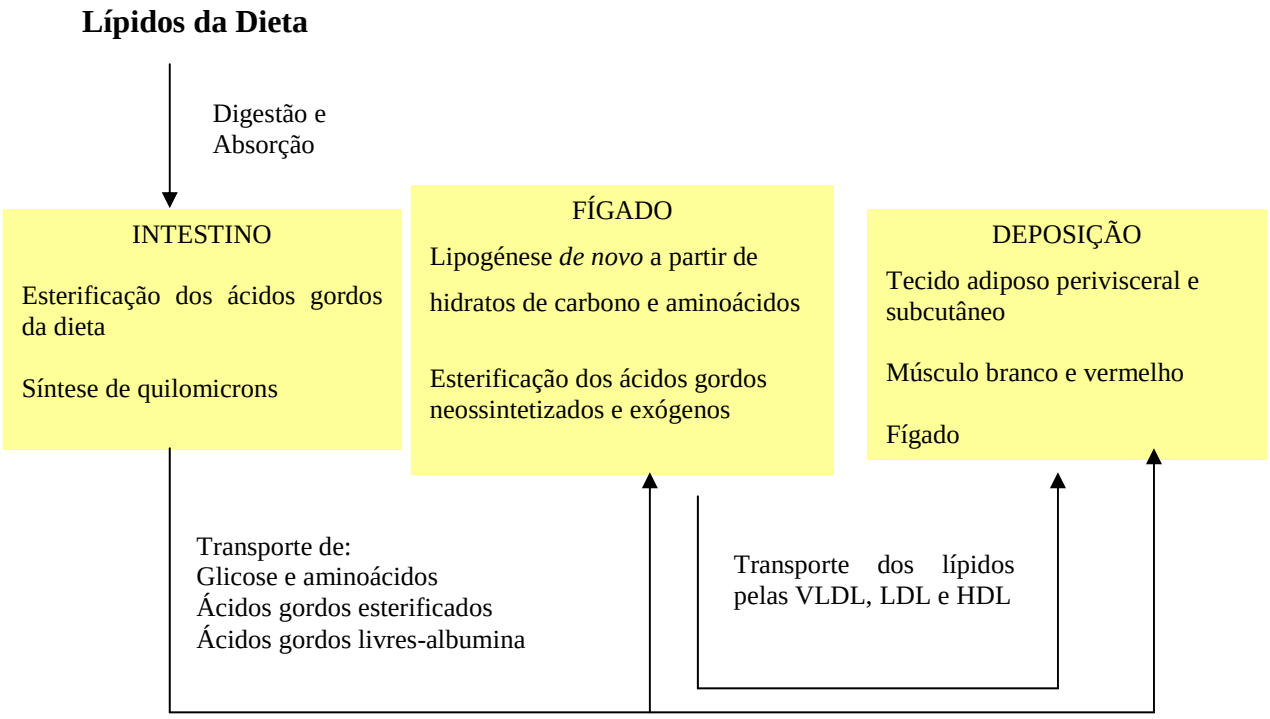

Figura 10 - Processos bioquímicos envolvidos na lipogénese (adaptado de Sheridan, 1988)

No músculo branco, os lípidos são armazenados em pequenas formações do tecido adiposo inseridas entre as fibras musculares, enquanto no músculo vermelho estão também armazenados no interior das próprias fibras (Santinha *et al.*, 1999). O teor lipídico dos peixes varia em função da idade e do estado fisiológico, aumentando geralmente ao longo do desenvolvimento ontogenético e com o tamanho dos animais.

Tal como acontece no Homem e na maioria das aves (Hillgartner *et al.*, 1995), nos peixes o fígado é, por excelência, o órgão da síntese *de novo* dos ácidos gordos (Likimani e Wilson, 1982; Henderson e Sargent, 1985; Sargent *et al.*, 2002). Nos animais, quando os hidratos de carbono, lípidos e proteínas fornecidos na dieta excedem as necessidades do organismo em energia, são transformados em gordura (Maynard *et al.*, 1979; Nelson e

Cox, 2000). Em situações de abundância de acetil-CoA (molécula constituída por 2 carbonos, precursora da síntese de ácidos gordos e produto resultante da sua oxidação), para além do fígado, também o tecido adiposo poderá sintetizar ácidos gordos *de novo*. Uma vez que esta síntese ocorre no citoplasma, torna-se necessário efectuar o transporte de acetil-CoA desde a mitocôndria, o que só é possível através de um mecanismo bioquímico designado por "lançadeira do grupo acetilo". Através deste mecanismo, o citrato formado na mitocôndria no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também designado por ciclo de Krebs, difunde-se para o citoplasma, por condensação da acetil-CoA com oxaloacetato. O citrato reage com a CoA existente no citoplasma, numa reacção catalisada pela ATP citrato-liase, formando-se acetil-CoA e oxaloacetato. A acetil-CoA pode então ser utilizada na síntese de ácidos gordos *de novo*, sendo o oxaloacetato reduzido a malato. No ciclo do malato-piruvato, pela acção da enzima málica (ME), o malato é descarboxilado a piruvato, formando-se fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH).

As vias metabólicas da síntese de ácidos gordos *de novo* nos mamíferos monogástricos envolvem a conversão de acetil-CoA proveniente da degradação dos hidratos de carbono, lípidos ou da desaminação dos aminoácidos, em ácido acil-CoA, através de uma série de carboxilações, condensações e reduções catalisadas pela acetil--CoA carboxilase (ACoAC) e pelo complexo sintetase dos ácidos gordos (FAS). Tal como acontece nos mamíferos, nos peixes todos os passos da síntese do ácido palmítico, produto final da biossíntese lipídica *de novo*, são catalisados pelo complexo FAS. Os ácidos gordos insaturados ou de cadeia mais longa são produzidos a partir do ácido palmítico, por acção de sistemas de elongases e dessaturases, como referido anteriormente (Nelson e Cox, 2000). Durante a síntese de ácidos gordos é necessário poder redutor para a formação de duplas ligações, sendo este fornecido pelo NADPH. Os equivalentes

redutores (NADPH) são cofactores essenciais na lipogénese, na medida em que são necessários à conversão de malonil-CoA a ácidos gordos de cadeia longa. A via das pentoses fosfato é uma alternativa à via glicolítica para a oxidação da glicose, formando-se NADPH para sínteses redutoras, como as que ocorrem na biossíntese de ácidos gordos, e ribose para a produção de nucleótidos e ácidos nucleicos. Esta via metabólica é constituída por duas fases (Nelson e Cox, 2000):

(1) A fase oxidante, na qual a glicose-6-fosfato (G6P - o substrato comum a todas as vias bioquímicas da glicose) sofre desidrogenação e descarboxilação, produzindo-se NADPH e ribulose-5-fosfato (Arnesen *et al*., 1993). A primeira reacção desta fase é catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; EC 1.1.149), requerendo-se $NADP^+$ como receptor de hidrogénio para a oxidação da G6P, e produzindo-se NADPH (Bautista *et al*., 1988);

(2) A fase não oxidante, em que a ribulose-5-fosfato pode ser convertida a ribose-5-fosfato ou voltar à via glicolítica como frutose-6-fosfato ou gliceraldeído-3-fosfato.

Uma fonte adicional de NADPH para a lipogénese pode ter ainda origem na conversão de citrato a α-cetoglutarato pela enzima isocitrato desidrogenase. A contribuição de cada um destes sistemas geradores de NADPH varia com a espécie, sendo no entanto a via das pentoses fosfato, seguida pelo ciclo malato-piruvato, as principais vias nos humanos e nos animais monogástricos (Iritani *et al*., 1984).

Nos peixes, os processos envolvidos na lipogénese são idênticos aos descritos nos mamíferos (Iritani *et al*., 1984). No entanto, nestes animais as enzimas envolvidas na produção de NADPH pouco ou nada foram estudadas (Cowey e Walton, 1989). Apesar disso, as várias enzimas envolvidas na lipogénese foram já identificadas nos peixes,

sabendo-se que a sua actividade específica é mais elevada no fígado do que no tecido adiposo do salmão (*Oncorhynchus kisutch*) (Lin e*t al*., 1977a,b), da truta arco-íris (Baldwin e Reed, 1976), da enguia americana (*Anguilla rostrata*) (Aster e Moon, 1981) e do peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Likimani e Wilson, 1982), sendo no entanto a sua importância individual ainda tema de debate (Dias *et al*., 1998).

Há muito que se conhece o efeito depressivo do aumento do teor lipídico das dietas sobre a síntese *de novo* dos ácidos gordos (Corraze, 2001; Sargent *et al*., 2002). O aumento do teor lipídico alimentar causou um efeito inibitório sobre as enzimas da lipogénese hepática, em várias espécies, como o salmão (Lin *et al*., 1977a), salmão Atlântico (*Salmo salar*) (Arnesen *et al*., 1993), seriola (*Seriola quinqueradiata*) (Shimeno *et al*., 1996), peixe-gato (*Ictalurus punctatus*) (Likimani e Wilson, 1982), carpa comum (Shimeno *et al*., 1995), truta arco-íris (Dias *et al*., 1999) truta marisca (*Salmo trutta*) (Regost *et al*., 2001b) e robalo (Bautista *et al*., 1988; Dias *et al*., 1998; 1999). Pelo contrário, Regost e colaboradores (2001a; 2003) não encontraram nenhuma alteração clara na actividade das enzimas da lipogénese em rodovalhos em resposta a diferentes fontes lipídicas.

Enquanto nos mamíferos dietas com um teor lipídico de apenas 2,5% podem causar uma inibição na lipogénese, nos peixes isto só se torna evidente quando o teor lipídico das dietas excede os 10% (Sargent *et al*., 2002). Como para a maioria das espécies, teores lipídicos de 10% não constituem dietas de elevado teor energético, pode considerar-se que apenas as dietas altamente energéticas têm capacidade de inibir a lipogénese nos peixes. Shimeno *et al*. (1995) observaram uma diminuição na actividade enzimática da lipogénese, gluconeogénese e degradação dos aminoácidos no hepatopâncreas de carpas alimentadas com 18% de gordura bruta em comparação com as carpas alimentadas com

apenas 9%. Em truta arco-íris, a lipogénese diminui com o aumento da relação lípidos/hidratos de carbono na dieta (Brauge *et al*., 1995). Sánchez-Muros *et al*. (1996) demonstraram, em truta arco-íris, que dietas com elevados teores lipídicos causam uma diminuição significativa na actividade específica, na eficiência catalítica e na velocidade máxima da enzima G6PD.

A diminuição da relação proteína digestível/energia digestível, através do aumento do teor lipídico, diminui igualmente a actividade de várias enzimas hepáticas na truta arco-íris e no robalo, como a FAS, a G6PD e a ME (Dias *et al*., 1999). Para além disto, a actividade destas enzimas é ainda inibida em resposta a um decréscimo da proteína alimentar, no fígado da seriola (Shimeno *et al*., 1996), da truta arco-íris (Barroso *et al*., 1994) e no hepatopâncreas de carpa (Kheyyali *et al*., 1989).

O facto das dietas para peixes serem ricas em PUFA, potentes inibidores da lipogénese nos mamíferos, vem reforçar a ideia da inibição da lipogénese em resposta a elevados teores lipídicos (Herzberg, 1991). De acordo com Shikata *et al*. (1994) teores elevados de EPA e DHA na dieta tendem a inibir a actividade das enzimas da lipogénese no hepatopâncreas da carpa comum. Mais recentemente, demonstrou-se *in vitro* que a inclusão de EPA e DHA nas dietas induz a redução da actividade das enzimas da lipogénese nos hepatócitos da truta arco-íris (Alvarez *et al*., 2000). Dietas ricas em PUFA estão também negativamente correlacionadas com a actividade enzimática da lipogénese no salmão Atlântico (Menoyo *et al*., 2003). Assim, a quantidade e, em particular, o tipo de ácidos gordos incorporados nas dietas para peixe parecem ser factores de extrema importância nos estudos a realizar sobre a actividade enzimática da lipogénese.

Além da composição nutricional das dietas, parece existir um período mínimo necessário à ocorrência das alterações enzimáticas. Segundo Lin *et al*. (1977b) são

necessárias cerca de três semanas para observar alguma alteração na actividade das enzimas da lipogénese em resposta ao regime alimentar. Walzem *et al*. (1991) descreveram ainda uma correlação linear positiva entre a actividade das enzimas da lipogénese e o crescimento do animal (enquanto ganho de massa corporal). No entanto, Barroso *et al*. (1999) observaram uma diminuição dessa mesma actividade, expressa por unidade celular, com o tamanho do peixe, indicando que, à medida que o peixe cresce a quantidade de NADPH disponível por célula é menor. A temperatura é também um importante factor descrito na regulação da actividade das enzimas da lipogénese que deve ser tido em consideração (Voss e Jankowsky, 1986; Corraze *et al*., 1999).

II - Parte Experimental

1 - INTRODUÇÃO

Como referido anteriormente, a indústria da aquicultura tem expandido na Europa durante as últimas décadas, mas apenas algumas espécies têm contribuído para esta expansão. O desenvolvimento da aquicultura no mediterrâneo deve-se essencialmente à produção de espécies como o robalo (*Dicentrachus labrax*), a dourada (*Sparus aurata*) e o rodovalho (*Psetta maxima*). Com as produções cada vez maiores destas espécies os preços por kg sofreram reduções levando à saturação do mercado. Há, portanto, a necessidade de encontrar novas espécies capazes de dinamizar este ramo da indústria e satisfazer as necessidades do consumidor.

O linguado (*Solea senegalensis*) parece ser um candidato à altura deste desafio, principalmente devido ao seu elevado preço e procura nos mercados. Até à data, foram alcançados avanços significativos no que diz respeito a técnicas de maneio de larvas e sua alimentação (Dinis *et al.*, 1999; Imsland *et al.*, 2003; Engrola *et al.*, 2005; 2007; Conceição *et al.*, 2007). Todavia, pouco se sabe acerca dos requisitos nutricionais desta espécie durante a fase juvenil (Dias *et al.*, 2004; Rema *et al.*, 2007). O requisito proteico bruto foi estimado em cerca de 600g/kg de dieta (Rema *et al.*, 2007), mas nada se sabe acerca do teor óptimo de lípidos.

Na aquicultura, as dietas são formuladas com teores optimizados de gordura para que esta seja usada, preferencialmente, como fonte energética, em vez da fracção proteica. Com isto, para além de uma redução dos custos nas dietas, pretende-se aumentar o crescimento, reduzindo a quantidade de proteína utilizada em energia, o chamado *protein sparing*, e reduzir a matéria orgânica e as perdas de azoto para o meio ambiente (Lee, 1973; Cho *et al.*, 1994; Hillestad e Johnsen, 1994; Kaushik, 1998; Company *et al.*, 1999).

Contudo, esta temática, no que diz respeito a peixes planos, ainda não foi muito estudada e as publicações existentes contêm informações contraditórias.

Em solha (*Pleuronectes platessa*), os lípidos promovem o crescimento e a utilização de proteína (Cowey *et al.*, 1975). O mesmo parece não acontecer em halabote (*Hipoglossus hipoglossus*) (Berge e Storebaken, 1991; Aksnes *et al.*, 1996; Grisdale--Helland e Helland, 1998; Hamre *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2007) e linguado (*Solea senegalensis*) (Dias *et al.*, 2004). Por sua vez, em rodovalho observa-se uma diminuição da taxa de crescimento com o aumento do teor de lípidos da dieta (Cacerez-Martinez *et al.*, 1984; Regost *et al.*, 2001).

A quantidade, qualidade e localização dos lípidos corporais varia muito entre espécies e dependem, essencialmente, das dietas. Em salmonídeos, a deposição lipídica ocorre principalmente nas vísceras e, numa menor extensão, no músculo (Corraze, 2001). Por sua vez, em peixes planos como o rodovalho, as partes marginais do corpo e a pele são os principais locais de deposição de gordura (Andersen e Alsted 1993; Regost *et al.*, 2001). A incorporação de lípidos na dieta pode promover a melhor utilização da proteína mas é preciso avaliar até que ponto a qualidade final do produto não é afectada, principalmente devido ao aumento da gordura da carcaça.

O objectivo deste trabalho foi determinar o teor lipídico óptimo em dietas para juvenis de linguado (*Solea senegalensis*). Desta forma pretende-se promover a melhor utilização da proteína através do estudo da fracção lipídica, sem comprometer a qualidade final do produto. Para tal, foram avaliados os efeitos da incorporação de diferentes teores de lípidos na dieta (4, 8, 12, 16 e 20%) no crescimento, composição corporal, retenção dos nutrientes e energia, deposição de gordura nos tecidos e no perfil de ácidos gordos do músculo, durante um período de alimentação de 16 semanas.

2 - BIOLOGIA DA ESPÉCIE

O linguado do Senegal, *Solea senegalensis*, é uma espécie comum no Mediterrâneo e na costa Portuguesa, contudo pode ser encontrado desde o golfo da biscaia até à costa do Senegal (Figura 11). Existe uma espécie muito idêntica, *Solea solea*, sendo por isso muito difícil distinguir estas duas espécies. Uma das características que mais facilmente se observa, para conseguir distinguir estas duas espécies, é a mancha escura na parte posterior da barbatana peitoral que caracteriza a *Solea solea*.

Figura 11– Distribuição espacial do *Solea Senegalensis (adaptado de www.fishbase.org)*

Estas duas espécie não são migratórias, podendo ser consideradas especies sedentárias, apesar de se observar uma distribuição espacial diferente entre juvenis e adultos (Rijndsorp *et al.*, 1992). Este fenómeno pode ser parcialmente explicado por uma alteração na temperatura óptima para os adultos, que parecem ser menos sensíveis à temperatura, tal como acontece para a maioria das espécies de peixes planos (Imsland *et al.*, 1993). Uma outra explicação pode residir na procura de locais onde o risco de predação é mais pequeno e a alimentação mais adequada.

O linguado (*Solea senegalensis*) é uma espécie gonocórica que atinge a maturidade sexual aos três anos de idade, quando atinge cerca de 32cm, coincidindo com o decréscimo da taxa de crescimento, como para a maioria das espécies aquáticas. Contudo, as populações existentes demonstram um crescimento máximo assimptótico, indicando que estes exemplares possam atingir tamanhos superiores nas regiões mais a sul.

Esta espécie é predominantemente litoral e bentónica, preferindo os fundos arenosos ou lamacentos da zona costeira, até aos 100m de profundidade, ou então os estuários. Como é um ser bentónico de pouca profundidade, a sua dieta é à base de poliquetas, larvas de bivalves e de pequenos crustáceos. A época de reprodução desta espécie começa na primavera e acaba com o início do verão (de Março a meados de Junho), resultando ovos que variam entre 0,99 a 1,02mm (Dinis *et al.*, 1999).

3 - MATERIAL e MÉTODOS

3.1 - DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram formuladas cinco dietas experimentais isoproteicas (Tabela II) de forma a apresentarem teores crescentes de lípidos (4, 8, 12, 16 e 20%).

Tabela II – Ingredientes e composição aproximada das dietas com diferentes teores lipídicos (4, 8, 12, 16 e 20 %)

	Tratamentos (% de lípidos)				
	L4	L8	L12	L16	L20
Ingredientes (%)					
Farinha de peixel LT	37	37	37	37	37
CPSP[1]	1	2	3,5	3,5	3,5
Farinha de lula	5	5	5	5	5
Farinha de soja 48	16	16	14	13,3	9,5
Glutén de milho	12,5	12,5	12	12	9
Farinha de trigo	23	18	14,5	10	8
Glutén de trigo	3	3	3,5	4,5	9
Gelatina	2	2	2	2	2
Óleo de peixe	0	4	8	12,2	16,5
Cloreto de colina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Lutavit C35	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Lutavit E50	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vit[2] e Min[3] Mix	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Betaína	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
Composição					
Matéria seca (%)	91,3	91,7	92,2	92,44	92,61
Cinzas (% matéria seca)	8,48	8,44	8,3	7,85	7,82
Proteína bruta (% matéria seca)	57,02	56,06	56,82	57,52	56,06
Gordura bruta (% matéria seca)	4,07	8,4	13,67	17,35	22,5
Energia bruta (kJ g-1 matéria seca)	20,56	21,78	22,87	23,81	24,58

[1] CPSP – Concentrado proteico solúvel de peixe
[2] Vit (mg ou IU/kg dieta): vitamina A, 8000 IU; vitamina D3, 1700 IU; vitamina K3, 10 mg; vitamina B12, 0,02 mg; vitamina B1, 8mg; vitamina B2, 20mg; vitamina B6, 10mg; ácido fólico, 6mg; biotina, 0,7mg; inositol, 300mg; ácido nicotínico, 70mg; ácido pantoténico, 30mg; vitamina E (Lutavit E50), 300mg; vitamina C (Lutavit C35), 500mg; betaína (Betafin S1), 500mg.
[3] Min (g or mg/kg dieta): Mn (óxido de manganês), 20mg; I (iodeto de potássio), 1,5mg; Cu (sulfato de cobre), 5mg; Co (sulfato de cobalto), 0,1mg; Mg (sulfato de magnésio), 500mg; Zn (óxido de zinco) 30mg; Se (selenite de sódio) 0,3mg; Fe (sulfato de ferro), 60mg; Ca (carbonato de cálcio), 2,15g; fosfato de cálcio dibásico, 5g; KCl (cloreto de potássio), 1g; NaCl (cloreto de sódio), 0,4g.

O teor proteico foi obtido usando uma mistura variável de farinha de soja, glúten de trigo e de milho, enquanto o teor de lípidos foi obtido através da inclusão de óleo de peixe. A composição aproximada e os ingredientes da dieta estão apresentados na Tabela

II. Os ingredientes foram moídos e misturados para se obter a composição pretendida. De seguida foram granulados, usando uma máquina de granulação experimental (CPM, modelo C-300), com um diâmetro de 2mm. Os grânulos foram secos a 37ºC durante 24h e refrigerados (≈ 4ºC) até ao início da experiência.

3.2 - ENSAIO DE CRESCIMENTO

O ensaio experimental foi acompanhado por cientistas treinados (recomendações FELASA categoria C) e foi conduzido de acordo com a Directiva de bem-estar animal da União Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC).

Figura 12 – Tanques e alimentadores do circuito fechado onde foi realizado o ensaio (CIIMAR, Porto)

O ensaio foi efectuado nas instalações do CIIMAR, Porto (Figura 12), com juvenis de linguado (*Solea senegalensis*) fornecidos por uma aquicultura do norte da Galiza (Alrogal, Corunha, Espanha). Após chegada, os peixes foram aclimatados às novas infra-estruturas durante duas semanas.

Para cada tratamento, grupos em triplicado de 20 peixes (peso médio inicial = 9,9±1,8g), foram distribuídos por 15 tanques de fibra de vidro (50*35cm; densidade inicial de 1kg/m^2) com água salgada aquecida (20±1ºC), fornecida a um caudal de 2l/min. Os parâmetros físico-químicos (temperatura, O_2 dissolvido, salinidade, pH e compostos azotados) foram mantidos dentro dos limites recomendados para espécies marinhas. O fotoperíodo a que os animais foram sujeitos foi de 12h/luz. Durante um período de 16 semanas (112 dias) a dieta foi distribuída 24h/dia, recorrendo-se a alimentadores automáticos. A quantidade de dieta fornecida era ajustada todos os dias, tendo em conta a quantidade de alimento não ingerida presente nos tanques. No fim da experiência registaram-se os pesos individuais.

No início da experiência, um *pool* de 10 peixes do *stock* inicial foram amostrados e conservados a -20ºC para posterior análise da composição corporal. No fim da experiência, quatro peixes por tanque foram amostrados para o mesmo propósito.

Adicionalmente, a três peixes por tanque foram removidos fígado, vísceras, músculo dorsal e pele e os tecidos congelados imediatamente em azoto líquido. O peso do fígado e das vísceras foram registados para determinação do índice hepatossomático e viscerossomático. De seguida, todos os tecidos foram armazenados a -80ºC até se proceder à determinação dos lípidos totais.

3.3 - ANÁLISES QUÍMICAS

As amostras de alimento e os peixes inteiros (não eviscerados) foram triturados numa picadora. Os quatro animais de cada tanque, retirados no fim da experiência, foram triturados conjuntamente, constituindo uma única amostra. O teor de humidade e cinzas foram determinados.

Com o grupo inicial efectuou-se o mesmo protocolo e as amostras foram, então, liofilizadas para posterior análise. Com o liofilizado, procedeu-se à avaliação nutricional (humidade, cinzas, proteína bruta, gordura bruta e valor calórico).

Todas as amostras foram analisadas no final da experiência, a fim de uniformizar as condições de análise, em duplicado, segundo a metodologia analítica de referência (AOAC, 2000):

Matéria seca: determinada após secagem em estufa a 105ºC, durante 24h. (Anexo I).

Cinzas totais: obtida após incineração em mufla, a 550ºC, durante 5h (AOAC – 942.05).

Proteína bruta: obtida por determinação do teor em azoto pelo método de Kjeldahl, com um aparelho microKjedahl (Gerhardt) e usando o valor de 6,25 como factor de conversão proteico (AOAC – 2001.11).

Gordura bruta: determinada por extracção com éter de petróleo, segundo adaptação do método de Sohxlet, num aparelho de extracção automática (Soxtherm-Gerhardt) (AOAC – 2003.05).

Energia bruta: determinada por combustão completa em bomba calorimétrica (IKA C2000) (Anexo II).

Para além da composição aproximada das carcaças dos peixes sujeitos aos diferentes tratamentos, foram analisados individualmente fígado, vísceras, pele dorsal e músculo dorsal para determinação do teor de lípidos totais (n = 9).

Os lípidos totais foram determinados segundo o método de Folch (Folch *et al*., 1957). O método baseia-se na extracção dos lípidos totais pelo uso de solventes orgânicos. Após a

extracção de lípidos, no músculo, prepararam-se os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), por metilação ácida (Santha e Ackman, 1990). Os FAME foram analisados num cromatógrafo gasoso (*Crompack CP - 9001*), equipado com um injector automático e com um detector de ionização de chama (FID) mantidos a 250ºC e a 270ºC, respectivamente. A separação foi conseguida com uma coluna capilar (*Varian WCOT*) de sílica fundida, com 50m×0,25mm×0,2µm, usando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,3ml/min. A temperatura do forno foi de 140ºC durante 11min, aumentada 5ºC/min até 220ºC, mantendo-se nesta temperatura durante 15min. Os ésteres de ácidos gordos foram identificados usando misturas conhecidas (Supelco, FAME 37 e PUFA 3) e a informação analisada com o software CP-Maitre (versão 2.5).

3.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado recorrendo aos métodos descritos por Zar (1999). Todos os dados foram testados para homogeneidade de variância, utilizando o teste de Leven e depois submetidos a uma ANOVA a um factor, usando o software SPSS (versão 15.0). Quando a probabilidade do teste de homogeneidade de variância era inferior a 0,05, foi efectuado o teste não paramétrico equivalente à ANOVA a um factor (Kruskal-Wallis). Quando estes testes exibiam $p \leq 0,05$ as médias individuais eram comparadas usando o teste de Tukey (Anova a 1 factor) ou o teste de Mann-Whitney (Kruskal-Wallis).

4 - RESULTADOS

No final da experiência (112 dias), em média, todos os peixes dos cinco tratamentos (L4, L8, L12, L16 e L20) triplicaram de peso. Os diferentes parâmetros de crescimento analisados nos juvenis de linguado, alimentados com as diferentes dietas experimentais, podem ser observados na Tabela III. Os peixes alimentados com dietas mais ricas em lípidos elevados (L12, L16 e L20) atingiram um peso final significativamente ($p \leq 0,05$) mais baixo (29-33g), quando comparados com os resultados obtidos com dietas com baixos teores lipídicos (L4 e L8). A taxa de crescimento diária variou entre 0,8 e 1,2 e foi significativamente afectada pelos teores de lípidos das dietas. Os peixes alimentados com as dietas mais ricas em lípidos exibiram taxas de crescimento mais baixas.

Os valores de conversão alimentar variaram entre 1,0 (L4) e 2,2 (L20). Os peixes alimentados com as dietas L4 e L8 apresentaram os melhores resultados e os peixes alimentados com a dieta L20 apresentaram a pior conversão alimentar de todo o ensaio.

Os valores observados para a eficiência proteica foram, em geral, elevados (acima de 1), apesar das diferenças significativas entre tratamentos, excepto para os peixes alimentados com a dieta L20, que exibiram uma eficiência proteica relativamente baixa (0,83). A ingestão de matéria seca variou significativamente ($p \leq 0,05$), aumentando com o teor de lípidos das dietas. Devido a este aumento, a ingestão dos restantes nutrientes apresentou a mesma tendência.

Tabela III – Efeito da incorporação de diferentes teores lipídicos no crescimento e consumo, após 112 dias, em linguado (média e desvio padrão (n=3))

	Tratamentos									
	L4		L8		L12		L16		L20	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Crescimento										
Peso médio inicial (g)	9,89	0,01	9,96	0,06	9,97	0,02	9,91	0,03	9,92	0,06
Peso médio final (g)	43,66	6,54 [a]	42,53	1,51 [a]	33,02	0,56 [b]	32,57	2,61 [b]	28,54	2,56 [b]
Taxa de crescimento diária[1]	1,22	0,16 [a]	1,20	0,03 [a]	0,94	0,02 [b]	0,93	0,07 [b]	0,81	0,08 [b]
Taxa de conversão alimentar[2]	1,04	0,05 [c]	1,15	0,03 [c]	1,66	0,09 [b]	1,68	0,06 [b]	2,16	0,18 [a]
Eficiência proteica[3]	1,70	0,08 [a]	1,56	0,04 [a]	1,06	0,06 [b]	1,04	0,04 [b]	0,83	0,07 [c]
Consumo (g or kj/kg peso médio/dia)[4]										
Matéria seca	11,58	0,30 [c]	12,70	0,42 [c]	15,86	1,06 [b]	15,96	0,43 [b]	18,53	0,64 [a]
Proteína	6,61	0,17 [c]	7,12	0,24 [c]	9,01	0,60 [b]	9,18	0,25 [b]	10,39	0,36 [a]
Lípidos	0,47	0,01 [e]	1,07	0,04 [d]	2,17	0,14 [c]	2,77	0,07 [b]	4,17	0,14 [a]
Energia (kJ)	2,38	0,06 [c]	2,77	0,09 [c]	3,63	0,24 [b]	3,80	0,10 [b]	4,55	0,16 [a]

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$)
[1]Taxa de crescimento diária = 100 x ((peso final)$^{1/3}$ - (peso inicial)$^{1/3}$)/ dias
[2]Taxa de conversão alimentar = consumo bruto na material seca / ganho de peso
[3]Eficiência proteica = ganho de peso / proteína bruta ingerida
[4]Consumo = consumo de nutriente / peso corporal médio (ABW = peso corporal inicial+peso corporal final)/2/dias

No final da experiência, não foram observadas diferenças significativas no teor de matéria seca, cinzas e energia dos juvenis de linguado alimentados com as diferentes dietas (Tabela IV). Contudo, nos peixes alimentados com as dietas L16 e L20 o teor proteico da carcaça foi significativamente inferior ($p \leq 0,05$) ao dos peixes alimentados com a dieta L8. Quanto ao teor de lípidos, este foi significativamente superior ao dos peixes alimentados com a dieta L4.

Tabela IV – Composição corporal (% ou kj/g em peso fresco), retenção (% do consumo) e ganho (g/kg/dia) nutricional de linguado alimentado com dietas com diferentes teores lipídicos durante 112 dias (média e desvio padrão (n=3))

	Tratamentos									
	L4		L8		L12		L16		L20	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Composição corporal (%PF)										
Humidade	76,43	0,8	75,07	1,28	76,25	0,63	76,56	0,66	75,65	0,27
Cinzas	1,79	0,19	1,73	0,27	1,89	0,41	1,63	0,16	1,59	0,08
Proteína	17,69	0,35 ^{ab}	18,24	1,04 ^{a}	16,93	0,47 ^{ab}	15,98	0,54 ^{b}	16,18	0,42 ^{b}
Lípidos	3,72	0,22 ^{b}	5,02	0,44 ^{ab}	5,14	0,1 ^{ab}	5,69	0,84 ^{a}	5,84	0,66 ^{a}
Energia (kj)	5,61	0,13	6,17	0,33	5,82	0,03	5,85	0,38	5,98	0,11
Retenção (% consumo)[1]										
Matéria seca	22,57	0,12 ^{a}	21,92	1,36 ^{a}	14,19	0,21 ^{b}	13,71	0,63 ^{b}	11,34	1,12 ^{b}
Proteína	30,23	0,61 ^{a}	28,89	2,07 ^{a}	17,87	0,25 ^{b}	15,97	0,42 ^{bc}	12,99	1,63 ^{c}
Lípidos	82,47	1,84 ^{a}	53,57	4,67 ^{b}	23,9	1,95 ^{c}	21,24	4,19 ^{c}	13,47	1,8 ^{c}
Energia (kj)	26,14	0,5 ^{a}	25,14	1,43 ^{a}	15,39	0,72 ^{b}	14,65	1,32 ^{bc}	11,5	1,04 ^{c}
Ganho (g/kg ABW/dia)[2]										
Matéria seca	2,61	0,08 ^{ab}	2,78	0,16 ^{a}	2,25	0,12 ^{bc}	2,19	0,16 ^{bc}	2,1	0,18 ^{c}
Proteína	2	0,09 ^{a}	2,06	0,13 ^{a}	1,61	0,08 ^{b}	1,47	0,07 ^{b}	1,35	0,15 ^{b}
Lípidos	0,39	0	0,57	0,07	0,52	0,01	0,59	0,13	0,56	0,09
Energia (kj)	0,62	0,03 ^{ab}	0,7	0,05 ^{a}	0,56	0,01 ^{ab}	0,56	0,06 ^{ab}	0,52	0,05 ^{b}

A composição corporal inicial foi: Humidade = 75,65, Cinzas = 2.49; Proteína = 17,22; Lípidos = 4,53; Energia = 5,81
Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$)
[1]Retenção = 100 x (Peso final x teor de nutriente na carcaça final – peso inicial x teor de nutriente na carcaça inicial) / nutriente consumido
[2]Ganho = (nutriente na carcaça final - nutriente na carcaça inicial)/peso médio(ABW = peso corporal inicial+peso corporal final)/dias

A retenção dos nutrientes e da energia foi igualmente afectada pelo aumento do teor de lípidos na dieta. Os peixes alimentados com as dietas de baixo teor lipídico (L4 e L8) exibiram uma retenção proteica, energética e lipídica superior à dos alimentados com as

dietas de alto teor lipídico. A mesma tendência foi observada para o ganho de nutrientes, excepto para o ganho lipídico onde não se observaram diferenças.

O índice hepatossomático apresenta ligeiras diferenças entre tratamentos, contudo, tendo em conta que não houve diferenças significativas entre os peixes alimentados com as dietas L4 e L20, estas diferenças parecem não ser causadas pelo teor lipídico das dietas. No entanto, o índice viscerossomático foi nitidamente afectado pelo teor lipídico das dietas, com as dietas L16 (3,6%) e L20 (3,04%) a apresentarem os valores mais elevados (Tabela V).

Tabela V – Índices somáticos (%), lípidos totais dos tecidos em peso fresco (%PF) e classes de ácidos gordos no músculo (g/100g ácido gordo) de linguado alimentado com dietas com diferentes teores lipídicos durante 112 dias (média e desvio padrão (n=6, excepto para os indices somáticos onde n=9))

	Tratamentos									
	L4		L8		L12		L16		L20	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
IHS[1]	0,83	0,22 ^{ab}	0,73	0,16 ^{b}	0,73	0,10 ^{b}	1,00	0,29 ^{a}	0,86	0,12 ^{ab}
IVS[2]	1,98	0,41 ^{b}	2,11	0,31 ^{b}	2,1	0,31 ^{b}	3,60	1,41 ^{a}	3,04	0,39 ^{a}
Fígado										
Lípidos totais	9,38	2,14	8,81	0,98	8,02	1,98	10,10	1,81	9,09	1,26
Visceras										
Lípidos totais	3,33	0,39 ^{b}	3,17	0,17 ^{b}	3,96	0,78 ^{ab}	6,07	1,35 ^{a}	7,68	1,02 ^{a}
Pele dorsal										
Lípidos totais	1,72	0,21 ^{b}	2,16	0,26 ^{ab}	2,15	0,39 ^{ab}	2,33	0,41 ^{a}	2,24	0,18 ^{a}
Músculo										
Lípidos totais	2,06	0,50	2,74	1,24	3,05	1,38	2,20	0,63	2,35	0,54
ΣSFA	26,09	0,76 ^{a}	23,82	1,78 ^{b}	23,53	0,42 ^{b}	24,13	0,71 ^{b}	23,14	0,95 ^{b}
Σ MUFA	22,17	2,63 ^{b}	26,57	2,94 ^{a}	29,37	2,81 ^{a}	26,93	1,48 ^{a}	27,67	1,65 ^{a}
ΣPUFA	41,39	1,58	38,97	2,47	38,62	1,81	39,30	1,04	39,58	0,96
Σn-3	25,66	1,84 ^{b}	26,01	2,02 ^{b}	26,08	2,11 ^{b}	28,14	1,52 ^{ab}	29,31	1,39 ^{a}
DHA/EPA	4,60	0,73	4,22	0,82	3,52	0,61	4,54	0,56	4,23	0,54
EPA/ARA	4,10	1,33	4,08	0,68	5,67	1,29	3,78	0,69	4,31	1,37

Diferentes letras correspondem a diferenças significativas entre tratamentos ($p \leq 0,05$)
[1] IHS, Índice hepatossomático = 100 x (peso do fígado/peso corporal), %
[2] IVS, Índice viscerossomático= 100 x (peso da víscera/peso corporal), %
ΣSFA = Soma de ácidos gordos saturados (C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0 e C24:0)
ΣMUFA = Soma de ácidos gordos monoinsaturados (C16:1, C18:1, C20:1 e C22:1)
ΣPUFA = Soma de ácidos gordos polinsaturados (C18:2n-6, C18:3n-6, C18:3n-3, C20:2n-6, C20:3n-3, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:4n-6, C22:5n-3 e C22:6n-3)
Σn-3 = Soma de ácidos gordos da série n-3 (C18:3n-3, C20:3n-3, C20:5n-3, C22:5n-3 e C22:6n-3)

Os teores lipídicos do fígado, vísceras, pele e músculo de linguado juvenil são apresentado na Tabela V. O teor lipídico da dieta afectou significativamente o teor de lípidos das vísceras e da pele, mas não do músculo ou do fígado. O teor lipídico das vísceras variou entre 3,3 e 7,7% (expresso em peso fresco), enquanto que o da pele variou entre 1,7 e 2,3% do peso fresco. Nos peixes alimentados com as dietas L16 e L20 observaram-se teores lipídicos superiores das vísceras e da pele, quando comparados com os peixes alimentados com a dieta L4. Apesar de entre os tratamentos restantes por vezes não serem detectadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) para estes dois parâmetros, a tendência para o aumento do teor de lípidos nestes tecidos quando se aumenta o teor lipídico da dieta é evidente. Apesar de não serem detectadas diferenças no teor de lípidos do músculo, observaram-se diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na percentagem de ácidos gordos saturados. Os peixes alimentados com a dieta L4 continham mais SFA que os peixes alimentados com as dietas restantes (26% vs 23-24%). Nos MUFA observou-se o oposto, sendo neste caso detectado o valor mais alto nos peixes alimentados com a dieta L12. Os peixes alimentados com L4 apresentaram o teor mais elevado em PUFA (41%) enquanto quando alimentados com as dietas L16 e L20 apresentaram valores mais baixos (39%). Contrariamente, os teores de ácidos gordos n-3 são inferiores em L4 (26%), quando comparados com os peixes alimentados com a dieta L20 (29%). Os peixes alimentados com a dieta L4 apresentaram os valores mais elevados da relação DHA/EPA (4,6%). Contudo, tanto para os PUFA como para o índice DHA/EPA e EPA/ARA não se observaram diferenças significativas entre tratamentos.

5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No final do ensaio, o peso médio final dos linguados triplicou em todos os tratamentos. A incorporação de teores de gordura superiores a 8% na dieta parece prejudicar o crescimento. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores em pregado, em que o aumento do teor de lípidos na dieta provocou uma redução do crescimento, quer em juvenis (Cacerez-Martinez *et al.*, 1984) quer em peixes de tamanho comercial (Regost *et al.*, 2001b). Uma redução do crescimento foi também observada em halabote quando os peixes eram alimentados com uma dieta com um teor lipídico de 30% e pobre em hidratos de carbono (Hamre *et al.*, 2003). Contudo, o aumento do teor lipídico de 10 até 21% não afectou o crescimento do linguado em trabalhos anteriores (Dias *et al.*, 2004), nem o crescimento de halabote de diferentes tamanhos com dietas com um teor lipídico entre 8 e 28% (Berge *et al.*, 1990; Asknes *et al.*, 1996; Grisdale-Helland e Helland, 1998; Helland e Grisdale-Helland, 1998; Martins *et al.*, 2008). Em oposição aos salmonídeos, ou a outras espécies de peixes marinhos onde a proteína da dieta pode ser direccionada para crescimento (Lee e Putnam, 1973; Hillestead *et al.*, 1994; Dias *et al.*, 1998; Company *et al.*, 1999), o aumento do teor de lípidos da dieta no linguado parece não ter benefício.

Os valores elevados de ingestão (12-19g/kg de peso médio/dia) e baixos de conversão alimentar (1-2) reflectem a boa aceitação das dietas. Apesar de Dias *et al.* (2004) apresentarem valores similares de crescimento para peixes desta espécie alimentados com 11 ou 21% de lípidos na dieta, os valores de conversão alimentar no presente ensaio foram substancialmente melhores. Este facto pode dever-se ao melhoramento efectuado no protocolo de alimentação. No habitat natural, o linguado mantém-se enterrado na areia, inactivo, durante o período diurno, saindo à noite para se

alimentar (Kruuk, 1963). Logo, em vez de se alimentar os peixes 18h por dia como adoptado por Dias *et al.* (1998), neste ensaio os peixes foram alimentados 24h por dia, dividindo a quantidade diária em cerca de 8 rações.

No presente ensaio, o teor de lípidos da dieta afectou a ingestão e utilização dos nutrientes. As dietas com o teor lipídico mais baixo foram as mais eficientes na utilização dos nutrientes, como demonstrado pela baixa taxa de conversão alimentar, ingestão de nutrientes e alta eficiência proteica. Tendo em conta o referido, pode afirmar-se que o aumento da energia não proteica na dieta, para os teores de proteína e lípidos ensaiados, teve um efeito negativo na utilização dos nutrientes em linguado (*Solea senegalensis*).

O linguado é considerado um peixe magro, com um teor de gordura baixo. Neste ensaio o teor de gordura corporal variou entre 4 e 6%, com o tratamento L4 a apresentar valores mais baixos que os tratamentos L16 e L20. Em rodovalho o teor de gordura das dietas afectou, igualmente, o teor de gordura corporal, com este último a aumentar com os lípidos da dieta (10 a 25% de lípidos) (Regost *et al.*, 2001b). Dias *et al.* (2004) também observaram este efeito em linguado alimentado com dietas com um alto teor de gordura (10 vs 21%), contudo apenas nas dietas com um baixo teor de hidratos de carbono digestíveis. O aumento de gordura corporal devido à ingestão de dietas com elevados teores lipídicos é uma observação bastante comum em salmonídeos, ou noutras espécies marinhas como dourada (Vergara *et al.*, 1999), robalo (Peres *et al.*, 1999) ou halabote (Martins *et al.,* 2008). Contudo, todas estas espécies apresentam um teor superior de gordura das carcaças quando comparadas com o linguado. O aumento do teor de lípidos das dietas resultou num decréscimo da retenção lipídica, mas em nenhuma alteração significativa no ganho lipídico. Por outro lado, tanto o ganho como a retenção proteica foram melhorados com o decréscimo do teor de lípidos das dietas. Em contraste, Dias *et*

al. (2004) observaram que, esta mesma espécie, quando alimentada com uma dieta com 20% de lípidos obtinha um ganho proteico similar aos exemplares alimentados com uma dieta com 10% de lípidos. Contudo, os peixes alimentados com a dieta mais rica em lípidos apresentavam um ganho lipídico superior. Igualmente, em outras espécies de peixes planos como o rodovalho (Regost *et al.*, 2001b) e o halabote (Martins *et al.*, 2007) o aumento do teor lipídico das dietas não parece melhorar a utilização da proteína. Todavia, noutros estudos em halabote observou-se um efeito de poupança de proteína quando se aumentava o teor de lípidos da dieta. É necessário referir que as dietas não eram isoproteicas (Asknes *et al.*, 1996; Helland *et al.*, 1998). Em espécies como o salmão (Hillestead e Johansen, 1994), truta (Lee e Putnam, 1973), dourada (Santinha *et al.*, 1999) e robalo (Dias *et al.*, 1998) a retenção proteica pode ser melhorada com a substituição da proteína alimentar por lípidos. Contudo, em peixes planos esta temática parece controversa. Em linguado, um intervalo de teores lipídicos de 4 a 20% nunca tinha sido testado. Os resultados obtidos sugerem uma fraca utilização dos lípidos, mas, para se afirmar categoricamente tal, são necessários mais ensaios. O coeficiente de digestibilidade aparente poderia ser uma ferramenta útil para clarificar o porquê destas observações. Já foram efectuadas diversas tentativas no sentido de obter esta informação. No entanto, nenhum dos métodos utilizados até à data (decantação ou "*stripping*") tiveram sucesso, devido essencialmente à morfologia do tubo digestivo e às propriedades físicas das fezes. A remoção do tubo digestivo e posterior recolha de fezes parece ser a única hipótese viável, contudo será preciso um grande número de exemplares. Será importante frisar que o *protein sparing* poderá não ter ocorrido devido ao elevado teor de proteína nas dietas experimentais. Dias *et al.* (1998), em robalo, observaram que um aumento no teor lipídico da dieta de 10 para 18% apenas era benéfico, para a utilização proteica, quando os peixes eram alimentados com baixos teores proteicos (40%). Estes resultados sugerem que,

futuramente, será necessário optimizar a razão proteína/lípidos da dieta ao metabolismo do linguado.

O teor lipídico, em peso fresco, do fígado variou entre 8 e 10%, não sendo afectado pelo teor lipídico da dieta. No total, os lípidos do fígado contribuíram com cerca de 0,1% para o peso final e com 1,7% do teor lipídico do linguado. Dias *et al*. (2004) obtiveram valores superiores nesta espécie, bem como outros autores noutras espécies de peixes planos como o rodovalho (Regost *et al.*, 2001b) e o halabote (Martins *et al.*, 2007). Adicionalmente, Dias *et al.* (2004) verificaram que a actividade de algumas enzimas hepáticas, responsáveis pela lipogénese, era diminuída pelos teores elevados de lípidos da dieta. No entanto, em rodovalho (Regost *et al.*, 2001b) nenhuma alteração significativa da actividade enzimática foi detectada quando os peixes eram alimentados com dietas altamente energéticas.

No presente estudo, detectaram-se diferenças significativas no índice hepatossomático, mas sem uma clara associação com o teor de lípidos da dieta. Tal afirmação deve-se ao facto de os tratamentos L4 e L20 terem sido estatisticamente idênticos. Os valores aqui apresentados estão de acordo com os encontrados por Dias *et al.* (2004) em linguado, mas mais baixos que os encontrados noutros peixes planos como rodovalho (Regost *et al.*, 2001b), halabote (Aknes *et al.*, 1996; Helland *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2007) ou noutros peixes marinhos como o robalo (Dias *et al.*, 1998) e a dourada (Santinha *et al.*, 1999).

Tanto o índice viscerossomático como os lípidos totais das vísceras aumentaram com os lípidos da dieta, contudo os valores encontrados são mais baixos do que os referidos para outras espécies, incluindo peixes planos (Oliva-Teles *et al.*, 1994; Santinha *et al.*, 1999; Regost *et al.*, 2001b; Dias *et al.*, 2004). O teor lipídico das vísceras representa

cerca de 0,1-0,2% do peso corporal e 4% dos lípidos da carcaça. Apesar dos valores mais altos encontrados nas outras espécies, é evidente que o teor de gordura da dieta aumenta a deposição de gordura nas vísceras, uma vez que os peixes alimentados com a dieta L16 e L20 exibiam valores mais elevados que os peixes alimentados com as outras dietas. Resultados semelhantes foram obtidos por Aknes *et al.* (1996), contudo, valores mais baixos foram descritos em trabalhos anteriores nesta mesma espécie. Adicionalmente, estes autores também não encontraram nenhuma relação entre o índice viscerossomático e o teor de lípidos da dieta. Neste ensaio, os lípidos totais das vísceras diminuíram quando os peixes eram alimentados com dietas pobres em lípidos, beneficiando o crescimento destes exemplares e sugerindo mais uma vez o benefício da utilização destas dietas com teores baixos em lípidos para esta espécie, na fase juvenil.

Os lípidos do músculo (em peso fresco) variaram entre 2,1 e 3,1%, representando 1,3% do peso corporal e cerca de 27% dos lípidos totais da carcaça. Contudo, ao contrário das vísceras, o teor de lípidos da dieta não afectou o teor de lípidos do músculo. Resultados semelhantes foram obtidos em espécies como o halabote (Berge e Storebakken, 1990; Martins *et al.*, 2007), rodovalho (Regost *et al.*, 2001b) e linguado (Dias *et al.*, 2004), o que sugere outros tecidos como preferenciais para a deposição lipídica, tal como a pele e o tecido adiposo sub-dermal ou outros (barbatanas, cérebro ou ossos). Neste ensaio, a pele e o tecido adiposo sub-dermal representaram 0,2% do peso corporal e 4% dos lípidos da carcaça. Neste caso, o teor lipídico da dieta também afectou a deposição de gordura neste tecido, demonstrando assim, que, tal como no rodovalho, a pele é um tecido preferencial para deposição de gordura. Contudo, cerca de 1/3 dos lípidos da carcaça não foram depositados nos tecidos analisados. Em trabalhos em halabote (Haug *et al.*, 1988), grande parte da gordura era depositada entre a barbatana dorsal e ventral e à

volta da cavidade peritoneal, locais que não foram contemplados neste ensaio, podendo nestes estar depositado a maioria dos lípidos não determinados nos tecidos analisados.

Apesar de muito se saber no que diz respeito à composição e metabolismo lipídico, estudos em nutrigenómica estão a desvendar diversos factores metabólicos envolvidos na relação entre os nutrientes e a expressão genética (Ducasse-Cabanot *et al.*, 2007; Leaver *et al.*, 2008; Panserat *et al.*, 2008). Alguns destes estudos têm contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela deposição lipídica e em última instância pela qualidade da carne. Num estudo de Kadereit *et al.* (2008) foi caracterizada uma família de genes conservativos, importantes na formação de gotículas lipídicas, a que deram o nome fat-inducing transcript (FIT-1 e FIT-2). Apesar deste trabalho ser num modelo bacteriano, é referido um ensaio onde, ao suprimir o FIT-2, se observou uma drástica diminuição da deposição lipídica ao nível do intestino e fígado do peixe zebra, salientando assim a importância do FIT-2 na formação de gotículas lipídicas *in vivo.* Contudo, outros genes reguladores da extensão e padrão da deposição lipídica, tal como lipin-1a e leptina, estão a começar a ser estudados em modelos animais, incluindo peixe (He *et al.*, 2000; Dai *et al*., 2006).

Para além de fornecer energia, os lípidos da dieta são importantes na nutrição dos peixes marinhos como fonte de EFA, especialmente 20:5n-3 e 22:6n-3 (Sargent *et al.*, 2002). A composição em ácidos gordos dos tecidos reflecte geralmente a composição das dietas. Neste ensaio, constatou-se esse facto, existindo uma correlação linear entre a concentração de ácidos gordos das dietas e a concentração dos ácidos gordos do músculo, único tecido onde foi realizado o perfil de ácidos gordos. Tendo em conta que não se detectaram diferenças significativas no teor de lípidos do músculo, os peixes alimentados com a dieta L4 continham um menor teor de ácidos gordos que os peixes alimentados com

a dieta L20. Adicionalmente, as dieta L4 induziram valores mais baixos de MUFA, provavelmente levando à mobilização dos ácidos gordos da série n-3 de cadeia longa para fins oxidativos. Todavia, a dieta L20 provocou um decréscimo no crescimento dos exemplares e piorou a utilização dos nutrientes, não sendo por isso uma dieta adequada para esta espécie. Apesar da ligeira alteração da concentração de ácidos gordos n-3 no músculo de peixes alimentados com dietas com um teor baixo em gordura, a qualidade nutricional mantém-se, o que faz deste peixe um alimento aconselhado para consumo humano (Simopoulos, 1999; Ruxton *et al.*, 2004).

Em conclusão, os resultados aqui apresentados evidenciam a baixa tolerância lipídica dos juvenis de linguado (*Solea senegalensis*) e sugerem uma inclusão máxima de lípidos na dieta até 8%, para maximização do crescimento e da utilização dos nutrientes. Serão necessários mais estudos para verificar se a ausência de *protein sparing* se mantém quando os peixes são alimentados com dietas com um teor proteico inferior. No que diz respeito ao metabolismo lipídico, valerá a pena investigar quais são os mecanismos responsáveis pela aparente má utilização dos lípidos da dieta. Futuramente, uma melhor compreensão das alterações metabólicas provocadas por dietas com uma razão proteína/lípido diferente, permitirá o estudo deste fenómeno mais profundamente, obtendo-se uma dieta optimizada, segundo a capacidade metabólica da espécie.

III - Referências Bibliográficas

Aksnes A, Hjertnes T, Opstvedt J (1996) Effect of dietary protein level on growth and carcass composition in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* **145**, 225-233.

Alvarez MJ, Díez A, López-Bote, C, Gallego, M, Bautista, J M, (2000) Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Br J Nutr* **84**, 619-628.

Andersen NG, Alsted NS (1993) Growth and body composition of turbot (*Scopthalmus maximus*) in relation to different lipid/protein ratios in the diet. In:, *Fish nutrition in pratice*, INRA (Ed.), pp.479-491. Biarritz, France: INRA

Arnesen P, Krogdahl A, Kristiansen, IØ (1993) Lipogenic enzyme activities in liver of atlantic salmon (*Salmo salar*. L.). *Comp Biochem Physiol B* **105**, 541–546.

AOAC (2006) *Official methods of analysis of AOAC International*, 18 ed. Maryland, USA: AOAC International.

Aster PL, Moon TW (1981) Influence of fasting and diet on lipogenic enzymes in the American eel, *Anguilla rostrata* LeSueur. *J Nutr* **111**, 346-354.

Barroso JB, García-Salguero L, Peragón MH , Lupiáñez JA (1994) The influence of dietary protein on the kinetics of NADPH production system in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **124**, 47-59.

Bautista JM, Garrido-Pertierra A, Soler G (1988) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition. *Biochim Biophys Acta* **967**, 354–363.

Bell JG, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2003a) Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt atlantic salmon (*Salmo salar*): Changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil "Wash out". *Aquaculture* **218**, 515-528.

Bell M, Dick J, Porter A (2003b) Tissue deposition of n−3 fa pathway intermediates in the synthesis of DHA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* **38**, 925-931.

Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR (2001) Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J Nutr* **131**, 1535-1543.

Bell JG, Henderson RJ, Tocher DR, McGhee F, Dick JR, Porter A, Smullen RP, Sargent JR (2002) Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J Nutr* **132**, 222-230.

Berge GM, Storebakken T (1991) Effect of dietary fat level on weight gain, digestibility, and fillet composition of atlantic halibut. *Aquaculture* **99**, 331–338.

Brauge C, Corraze G, Medale F (1995) Effects of dietary levels of carbohydrate and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykis*s, reared in freshwater or in seawater. *Comp Biochem Physiol A* **111**, 117–124.

Caballero MJ, Obach A, Rosenlund G, Montero D, Gisvold M, Izquierdo MS (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **214**, 253-271.

Cacerez-Martinez C, Cadena-Roa M, Metailler R (1984) Nutritional requirements of turbot (*Scophthalmus maximus*): I. A preliminary study of protein and lipid utilization. *J World Maricult Soc* **15**, 191-202.

Cho CY, Hynes JD, Wood KR, Yoshida, H K (1994) Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of Aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* **124**, 293-305.

Choubert G, Milicua J-CG, Gomez R, Sancé S, Petit H, Nègre-Sadargues G, Castillo R, Trilles J-P (1995) Utilization of carotenoids from various sources by rainbow trout: Muscle colour, carotenoid digestibility and retention. *Aquaculture Int* **3**, 205-216.

Christiansen R, Waagbø R, Torrissen OJ (1993) Effects of polyunsaturated fatty acids and vitamin E on flesh pigmentation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Fish nutrition in practice*, pp. 339–343 [Kaushik, S.J. and Luquet, P., Editors]. Paris: INRA.

Company R, Calduch-Giner JA, Kaushik S, Perez-Sanchez J (1999) Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* **171**, 279-292.

Conceição LEC, Ribeiro L, Engrola S, Aragão C, Morais S, Lacuisse M, Soares F, Dinis MT (2007) Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **268**, 64-81.

Cowey CB, Sargent JR (1972) Fish nutrition. *Adv mar Biol* **10**, 383–492.

Cowey CB, Walton MJ (1989) Intermediary metabolism. In: *Fish Nutrition,* 3th ed., pp. 259-329. New York: Academic Press.

Connor WE (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* **71**, 171S–175S.

Corraze G, Larroquet L, Médale F (1999) Alimentation et dépôts lipidiques chez la truite arc-en-ciel, effet de la température d´élevage. *Productions Animals* **12**, 249-256.

Corraze G (2001) Lipid Nutrition. In: *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*, pp. 111-130 [Guillaume J, Kaushik, S, Bergot, P, Métailler, K editors] Chichester, UK: Springer Praxis.

D'Andrea S, Guillou H, Jan S, Catheline D, Thibault JN, Bouriel M, Rioux V, Legrand P (2002) The same rat delta 6-desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochem J* **364**, 49-55.

Dai H, Long L, Ding G (2006) Molecular cloning of the obese gene from *Cyprinus carpio* and its expression in Escherichia coli. *Frontiers of Biology in China* **1**, 50-55.

Das UN (2000) Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: But, why and how? *Prostaglandins, Leuko Essent Fatty Acids* **63**, 351-362.

De Silva S, Anderson T (1995) *Fish Nutrition in Aquaculture*, pp. 319. London: Chapmant & Hall.

Dias J, Alvarez MJ, Diez A, Arzel J, Corraze G, Bautista JM, Kaushik SJ (1998) Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile european seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **161**, 169-186.

Dias J, Corraze G, Arzel J, Alvarez MJ, Bautista JM, Lopez-Bote C, Kaushik SJ (1999) Nutritional control of lipid deposition in rainbow trout and European seabass: Effects of dietary protein energy ratio. *Cybium* **23**, 127-137.

Dias J, Rueda-Jasso R, Panserat S, Conceicao LEC, Gomes EF, Dinis MT (2004) Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquac Res* **35**, 1122-1130.

Ducasse-Cabanot S, Zambonino-Infante J, Richard N, Medale F, Corraze G, Mambrini M, Robin J, Cahu C, Kaushik S, Panserat S (2007) Reduced lipid intake leads to changes in digestive enzymes in the intestine but has minor effects on key enzymes of hepatic intermediary metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal* **1**, 1272-1282.

Einen O, Thomassen MS (1998) Starvation prior to slaughter in atlantic salmon (*Salmo salar*): Ii. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture* **169**, 37-53.

Fauconneau B, Chmaitilly J, Andre S, Cardinal M, Cornet J, Vallet JL, Dumont JP, Laroche M (1993) Caractéristiques de la chair de truite arc en ciel: II. Composantes physiques et sensorielles. *Sci Aliment* **13**, 188–199.

FAO (2006) The state of the world fisheries and aquaculture. FAO, Rome, Italy.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.

Fonseca-Madrigal J, Karalazos V, Campbell PJ, Bell JG, Tocher DR (2005) Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr* **11**, 241-250.

Francis DS, Turchini GM, Jones PL, De Silva S (2006) Effects of dietary oil source on growth and fillet fatty acid composition of murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture* **253**, 547-556.

Gjedrem T (1997) Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquac Int* **5**, 197-206.

Grigorakis K (2007) Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture* **272**, 55-75.

Halver JE (1957) Nutrition of salmonoid fishes: Iv. An amino acid test diet for chinook salmon. *J Nutr* **62**, 245-254.

Halver JE, De Long DC, Mertz ET (1959) Methionine and cystine requirements of chinook salmon *Fed Proc* **18,** 2076.

Haug T, Ringo E, Pettersen GW (1988) Total Lipid and Fatty-Acid Composition of Polar and Neutral Lipids in Different Tissues of Atlantic Halibut, *Hippoglossus Hippoglossus* (L). *Sarsia* **73**, 163-168.

Hauler RC. The response of Atlantic Salmon parr (*Salmo salar L*.) to increasing dietary starch (1995) Bachelor of applied Science (aquaculture) honours thesis. University of Tasmania at Launceston.

Helland SJ, Grisdale-Helland B (1998) Growth, feed utilization and body composition of juvenile atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. *Aquaculture* **166**, 49-56.

Hemre G-I, Sandnes K (1999) Effect of dietary lipid level on muscle composition in atlantic salmon salmo salar. *Aquac Nutr* **5**, 9-16.

Hemre G-I, MommsenTP, Krogdahl Å (2002) Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* **8**, 175-194.

Henderson RJ, Sargent JR (1985) Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation of fatty-acids in livers of rainbow-trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B* **82**, 79-85.

Herzberg GR (1991) The 1990 Borden award lecture. Dietary regulation of fatty acid and triglyceride metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* **69**, 1637-1647.

He X, Xu X, Zhao S, Fan B, Yu M, Zhu M, Li C, Peng Z, Liu B (2008) Investigation of Lpin1 as a candidate gene for fat deposition in pigs. *Mol Biol Rep* **36,** 1175-1180; Epublication June 26 2008.

Hillestad JAÅ (1998) Long-term effects of dietary fat level and feeding rate on growth, feed utilization and carcass quality of Atlantic salmon. *Aquac Nutr* **4**, 89-97.

Hillgartner FB, Salati LM, Goodridge AG (1995) Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Phys Rev* **75**, 47–76.

Hoffmann RC (2005) A brief history of aquatic resource use in medieval Europe. *Helgoland Marine Research* **59**, 22-30.

Imsland A, Foss A, Conceição L, Dinis M, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P (2003) A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13**, 379-407.

Iritani N, Ikeda Y, Fukuda H, Katsurada A (1984) Comparative study of lipogenic enzymes in several vertebrates. *Lipids* **19**, 828–835.

Izquierdo MS (1996) Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquac Nutr* **2**, 183-191

Izquierdo MS, Obach A, Arantzamendi L, Montero D, Robaina L, Rosenlund G (2003) Dietary lipid sources for seabream and seabass: Growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquac Nutr* **9**, 397.

Izquierdo MS, Montero D, Robaina L, Caballero MJ, Rosenlund G, Gines R (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* **250**, 431-444.

Kadereit B, Kumar P, Wang W-J, Miranda D, Snapp EL, Severina N, Torregroza I, Evans T, Silver DL (2008) Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc Natl Acad Sci* **105**, 94-99.

Kaushik SJ (1998) Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non salmonids. *Aquat Living Resour* **11**, 211-217.

Kheyyali D, Shimeno S, Takeda M (1989) Effect of dietary cabohydrate and lipid levels on hepatopancreatic enzymes and body composition in carp. In: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish*, pp. 253-261 [Takeda, M., Watanabe, T. Editors]. Japan.

Kruuk H (1963) Diurnal periodicity in the activity of the common sole, *Solea vulgaris*, *Neth J Sea Res* **2**, 1–28.

Leaver M, Bautista J, Bjornsson BT, Jonsson E, Krey G, Tocher D, Torstensen B (2008) Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science* **16**, 71-92.

Lee DJ, Putnam GB (1973) The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *J Nutr* **103**, 916-922.

Likimani TA, Wilson RP (1982) Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J Nutr* **112**, 112–117.

Lin H, Romsos, DR, Tack PI, Leveille GA (1977a) Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Nutr* **107**, 846-854.

Lin H, Romsos DR, Tack P I, Leveille GA (1977b) Effects of fasting and feeding various diets on hepatic lipogenic enzyme activities in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J Nutr* **107**, 1677-1682.

Martins DA., Valente LMP, Lall SP (2007) Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, l.). *Aquaculture* **263**, 150-158.

Maynard LA, Loosli JK, Hintz HF, Warner RG (1979) *Animal Nutrition* 7th Edition. New York: McGraw-Hill Book Co.

Menoyo D, Diez A, Lopez-Bote CJ, Casado S, Obach A, Bautista JM (2006). Dietary fat type affects lipid metabolism in Atlantic salmon (*salmo salar l.*) and differentially regulates glucose transporter glut4 expression in muscle. *Aquaculture* **261**, 294-304.

Mommsen TP (2000) Glucagon-like peptide-1 in fishes: The liver and beyond. *Amer Zool* **40**, 259-268.

Nelson DL, Cox MM (2000) Lipids. In: *Lehninger Principles of Biochemistry* pp. 363-375. New York: Worth Publishers.

NRC (1993) *Nutrient requirements of fish*, pp 113. Washington, D.C: National Academy Press.

Oliva-Teles A, Gouveia A J, Gomes E, Rema P (1994) The effect of different processing treatments on soybean meal utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **124**, 343-349.

Palmer TN, Ryman BE (1972) Studies on oral glucose intolerance in fish. *J Fish Biol* **4**, 311-319.

Panserat S, Ducasse-Cabanot S, Plagnes-Juan E, Srivastava PP, Kolditz C, Piumi F, Esquerré D & Kaushik S (2008) Dietary fat level modifies the expression of hepatic genes in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as revealed 1 by microarray analysis. *Aquaculture* **275**, 235-241.

Peres H, Oliva-Teles A (1999) Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by european sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **179**, 325-334.

Rasmussen RS, Ostenfeld TH (2000) Effect of growth rate on quality traits and feed utilisation of rainbow trout (O*ncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture* **184**, 327-337.

Rasmussen RS (2001) Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. *Aquac Res* **32**, 767-786.

Regost C, Jakobsen JV, Rora AMB (2004) Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Res Intern* **37**, 259-271.

Regost C, Arzel J, Cardinal M, Laroche M, Kaushik SJ (2001a) Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture* **193**, 325-345.

Regost C, Arzel J, Cardinal M, Rosenlund G, Kaushik SJ (2003) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) 2. Flesh quality properties. *Aquaculture* **220**, 737-747.

Regost C, Arzel J, Cardinal M, Robin J, Laroche M, Kaushik SJ (2001b) Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* **193**, 291-309.

Rosenlund G, Obach AM, Sandberg G, Standal H, Tveit K (2001) Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of atlantic salmon (S*almo salar*;l.). *Aquac Res* **32**, 323-328.

Rema P, Conceicao LEC, Evers F, Castro-Cunha M, Dinis MT, Dias J (2007) Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquac Nutr* **0**, 1-7

Rust MB, John EH, Ronald WH (2002) Nutritional physiology In: *Fish nutrition*, 3th ed., pp. 367-505. San Diego: Academic Press.

Ruxton CHS, Reed SC, Simpson MJA, Millington KJ (2004) The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* **17**, 449-459.

Salhi M, Izquierdo MS, Hernández-Cruz CM, González M, Fernández-Palacios H (1994). Effect of lipid and n-3 hufa levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval gilthead seabream (*Sparus aurata*) *Aquaculture* **124,** 275-282.

Sánchez-Muros MJ, García-Rejón L, Lupiáñez JA, de la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): II. Adaptive response of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity to hig-carbohydrate/low protein and high-fat/non-carbohydrate diets. *Aquac Nutr* **2**, 193-200.

Sargent JR, Tocher DR, Bell JG, John EH, Ronald WH (2002) The lipids pp. 181-257 In: *Fish nutrition* 3th ed. San Diego: Academic Press.

Shantha NC, Ackman RG (1990) Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analyses of fish oil longer-chain n-3 polyunsaturated fatty acid methyl esters. *J Chromatogr Biomed Appl* **533**,1-10.

Sheehan EE, O'Connor, TP, Sheehy, PJA, Buckley, DJ, Fitzgerald, R (1996) Effect of dietary fat intake on the quality of raw and smoked salmon. *Irish Journal of Agricultural and food research* **35**, 37–42.

Sheridan MA (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp Biochem Physiol* **90**, 679-690.

Shikata T, Iwanaga S, Shimeno S (1994) Effects of dietary glucose, fructose and galactose on hepatopancreatic enzyme activities and body composition in carp. *Fish Sci* **60**, 613–617.

Shimeno S, Hosokawa H, Shikata M (1996) Metabolic responses of juvenile yellowtail to dietary carbohydrate to lipid ratios. *Fish Sci* **62**, 945-949.

Shimeno S, Kheyali D, Shikata T (1995) Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp. *Fish Sci* **61**, 277-281.

Simopoulos AP (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**, 560S-569.

Sticney RR (1994) *Principles of Aquaculture*, New York: John Wiley & Sons,.

Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science* **11**, 337-369.

Tacon AGJ, Cowey BC (1985) Protein and amino acid requirements. In: *Fish energetic: news perspectives*, p.155-183 [Tyler, P.; Calow, P., editors] Baltimore: John Hopkins University Press.

Tocher DR (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* **11**, 107-184.

Vergara JM, Lopez-Calero G, Robaina L, Caballero MJ, Montero D, Izquierdo MS, Aksnes A (1999) Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* **179**, 35-44.

Voss B, Jankowsky HD (1986) Temperature dependence of lipogenesis in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B* **83**, 87-90.

Walzem RL, Storebakken T, Hung SSO, Hansen RJ (1991) Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. *J Nutr* **121**, 1090-1098.

Watanabe T (1982) Lipid nutrition in fish. *Comp Biochem Physiol* **73**, 3-15.

Wilson RP (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* **124**, 67-80.

Wilson RP, Halver JE (1986) Protein and amino acid requirements of fishes. *Annu Rev Nutr* **6**, 225-244.

Wilson RP, John EH, Ronald WH (2002) Amino acids and proteins pp143-179 In: Fish nutrition 3th ed. San Diego: Academic Press.

Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*, 4th ed. London: Prentice Hall.

Fishbase (2008) *Solea senegalensis.*
http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?id=8852 (acedido em Dezembro 2008)

IV - Anexos

ANEXO 1

Determinação do Teor de Matéria Seca (MS)

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

Aparelhos:

Estufa - *Binder* ⟶

Excicador

Balança analítica

Figura 13 - Estufa

Material:

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

Procedimento:

1) Após a identificação dos cadinhos/formas de alumínio, secar na **estufa** (Figura 13) durante 24 horas a 105ºC e deixar arrefecer num excicador (cerca de 30 min);
2) Pesar os cadinhos/formas de alumínio e registar os seus pesos;
3) Tarar os cadinhos/formas de alumínio e pesar **1g de amostra** (0,5-1g mínimo);
4) De seguida, colocar os cadinhos/formas de alumínio com a amostra a secar na **estufa** a 105ºC durante 24h;
5) Após 24 horas na estufa, colocar os cadinhos/formas de alumínio no excicador durante cerca de 30 min para arrefecer;
6) Pesar os cadinhos/formas de alumínio com amostra e registar os pesos;
7) Calcular:

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

ANEXO II

Determinação da Energia Bruta

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

O sistema de calorimetria representado na Figura 14 permite determinar a energia bruta da matéria orgânica, recorrendo a uma combustão por acção do oxigénio, no interior de um vaso de decomposição em condições pré-definidas. O calor que é libertado na combustão é absorvido pelo conteúdo do calorímetro e causa a elevação da temperatura da água que é cuidadosamente medida com um termómetro de precisão de Beckmann, antes e depois da reacção terminar, quando a temperatura no interior do calorímetro é novamente constante. A variação de temperatura ΔT, observada no calorímetro, é proporcional ao calor que a reacção liberta ou absorve e depende da capacidade calorífica do calorímetro. Assim, pela medição directa de ΔT, pode-se determinar a quantidade de energia bruta em função do peso da amostra. Para garantir resultados reprodutíveis o sistema é calibrado regularmente com ácido benzóico, com calor específico conhecido, para determinação da capacidade calorífica (valor C) do sistema.

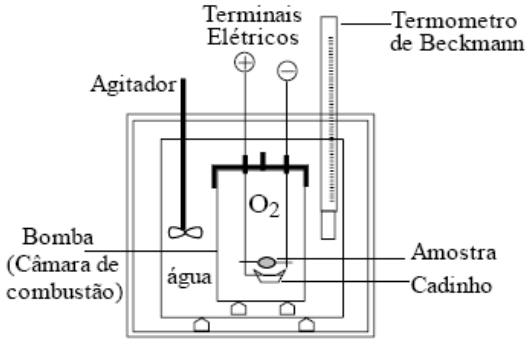

Figura 14 – Esquema de uma bomba calorímetrica

Aparelhos:

- Modelo: Sistema de calorimetria IKA C2000,
- Marca: IKA-Werke GMBH & CO.KG, Staufen, Alemanha
- Prensa, IKA C21
- Balança analítica

Material

- Fio de algodão
- Crisol de quartzo/aço
- O_2

Procedimento:

1. Ligar os aparelhos:

a. Abrir registo da garrafa de O_2 (**Não mexer no registo do redutor**);

b. Ligar IKA K600 (unidade de aquecimento/arrefecimento de água);

2. Preparação do recipiente de combustão

a. Prensar a amostra na prensa IKA C21;

b. Pesar a amostra dentro do crisol de quartzo/aço;

c. Amarrar um fio de algodão no aro de ignição;

d. Posicionar o crisol no aparador do crisol;

e. Posicionar o fio de algodão dentro do crisol de modo a contactar com a amostra para permitir a combustão desta. A colocação indevida do fio causará a falha da ignição;

f. Fechar o recipiente de combustão.

g. Iniciar combustão