Maria Helena Tabuaço Rêgo Martins Peres

Estudos de Nutrição Energética e Proteica em Robalo

(Dicentrarchus labrax)

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2000

Maria Helena Tabuaço Rêgo Martins Peres

Estudos de Nutrição Energética e Proteica em Robalo

(*Dicentrarchus labrax*)

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

Departamento de Zoologia e Antropologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2000

AO MEU MARIDO, PAIS E IRMÃS

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração desta tese muitas foram as pessoas que contribuíram para a sua concretização, a todos gostava de expressar o meu sincero apreço e agradecimento.

Ao Exmo. Professor Doutor Aires Oliva Teles da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo empenho, dedicação e seriedade com que sempre orientou este trabalho. O seu interesse pela Investigação e incessante busca de novos desafios foram um permanente incentivo para me aperfeiçoar e ser merecedora da confiança que em mim depositou. O meu sincero reconhecimento e muita admiração.

Ao Exmo. Professor Doutor Sadasivam Kaushik, do Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.), St. Pée-sur-Nivelle, França, pela forma como me acolheu no seu laboratório, bem como pelo interesse que sempre manifestou pelos meus projectos.

Ao Exmo. Professor Doutor António Gouveia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por me ter aberto as portas do mundo da "Ciência" e por me ter acompanhado e orientado nos meus primeiros passos. O meu sincero obrigado.

Ao Exmo. Professor Doutor João Coimbra e ao Exmo. Professor Doutor Emídio Gomes do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto pelo incondicional apoio e pela sábia orientação profissional que sempre me dispensaram desde os tempos da faculdade.

À Exma. Professora Doutora Ana Maria Pimentel Rodrigues, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pela sua amizade, ajuda e ensinamentos que me tem transmitido.

O meu agradecimento é também extensível aos membros do júri pela sua disponibilidade para a avaliação desta tese.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia agradeço a bolsa de estudos atribuída para a realização deste trabalho (Programa PRAXIS XXI – BD/2945/94).

Ao Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelos recursos concedidos para a elaboração deste trabalho.

À Exma. Eng. Jeannine Brèque e à Exma. Eng. Maria de Lurdes Faria pela preciosa amizade e eficiência com que me ajudaram na realização de diversas análises.

A todos os funcionários desta faculdade, particularmente aos da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre", pela cooperação e auxílio prestado na realização deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, em particular ao Exmo. Doutor Jorge Dias, pelo apoio nunca negado e pelo companheirismo que manifestaram durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãs e familiares pelo incentivo e carinho com que sempre lidaram com os meus projectos.

Ao meu marido pelo constante estímulo, interesse e dedicação que contribuíram decisivamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objectivo geral do presente trabalho é o estudo da utilização das proteínas e da energia por juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*), com vista à formulação de dietas mais equilibradas e menos poluentes. Neste contexto foram realizados diversos estudos que englobam, de um modo geral, ensaios de crescimento, de digestibilidade e de metabolismo.

O primeiro trabalho teve como objectivo estimar as necessidades proteicas e energéticas de manutenção de juvenis de robalo mantidos a 25 °C, usando como critérios a avaliação do crescimento e das modificações na composição corporal em proteína e energia, o doseamento da excreção de amónia e do consumo de oxigénio. Foram constituídos 10 grupos de robalos com peso médio de 22g. Duplicados destes grupos foram mantidos em jejum ou alimentados durante 4 semanas com uma quantidade de alimento equivalente a 0,25%, 0,5%, 1% e 1,5% do peso vivo. O aumento da taxa de ingestão melhorou significativamente as performances de crescimento e as retenções diárias proteicas e energéticas. A taxa de ingestão teve pouca influência na composição corporal do peixe inteiro, com excepção do conteúdo lipídico que aumentou com a taxa de ingestão. Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e da energia foram negativamente afectados pela taxa de ingestão. As necessidades proteicas de manutenção foram estimadas em 1,2 g/kg/dia, com base não só nos dados de crescimento/composição corporal como também nos dados de excreção de amónia. As necessidades energéticas de manutenção foram estimadas em 98,6 kJ/kg/dia com base nas performances de crescimento, e em 57,2 kJ/kg/dia com base nos parâmetros metabólicos. Concluiu-se que ambos os critérios utilizados permitem uma estimativa idêntica das necessidades proteicas de manutenção, mas apresentam pequenas diferenças nas estimativas das necessidades energéticas de manutenção.

Com o objectivo de estudar a utilização da proteína da dieta a duas temperaturas, 25 e 18 °C, foram formuladas 4 dietas isoenergéticas com 36, 42, 48 e 56% de proteína (respectivamente dietas 36P, 42P, 48P e 56P). Cada uma das dietas foi fornecida em triplicado a grupos de 25 robalos (peso médio de 5,5g), durante 12 semanas. A taxa de crescimento específico, a ingestão de alimento e a eficiência de conversão alimentar foram significativamente melhores à temperatura mais elevada. A ambas as temperaturas, estes parâmetros foram significativamente melhores com as dietas 48P e 56P do que com as restantes dietas. A 25 °C, a eficiência de conversão alimentar foi significativamente melhor com a dieta 56P do que com a dieta 48P. Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e energia aumentaram significativamente com o aumento da temperatura da água, porém, para cada temperatura, não foram observadas diferenças significativas entre as dietas. No final do ensaio de crescimento não foram observadas diferenças significativas na composição corporal do peixe inteiro, à mesma temperatura. A retenção azotada (g/kg/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C. Contudo, quando expressa em percentagem do azoto ingerido, verificou-se o inverso. A 25 °C, a retenção azotada (% azoto ingerido) não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, mas expressa em g/kg/dia foi significativamente maior com a dieta 56P do que com as dietas 36P e 42P. Pelo contrário, a 18 °C a retenção azotada (g/kg/dia) foi similar nos diferentes grupos experimentais, mas em percentagem do azoto ingerido variou de modo inverso ao do teor proteico da dieta. A retenção energética (kJ/kg/dia) não diferiu

significativamente entre os tratamentos, a ambas as temperaturas. Em percentagem da energia ingerida, a retenção energética aumentou significativamente com o aumento do teor proteico da dieta a 25 °C, enquanto que a 18 °C não se observaram diferenças entre os grupos. A excreção de amónia (mg/kg/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C, porém expressa em percentagem do azoto ingerido não houve diferenças significativas entre as temperaturas. A excreção de amónia mostrou uma tendência para aumentar com o aumento do teor proteico da dieta, contudo este efeito foi significativo apenas com a dieta 56P a 18 °C. O consumo de oxigénio também foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C. A 25 °C, o consumo de oxigénio não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, enquanto que a 18 °C foi significativamente menor com a dieta 36P do que com as dietas 42P e 56P. Os resultados deste trabalho sugerem que, independentemente da temperatura da água, as necessidades proteicas para o crescimento são satisfeitas com uma dieta com 48% de proteína. A utilização proteica foi mais eficiente a 18 do que a 25 °C.

O trabalho seguinte teve como objectivo estudar o efeito do teor lipídico das dietas. Foram formuladas quatro dietas isoproteicas (48% proteína) com 12, 18, 24 e 30% de lípidos (respectivamente dietas 12L, 18L, 24L e 30L). Cada uma das dieta foi distribuída em triplicado a grupos de 25 robalos (peso médio de 7g), durante 8 semanas. O peso final dos robalos alimentados com a dieta 24L foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com as dietas 12L e 30L, mas a taxa de crescimento específico não diferiu significativamente entre os grupos experimentais. A eficiência de conversão alimentar da dieta 30L foi significativamente menor do que a das restantes dietas. Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína não foram afectados pela dieta, mas os coeficientes de digestibilidade aparente dos lípidos e da energia foram significativamente maiores nas dietas 24L e 30L. No final do ensaio de crescimento, o conteúdo proteico corporal foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta 12L e o conteúdo lipídico e energético foi significativamente menor nos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L. O teor lipídico hepático foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta 24L do que nos restantes grupos. O teor lipídico muscular não foi afectado pela dieta. As retenções azotada e energética (% azoto e energia ingerida) foram significativamente menores com a dieta 30L do que com as restantes dietas. A retenção energética (% energia ingerida) aumentou com o aumento do teor lipídico da dieta de 12 para 24% e a retenção lipídica diminuiu com o aumento do teor lipídico das dietas. A excreção de amónia (mg/kg/dia ou % azoto ingerido) diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas. O consumo de oxigénio (g/kg/dia) foi significativamente menor com as dietas 24L e 30L do que com as restantes dietas. Os resultados deste estudo indicam que o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24% não melhorou as performances de crescimento ou a eficiência de utilização das dietas. A inclusão de 30% de lípidos, apesar de não ter afectado o crescimento, reduziu significativamente a eficiência de conversão alimentar e a retenção proteica e energética.

Num outro trabalho estudou-se a utilização dos hidratos de carbono sob a forma de amido cru (AC) e gelatinizado (AG) pelo robalo. Foram formuladas três dietas isoproteicas (48% proteína) e isolipídicas (12% lípidos), contendo 25% AC, 25% AG ou 12,5% AC+12,5% AG (dietas AC, AG e AC/AG, respectivamente). Foi também formulada uma dieta isenta de hidratos de carbono (dieta HP: 64% proteína e 18% lípidos). Cada uma destas dietas foi fornecida em triplicado a grupos de 25 robalos (peso médio de 6g), durante 10 semanas. A redução do teor proteico da dieta de 63 para 50%, mediante a incorporação de amido, não afectou o crescimento

dos robalos ou a retenção proteica e energética. Nas dietas com amido, a taxa de crescimento foi significativamente menor com a dieta AG do que com as restantes dietas e a eficiência de conversão alimentar foi significativamente menor com a dieta AC do que com as restantes dietas. O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína foi independente da composição das dietas e os coeficientes de digestibilidade aparente da energia e do amido aumentaram significativamente com o aumento do teor de AG na dieta. No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos não diferiu significativamente entre os grupos experimentais. Os índices hepatossomático e visceral e o teor em glicogénio hepático dos robalos alimentados com as dietas AC e HP foram significativamente menores do que os dos robalos alimentados com as restantes dietas. O conteúdo lipídico hepático dos robalos alimentados com a dieta AG foi significativamente maior do que os dos restantes grupos. O teor lipídico muscular dos robalos não sofreu alterações apreciáveis entre grupos. Os níveis de glucose plasmática, ao fim de 16 horas de jejum, foram idênticos nos vários tratamentos. A retenção azotada e energética (g azoto ou kJ/kg/dia) não diferiu significativamente entre os diferentes tratamentos. Contudo, verificou-se uma tendência para o aumento da retenção azotada e energética (% azoto e energia ingerida) com o aumento do teor de AG das dietas. A excreção de amónia (mg/kg/dia) foi significativamente menor nos robalos alimentados com a dieta AG do que com as restantes dietas. O consumo de oxigénio (g/kg/dia) não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, apesar de se notar uma tendência para diminuir com a substituição do AC por AG nas dietas. Concluiu-se que a substituição total do AC por AG diminuiu significativamente o crescimento e a ingestão de alimento, sem contudo afectar a retenção proteica e energética. No entanto, a substituição de parte ou de todo o AC por AG aumentou significativamente a eficiência de conversão alimentar, a utilização digestiva das dietas e diminuiu as perdas metabólicas azotadas.

Em seguida foi realizado um teste de tolerância à glucose na dourada e no robalo com vista a um melhor conhecimento do metabolismo glucídico nestas espécies. Estabeleceram-se 8 grupos de 8 douradas (peso médio de 194g) e 8 grupos de 8 robalos (peso médio de 133g), que foram alimentados com uma dieta experimental (50% proteína; 12% lípidos) durante 3 semanas. De seguida, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, após o que foram anestesiados, pesados e injectados intraperitonealmente com 1g glucose/kg peso corporal. Foram efectuadas colheitas de sangue, músculo e fígado antes (tempo 0) e 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a injecção de glucose. Em ambas as espécies foi observado um aumento dos níveis plasmáticos de glucose após a injecção. Após a injecção de glucose, os níveis de glicémia atingiram um pico em 1–3 horas na dourada e em 3–6 horas no robalo. A magnitude do pico foi significativamente maior na dourada do que no robalo. Em ambas as espécies, os níveis basais de glucose foram atingidos após 12 horas da injecção. Na dourada, a injecção de glucose provocou um desvio do fluxo metabólico no sentido de um aumento do catabolismo das reservas corporais, enquanto que no robalo verificou-se um desvio metabólico em sentido contrário, isto é, um aumento do anabolismo. Os resultados deste ensaio indicam que a dourada e o robalo são capazes de restabelecer os níveis plasmáticos de glucose 12 horas após a injecção intraperitoneal de 1g glucose/ kg peso corporal. Apesar das diferenças dos padrões de alguns parâmetros analisados nas duas espécies, os valores basais foram restabelecidos 24 horas após a injecção de glucose. A variação dos triglicerídeos plasmáticos e do glicogénio hepático, nas duas espécies, sugere que estes parâmetros poderão ter um papel muito importante na regulação da glucose plasmática.

O último estudo teve como objectivo avaliar a possibilidade da substituição nas dietas de azoto proteico por azoto não proteico (extracto de ácido ribonucleico (ARN) de levedura). Foram formuladas 4 dietas isoenergéticas, duas das quais contendo farinha de peixe como única fonte azotada (dietas HP e LP, respectivamente com 50 e 39% proteína). O extracto de ARN foi adicionado à dieta LP, em duas concentrações: 6,2 e 12,4% (dietas LP6 e LP12, respectivamente), de modo a que o teor em azoto total destas dietas corresponde-se a 7 e 8%, respectivamente. As dietas foram distribuídas em triplicado a grupos de 25 robalos (peso médio de 13g), durante 10 semanas. A taxa de crescimento específico foi significativamente maior com as dietas HP e LP do que com a dieta LP12. A eficiência de conversão alimentar foi significativamente maior com a dieta HP do que com as restantes dietas, para as quais não foram observadas diferenças significativas. Os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, do azoto e da energia não diferiram significativamente entre os tratamentos. No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos não foi significativamente afectada pela composição das dietas. Os índices hepatossomático e visceral dos robalos alimentados com a dieta HP foram significativamente menores do que os dos robalos alimentados com as restantes dietas. A retenção azotada (g/kg/dia) foi similar nos diferentes grupos experimentais mas quando expressa em percentagem do azoto ingerido foi significativamente maior na dieta LP do que nas restantes dietas. Nestas últimas, a retenção azotada diminuiu com o aumento da incorporação do ARN. A retenção energética (kJ/kg/dia) foi significativamente menor na dieta LP12 do que nas restantes dietas e, em percentagem da energia ingerida, foi significativamente menor na dieta LP12 do que na dieta HP. A incorporação do extracto de ARN, apesar de não ter afectado negativamente a ingestão voluntária ou a eficiência de conversão alimentar, reduziu significativamente a taxa de crescimento, embora este efeito tenha sido significativo apenas para o nível de incorporação mais elevado. A incorporação de ARN não teve qualquer feito na economia da proteína da dieta, tendo afectado negativamente a eficiência de utilização da energia. A redução do teor proteico das dietas diminuiu a eficiência de conversão alimentar, não afectou o crescimento e aumentou significativamente a eficiência de utilização das proteínas.

ABSTRACT

The overall objective of the present work was to study the protein and energy utilization by juveniles seabass (*Dicentrarchus labrax*), in order to formulate diets more appropriate and less pollutant for this species. In this context several studies were made that, in general, included growth, digestibility and metabolic trials.

The first trial aimed to estimate the maintenance protein and energy requirements of juvenile seabass held at 25 °C, by following growth rate and whole body protein and energy modifications or by measuring ammonia excretion and oxygen consumption. Duplicate groups of seabass (mean body weight of 22g) were either kept unfed or fed for 4 weeks an experimental diet at four ration levels: 0.25%, 0.5%, 1% and 1.5% of the body weight. Increasing ration level significantly improved growth performance, daily protein and energy gains. Ration level had little influence on body composition of the whole fish, except for the lipid content, which decreased as feeding level increased. Apparent digestibility coefficients of protein and energy were negatively affected by ration level. Maintenance protein requirement was estimated to be 1.2 g/kg/day based on both approaches. Maintenance energy requirement was estimated to be 98.6 kJ/kg/day based on growth performance, and 57.2 kJ/kg/day based on the metabolic data. The results of this study suggest that both approaches provide good estimations of maintenance protein requirements, although little differences in estimations of maintenance energy requirements were observed.

The aim of the next trial was to study the utilization of dietary protein by seabass juveniles with 5.5 g mean body weight, at two water temperatures: 25 °C and 18 °C. Fish were fed four isoenergetic diets with different protein levels: 36, 42, 48, and 56% (36P, 42P, 48P and 56P diets, respectively), for 12 weeks. At the end of the trial, growth rate, feed intake and feed efficiency were significantly better at the higher water temperature. Within each temperature, specific growth rate and feed efficiency were significantly higher with the 48P and 56P diets than with the other diets. At 25 °C, feed efficiency was also significantly better with the 56P than with the 48P diet. Apparent digestibility coefficients of dry matter, protein and energy significantly improved with the increase of water temperature but within each temperature, there were no significant differences among groups. Within each temperature, at the end of the trial there were no differences among groups in proximate composition of whole fish. Nitrogen retention (g/kg/day) was higher at 25 °C than at 18 °C, but as a percentage of nitrogen intake the inverse was true. Although at 25 °C nitrogen retention (% nitrogen intake) was not different among groups; retention in g/kg/day was significantly higher with the 56P diet than with 36P and 42P diets. On the contrary, at 18 °C nitrogen retention (g/kg/day) was similar among groups, while as a percentage of nitrogen intake it was inversely related to the dietary protein level. Regarding energy utilization, at each temperature there were no differences among dietary treatments on energy retention (g/kg/day). As a percentage of energy intake, energy retention significantly increased with the increase of dietary protein level at 25 °C, while at 18 °C there were no significant differences among groups. Ammonia excretion (mg/kg/day) was significantly higher at 25 than at 18 °C, however as percentage of nitrogen intake there was no significant differences between temperatures. At each temperature, ammonia excretion increased with the increase of dietary protein level, although this effect was only statistically significant with the 56P diet at 18 °C. Oxygen

consumption (g/kg/day) was also significantly higher at 25 than at 18 °C. The results of this study indicate that, regardless of water temperature, the dietary protein requirement for growth seems to be satisfied with a diet containing 48% protein. Growth and feed efficiency were significantly higher at the higher temperature, however, protein utilization was more efficient at the lower temperature.

In order to determine the effect of the dietary lipid level, 4 isonitrogenous diets (48% protein) with increasing dietary lipid levels: 12, 18, 24 and 30% (12L, 18L, 24L and 30L diets, respectively) were fed to triplicate groups of 25 fish (mean body weight of 7g) for 8 weeks. Final body weight of fish fed the 24L diet was significantly higher than that of fish fed the 12L and 30L diets, although no significant differences in specific growth rate were observed among groups. Feed efficiency values for the 30L diet were significantly lower than those for the other diets. The apparent digestibility coefficients (ADC) of dry matter and protein were not affected by diet composition, while ADC of lipid and energy were significantly higher in the 24L and 30L diets. At the end of the growth trial, protein content was significantly higher in fish fed the 12L diet, and lipid and energy contents were significantly lower in fish fed the 12L and 18L diets than in the other groups. Liver lipid content was significantly higher in fish fed the 24L diet than in the other groups. Muscle lipid content was unaffected by dietary lipid level. Nitrogen and energy retention (% intake) values were significantly lower in fish fed the 30L diet than in the other groups. Energy retention (% intake) increased as dietary lipid level increased from 12 to 24%. Lipid retention (% intake) decreased as dietary lipid level increased. Ammonia excretion (mg/kg/day or % nitrogen intake) was inversely correlated to dietary lipid level. Oxygen consumption (g/kg/day) was significantly lower with the 24L and 30L diets than with the other diets. The results of this trial indicate that an increase of dietary lipid level from 12 to 24% did not improve growth performance and feed efficiency of seabass juveniles. The inclusion of 30% of dietary lipid did not depress growth rate, but it significantly reduced protein and energy retention efficiencies.

Another trial was undertaken to study the utilization of carbohydrates under the form of raw (AC) and gelatinized starch (AG). Three isonitrogenous (48% protein) and isolipidic (12% lipids) diets were formulated to contain 25% AC, 25% AG or 12.5% AC + 12.5% AG (diets AC, AG, AC/AG, respectively). Another diet was formulated with no carbohydrates (HP diet; 64% protein; 18% lipid). Each experimental diet was distributed to triplicate groups of 25 fish (mean body weight of 6 g) for 10 weeks. The reduction of dietary protein level from 63 to 50%, by starch incorporation, did not affect the growth rate or protein and energy retentions. For the diets containing starch, specific growth rate was significantly lower for fish fed AG diet than with the other diets and feed efficiency for AC diet was significantly lower than values obtained for the other diets. The apparent digestibility coefficient (ADC) of protein was independent of diet composition and ADC of energy and starch significantly increased with the increase of dietary gelatinized starch level. At the end of growth trial, there were no significant differences in whole body composition among groups. Hepatosomatic and visceral indices of fish fed the AC and HP diets were significantly lower than those obtained with the other diets. The hepatic lipid content of fish fed AG diet was significantly higher than in the other groups. Muscle lipid content was unaffected by diet composition. After 16 hours of fasting, plasma glucose level was identical for all dietary treatments. Nitrogen and energy retentions (g nitrogen or kJ/kg/day) were unaffected by the dietary treatment. However, it was observed a trend to increase nitrogen and energy retention (% nitrogen or energy intake) with the increase of

dietary gelatinized starch level. Ammonia excretion (mg/kg/day) was significantly lower for seabass fed AG diet than for the other groups. There were no significant differences in oxygen consumption (g/kg/day) among the experimental groups, although a trend to decrease oxygen consumption with dietary substitution of raw by gelatinized starch was observed. In conclusion, the total replacement of raw by gelatinized starch significantly reduced growth and feed intake, without affecting protein or energy retentions. Nevertheless, the partial or total replacement of raw by gelatinized starch significantly increased feed efficiency, digestive utilization of diets and significantly reduced ammonia excretion and oxygen consumption.

In order to gain further knowledge on glucose metabolism it was performed a glucose tolerance test with seabream and seabass. Eight groups of 8 seabream (mean body weight=194g) and 8 groups of 8 seabass (mean body weight=133g) were adapted to a practical diet (50% protein; 12% lipids) for 3 weeks and then, after being fasted for 24 h, injected intraperitoneally with 1 g glucose/kg body weight. Blood, liver and muscle samples were collected before fish were injected (time 0) and 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h after the injection. In both species, an increase in plasma glucose level was observed after injection. In seabream, plasma glucose level reached a peak 1-3 h after injection, while in seabass the peak was reached 3-6 h after injection. The peak value was significantly higher in seabream than in seabass. In both species, plasma glucose levels returned to the initial values within 12 h after injection. In seabream, there was a shift in metabolic flux towards an enhanced catabolism of stored body reserves, while in seabass there was an enhancement of anabolism. The results of this study indicate that seabream and seabass were able to restore glucose levels within 12 h after being injected with 1g glucose/kg body weight. Although there were differences between species in the patterns of some parameters analyzed, the basal values were_restored within 24 h after glucose injection. The variation of plasma triacylglycerides and liver glycogen, in both species, suggest that these components may have an important role in glucose regulation.

The last study was performed in order to evaluate the viability of dietary substitution of proteic nitrogen for nonproteic nitrogen (yeast ribonucleic acid (RNA) extract). Four isoenergetic diets were formulated and two of them contained fish meal as the sole nitrogen source (HP and LP diets, respectively with 50 and 39% protein). The RNA extract was added to the LP diet in two different concentrations 6.2 and 12,4% (LP6 and LP12 diets, respectively), which correspond to dietary total nitrogen of 7 and 8%. Triplicate groups of 25 seabass (mean body weight=13g) were fed, each of the experimental diets, for 10 weeks. Specific growth rate was significantly higher with HP and LP diets that with LP12 diet. Feed efficiency was significantly higher with the HP diet than with the other diets, among which no significant differences were observed. No differences in dry matter, nitrogen and energy digestibilities were observed. At the end of the growth trial, whole body composition was unaffected by the diet composition. Hepatosomatic and visceral indices were both significantly lower in fish fed the HP diet than in the other groups. No significant differences in nitrogen retention (g/kg/day) were observed among the experimental groups. However, as a percentage of nitrogen intake, nitrogen retention was significantly higher with the LP diet than with the other diets, for which nitrogen retention was reduced with the increase of dietary RNA level. Energy retention (kJ/kg/day) was significantly lower with the 12LP diet than with the other diets. As a percentage of energy intake, energy retention was significantly lower with 12LP diet than with HP diet. The RNA incorporation although without negatively affecting feed intake or feed efficiency it

significantly reduced growth rate. Nevertheless, this effect was significant only for the highest incorporation level. The dietary RNA incorporation had no protein sparing effect and reduced significantly energy retention. The reduction of dietary protein level reduced feed efficiency, did not affect growth rate and significantly increased protein utilization efficiency.

RÉSUMÉ

Le présent travail a pour objectif de contribuer à la meilleure compréhension de l'utilisation des protéines et de l'énergie chez le juvenile de bar (*Dicentrarchus labrax*), afin de formuler régimes plus appropriés et moins polluantes pour cette espèce. Dans ce contexte générale, plusieurs études ont été réalisées, notament des expériences de croissance, de digestibilité des nutriments et de l'énergie et de calorimétrie indirecte.

L'objectif du premier travail a été l'estimation du besoin d'entretien en protéine et énergie chez le bar, à une temperature de 25 °C, en tenant compte du taux de croissance et de la variation de la teneur corporelle en protéine et énergie des poissons et en mesurant la consommation d'oxygène et l'excretion de ammoniaque. Dix groupes de poissons avec un poids moyen de 22 g ont été constitués. Pendant les 4 semaines de duration de l'expérience, chaque deux groupes sont maintenues soit à jeûne, soit nourris avec un régime expérimental selon quatre taux de rationnement journalier : 0.25 %, 0.5 %, 1% et 1.5% du poids vif. L'augmentation de la ration journalière a augmenté significativement les performances de croissance et la retention journalière de la protéine et de l'énergie. La composition corporelle n'a pas été significativement influencée par le taux de rationnement journalier, excepté la teneur en lipide qui a augmentée avec l'augmentation de la ration journalière. La digestibilité apparente des protéines et de l'énergie a été négativement affectée par la ration journalière. Le besoin d'entretien en protéine a été estimée à 1.2 g/kg/jour basé sur les deux approches. Le besoin d'entretien en energie a été estimée à 98.6 kJ/kg/jour basé sur la performance de croissance, et à 57.2 kJ/kg/jour basé sur les paramètres métaboliques. Les résultats de cette étude suggèrent que les deux approches fournissent une estimation similaire du besoin d'entretien en protéine, mais presentent des legères différences dans l'estimation du besoin d'entretien en energie.

Afin d'évaluer l'utilisation de la protéine alimentaire à deux températures de l'eau 25 et 18 °C, 4 régimes isoénergétiques avec 36, 42, 48 et 56% de protéine (respectivement les régimes 36P, 42P, 48P et 56P) ont été formulés. Chaque régime a été testé en triplicat sur des groupes de 25 bars (poids moyen de 5.5 g), pendant 12 semaines. Le taux de croissance et l'efficacité alimentaire ont été significativement améliorés avec l'élevation de la température de l'eau. A chaque température, la croissance et l'efficacité alimentaire étaient significativement plus élevés avec les régimes 48P et 56P qu'avec les autres régimes. A 25 °C, efficacité alimentaire était aussi significativement meilleure avec le régime 56P par rapport au régime 48P. La digestibilité apparente de la matiére séche, protéine et énergie a été significativement améliorée par l'augmentation de la température d'eau mais, a chaque température, il n'y a pas de différences significatives entre les groupes. La composition corporelle des poissons entiers à la fin de la période expérimentale n'a pas été affectée par les différents régimes alimentaires, et cela independamment de la température d'élevage. La rétention azotée (g/kg/jour) a été plus élevée à 25 °C qu'à 18 °C. Cependant, si exprimée en % d'azote ingéré l'inverse est vrai. A 25 °C la rétention azotée (% azote ingéré) n'était pas différente entre les groupes, mais si exprimée en g/kg/jour elle a été significativement plus élevée avec le régime 56P par rapport aux régimes 36P et 42P. Par contre, à 18 °C la retention azotée (g/kg/jour) a été similaire entre les groupes, mais en pourcentage d'azote ingéré elle a variée inversement avec le taux protéique de l'aliment. Pour chaque température, l'énergie retenue (g/kg/jour) n'a pas été influencée par

l'aliment. Exprimée en % d'énergie ingérée, la rétention d'énergie a augmentée significativement avec l'augmentation de niveau protéique de l'aliment à 25 °C, mais à 18 °C, il n'y avait pas de différences significatives entre les groupes. L'excrétion d'ammoniaque (mg/kg/jour) a été significativement plus élevée à 25 qu'à 18 °C, cependant si exprimée en % d'azote ingéré il n'y a pas eut de différences significatives entre les deux températures d'élevage. A chaque température, l'excrétion d'ammoniaque a augmentée avec l'élevation du niveau protéique de l'aliment, bien que cette effet était significatif seulement avec le régime 56P à 18 °C. La consommation d'oxygène (g/kg/jour) a été aussi significativement plus élevée à 25 qu'à 18 °C. À 25 °C la consommation d'oxygène n'est pas significativement influencée par le aliment, cependant, à 18 °C elle était plus faible avec le régime 36P par rapport aux régimes 42P et 56P. Les résultats de cet étude montrent, que indépendamment de la température d'eau, le besoin en protéine pour la croissance semble être satisfait avec un régime qui contient 48% de protéine. L'utilisation de la protéine étant plus efficace à 18 qu'à 25 °C.

Le travail suivant visait l'étude de l'effet du taux lipidique des aliments. Quatre régimes isoprotéiques (48 % de protéine) avec 12, 18, 24 et 30% des lipides (respectivement régimes 12L, 18L, 24L et 30L) ont été formulés. Chaque régime a été distribué en triplicat a des groupes de 25 bars (poids moyen de 7g) pendant 8 semaines. Le poids final des poissons nourris avec le régime 24L était significativement plus élevée que celui de ceux nourris avec les régimes 12L et 30L, mais le taux de croissance n'a pas été significativement influencé. L'efficacité alimentaire du régime 30L était significativement plus faible que ceux des autres régimes. La digestibilité apparente de la matiére séche et de la protéine n'a pas été affectée par le régime alimentaire, mais la digestibilité apparente des lipides et de l'énergie était significativement plus élevée avec les régimes 24L et 30L. A la fin de l'essai de croissance, la teneur en protéine corporelle était significativement plus élevée dans les poissons nourris avec le régime 12L et la teneur en lipides et en énergie était significativement plus faible dans les bars nourris avec les régimes 12L et 18L. La teneur en lipides du foie était significativement plus élevée chez les poissons recevant le régime 24L par rapport à tout les autres groupes. La teneur en lipides du muscle n'a pas été affecté par le niveau lipidique du régime. La rétention azotée et énergétique (% azote ou energie ingérée) étaient significativement plus faible avec le régime 30L par rapport aux autres régimes. La rétention énergétique (% energie ingérée) a augmentée avec l'élevation du taux en lipides de l'aliment de 12 à 24% et la rétention lipidique (% lipides ingérés) a diminuée avec l'augmentation du niveau lipidique du régime. L'excrétion d'ammoniaque (mg/kg/jour où % azote ingéré) a diminuée significativement avec l'augmentation du niveau lipidique du régime. La consommation d'oxygène (g/kg/jour) a été significativement plus faible avec les régimes 24L et 30L qu'avec les autres régimes. Les résultats de ce travail indiquent qu'une augmentation du niveau lipidique du régime de 12 à 24% n'a pas améliorée les performances de croissance ou l'efficacité alimentaire. Bien que l'inclusion de 30% des lipides n'ait pas influencée significativement la taux de croissance, on observe que cela réduit significativement l'efficacité alimentaire et la rétention protéique et énergétique.

Dans le travail suivant, l'objective a été d'étudier l'utilisation des glucides alimentaires, soit sous la forme de amidon cru (AC), soit gélatinisé (AG). Trois régimes isoprotéiques (48% de protéine) et isolipidique (12% lipides) ont été formulés, de façon à contenir 25% AC, 25% AG où 12,5% AC+12.5 % AG (régimes AC, AG et AC/AG, respectivement). Un autre régime sans glucides a été formulé (régime HP: 64% protéine; 18% lipides). Chaque régime a été testé en triplicat sur groupes de 25 bars (poids moyen de 6g) pendant 10 semaines. La

réduction du taux protéique du régime de 63 à 50%, par l'incorporation de amidon, n'a pas affectée la croissance du bar ou la rétention protéique et énergétique. Pour les régimes avec l'incorporation de l'amidon, le taux de croissance a été significativement plus faible avec le régime AG qu'avec les autres régimes et l'efficacité alimentaire était significativement plus faible avec le régime AC qu'avec les autres régimes. La digestibilité apparente de la protéine était indépendante de la composition du régime et la digestibilité apparente de l'énergie et de l'amidon a augmentée significativement avec le remplacement de l'AC par l'AG. A la fin de l'expérience, la composition corporelle des poissons n'a pas été affectée par les différents régimes alimentaires. Les rapports hépatosomatique et viscèrosomatique et la teneur en glycogène du foie dans les bars nourris avec les régimes AC et HP étaient significativement plus faibles que ceux observés dans les autres groupes. La teneur en lipides du foie était significativement plus élevée dans les bar nourries avec le régime AG que dans les autres groupes. La teneur lipidique du muscle n'a pas été affectée par les différentes régimes alimentaires. Après 16 heures de jeûne, le niveau de glucose plasmatique était identique pour les différents régimes. La rétention azotée et énergétique (g ou kJ/kg/jour) n'a pas été affectée par les régimes alimentaires. Cependant, on a observée une tendance vers l'augmentation de la rétention azotée et énergétique (% azote ou énergie ingérée) avec l'augmentation du niveau d'AG du régime. L'excrétion d'ammoniaque (mg/kg/jour) a été significativement plus faible avec le régime AG qu'avec les autres régimes. La consommation d'oxygène (g/kg/jour) n'a pas été significativement affectée par les régimes alimentaires, bien qu'il existe une tendance vers la diminution avec le remplacement de l'AC par l'AG. En conclusion, le remplacement total de l'AC par de l'AG diminue significativement la croissance et l'ingestion alimentaire, mais sans affecter la retention protéique et énergétique. Cependant, le remplacement partiel ou total de l'AC par de l'AG a significativement augmenté l'efficacité alimentaire et l'utilisation digestive du régime et a diminué significativement l'excretion d'ammoniaque et la consommation d'oxygène.

Ensuite il y a été realisé un teste de tolérance du glucose chez le bar et la daurade afin de contribuer à une meilleure connaissance sur le métabolisme de glucose. Huit groupes de 8 daurades (poids moyen de 194g) et 8 groupes de 8 bar (poids moyen de 133g) ont été adaptés à un régime alimentaire (50% protéine; 12% lipides) pendant 3 semaines. Après 24 heures de jeûne, les poissons ont été injectés intraperitonealment avec 1 g de glucose/kg poids vif. Échantillons de sang, du foie et du muscle ont été recueillis avant (temps 0) et 1, 3, 6, 12, 24, 48 et 72 heures après l'injection. Chez les deux espèces, une augmentation du niveau de glucose plasmatique a été observée après l'injection. Le niveau de glucose plasmatique a atteint un pic 1-3 heures après l'injection chez la daurade et 3-6 heures chez le bar. La valeur du pic était significativement plus élevée chez la daurade que chez le bar. Chez les deux espèces, le niveau de glucose plasmatique a retourné aux valeurs initiales dans les 12 heures suivant l'injection. Chex la daurade, l'injection de glucose a induit une augmentation du catabolism des réserves corporelles et chez le bar a stimulée le anabolism. Les résultats de cette étude indiquent que la daurade et le bar peuvent restaurer les niveaux de glucose dans les 12 heures que suivent l'injection de 1g de glucose/kg poids vif. Ces données suggèrent aussi que les triacyglycérides plasmatiques et le glycogène hépatique puissent être relationés avec le méchanisme de régulation du glucose plasmatique dans les deux espèce.

La dernière étude avait pour but d'évaluer la possibilité de remplacement de l'azote protéique par de l'azote non protéique (extrait l'acide ribonucleique (ARN) de ferment) dans les aliments. Quatre régimes isoénergétiques

ont été formulés. Deux régimes contenant de la farine de poissons comme unique source protéique (régimes HP et LP, respectivement avec 50 et 39% de protéine) et deux autres régimes où l'extrait d'ARN a été ajouté au régime LP, à deux concentrations différentes: 6.2 et 12.4% (régimes LP6 et LP12, respectivement). Le contenu en azote total des ceux deux derniers régimes était 7 et 8%, respectivement. Chaque régime a été distribué en triplicat a des groupes de 25 bars (poids moyen de 13g) pendant 10 semaines. Le taux de croissance spécifique a été significativement plus élevée avec les régimes HP et LP par rapport a la croissance observée avec le régime LP12. L'efficacité alimentaire était significativement plus élevée avec le régime HP qu'avec les restant régimes, pour lesquels il n'y a pas eut des différences significatives entre eux. La digestibilité apparente de la matière sèche, de l'azote et de l'énergie n'a pas été affectée par les traitements expérimentaux. A la fin de l'expérience de croissance, la composition corporelle du bar n'a pas été significativement affectée par les régimes alimentaires. Les rapports hépatosomatique et viscèrosomatique des poissons nourris avec le régime HP ont été significativement plus faibles que ceux observés chez les autres groupes. La retention azotée (g/kg/jour) était similaire chez les différentes groupes expérimentaux, mais si exprimée par % d'ingéré, la retention azotée était significativement plus élevée avec le régime LP qu'avec les autres régimes. Pour ces régimes, la retention azotée a diminué avec l'augmentation de l'incorporation d'ARN. La retention de l'énergie (kJ/kg/jour) a été significativement plus faible avec le régime LP12 par rapport aux autres régimes et en pourcentage de l'énergie ingérée il était significativement plus faible avec le régime LP12 qu'avec le régime HP. L'incorporation de l'extrait d'ARN bien que sans affecter négativement l'ingestion volontaire ou l'efficacité alimentaire a diminuée significativement le taux de croissance. Cependant, cette effect a été significatif seulement pour le niveau le plus élevé d'incorporation. L'incorporation d'ARN n'a pas eut un effect d'épargne des protéines alimentaires et a affectée négativement la retention de l'énergie. La réduction du taux protéique des régimes a diminuée l'efficacité alimentaire, n'a pas affectée la croissance et a augmentée l'efficacité d'utilisation des protéines.

ÍNDICE GERAL

RESUMO 6

ABSTRACT 10

RÉSUMÉ 14

1. INTRODUÇÃO GERAL 22

1.1. OBJECTIVOS E INTERESSES DO ESTUDO 23

1.2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ROBALO 27

1.3. NUTRIÇÃO DE PEIXES MARINHOS 30

1.3.1. Proteína e aminoácidos 30

1.3.2. Lípidos 38

1.3.3. Hidratos de carbono 47

1.3.4. Energia 53

1.4. NUTRIÇÃO, AQUACULTURA E AMBIENTE 57

2. METODOLOGIA GERAL 62

2.1. MATERIAL ANIMAL 63

2.2. ENSAIOS DE CRESCIMENTO 63

2.2.1. Instalações experimentais 63

2.2.2. Protocolo experimental 64

2.3. ENSAIOS DE DIGESTIBILIDADE 66

2.3.1. Instalações experimentais 66

2.3.2. Protocolo experimental 67

2.4. ENSAIOS DE METABOLISMO 71

2.4.1. Instalações experimentais 71

2.4.2. Protocolo experimental 71

2.5. DIETAS EXPERIMENTAIS 74

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS 76

2.6.1. Preparação das amostras 76

2.6.2. Técnicas analíticas para avaliação da composição das dietas, carcaças e fezes 77

2.6.2.1. Humidade 77

2.6.2.2. Cinzas 77

2.6.2.3. Proteína bruta 77

2.6.2.4. Azoto não proteico 78

2.6.2.5. Aminoácidos 78

2.6.2.6. Lípidos 78

2.6.2.7. Amido *78*
2.6.2.8. Óxido de crómio *78*
2.6.2.9. Energia bruta *78*
2.6.3. Técnicas analíticas para avaliação da composição do fígado, músculo e plasma 79
2.6.3.1. Proteína total *79*
2.6.3.2. Lípidos totais *79*
2.6.3.3. Glicogénio *79*
2.6.3.4. Aminoácidos totais no plasma *79*
2.6.3.5. Glucose plasmática *79*
2.6.3.6. Triglicerídeos plasmáticos *79*
2.6.4 Técnicas analíticas para avaliação da água dos tanques 79
2.6.4.1 Oxigénio *79*
2.6.4.2 Amónia *80*
2.7 DEFINIÇÃO DOS TERMOS UTILIZADOS 80
2.7.1 Peso Médio 80
2.7.2 Ganho de Peso 80
2.7.3. Taxa de Crescimento Específico 80
2.7.4. Unidade Térmica de Crescimento 80
2.7.5. Eficiência de Conversão Alimentar 81
2.7.6. Coeficiente de Eficácia Proteica 81
2.7.7. Coeficiente de Utilização Digestiva Aparente 81
2.7.8. Taxa de Retenção 81
2.7.9. Índice Hepatossomático 82
2.7.10. Índice Visceral 82
2.7.11. Balanço Energético 82
2.7.12. Balanço Azotado 83
2.7.13. Proporção da Energia Proteica Despendida no Metabolismo Energético Total 84
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA 85

3. NECESSIDADES PROTEICAS E ENERGÉTICAS DE MANUTENÇÃO 86
3.1. INTRODUÇÃO 87
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 89
3.2.1. Ensaios de crescimento e de digestibilidade 89
3.2.2. Ensaio de metabolismo 91
3.3. RESULTADOS 91
3.3.1. Crescimento e digestibilidade 91
3.3.2. Ensaio de metabolismo 96
3.3.3. Necessidades proteicas e energéticas de manutenção 100
3.4. DISCUSSÃO 102

4. Influência da Temperatura na Utilização da Proteína 106
4.1. Introdução 107
4.2. Material e métodos 109
4.2.1. Dietas experimentais 109
4.2.2. Ensaio de crescimento 109
4.2.3. Ensaio de digestibilidade 111
4.2.4. Ensaio de metabolismo 112
4.2.5. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais 113
4.3. Resultados 114
4.3.1. Ensaio de crescimento e de digestibilidade 114
4.3.2. Ensaio de metabolismo 121
4.3.3. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais 131
4.4. Discussão 137

5. Efeito do Nível de Inclusão Lipídica da Dieta 150
5.1. Introdução 151
5.2. Material e métodos 152
5.2.1. Dietas experimentais 152
5.2.2. Ensaio de crescimento 154
5.2.3. Ensaio de digestibilidade 155
5.2.4. Ensaio de metabolismo 155
5.3. Resultados 156
5.3.1. Ensaios de crescimento e de digestibilidade 156
5.3.2. Ensaio de metabolismo 162
5.4. Discussão 169

6. Efeito da Disponibilidade dos Hidratos de Carbono da Dieta 176
6.1. Introdução 177
6.2. Material e métodos 178
6.2.1. Dietas experimentais 178
6.2.2. Ensaio de crescimento 180
6.2.3. Ensaio de digestibilidade 181
6.2.4. Ensaio de metabolismo 181
6.3. Resultados 182
6.3.1. Ensaio de crescimento e de digestibilidade 182
6.3.2. Ensaio de metabolismo 188
6.4. Discussão 196

7. ENSAIO DE TOLERÂNCIA À GLUCOSE NA DOURADA E NO ROBALO 202
7.1. INTRODUÇÃO 203
7.2. MATERIAL E MÉTODOS 204
7.3. RESULTADOS 205
7.4. DISCUSSÃO 211

8. EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE AZOTO PROTEICO POR AZOTO NÃO PROTEICO NA DIETA 214
8.1. INTRODUÇÃO 215
8.2. MATERIAL E MÉTODOS 217
8.2.1. Dietas experimentais 217
8.2.2. Ensaio de crescimento 217
8.2.3. Ensaio de digestibilidade 219
8.3. RESULTADOS 219
8.4. DISCUSSÃO 226

9. CONCLUSÕES 232

10. BIBLIOGRAFIA 240

LISTA DAS ESPÉCIES DE TELEÓSTEOS CITADAS NO TEXTO 264

1. Introdução Geral

1.1. Objectivos e interesses do estudo

Durante séculos prevaleceu a noção dos oceanos como uma fonte piscícola inesgotável. Hoje em dia, os conhecimentos científicos existentes demonstram que esta ideia é errada, isto é, a abundância está a dar lugar à escassez. Neste contexto, a produção aquícola tem-se vindo a afirmar, cada vez mais, como um complemento à exploração dos recursos piscícolas naturais. Entre 1984 e 1997, a produção mundial do sector aquícola praticamente quadruplicou, sendo inclusivamente o sistema de produção de alimentos com o crescimento mais rápido do mundo (figura 1.1) (FAO, 1997).

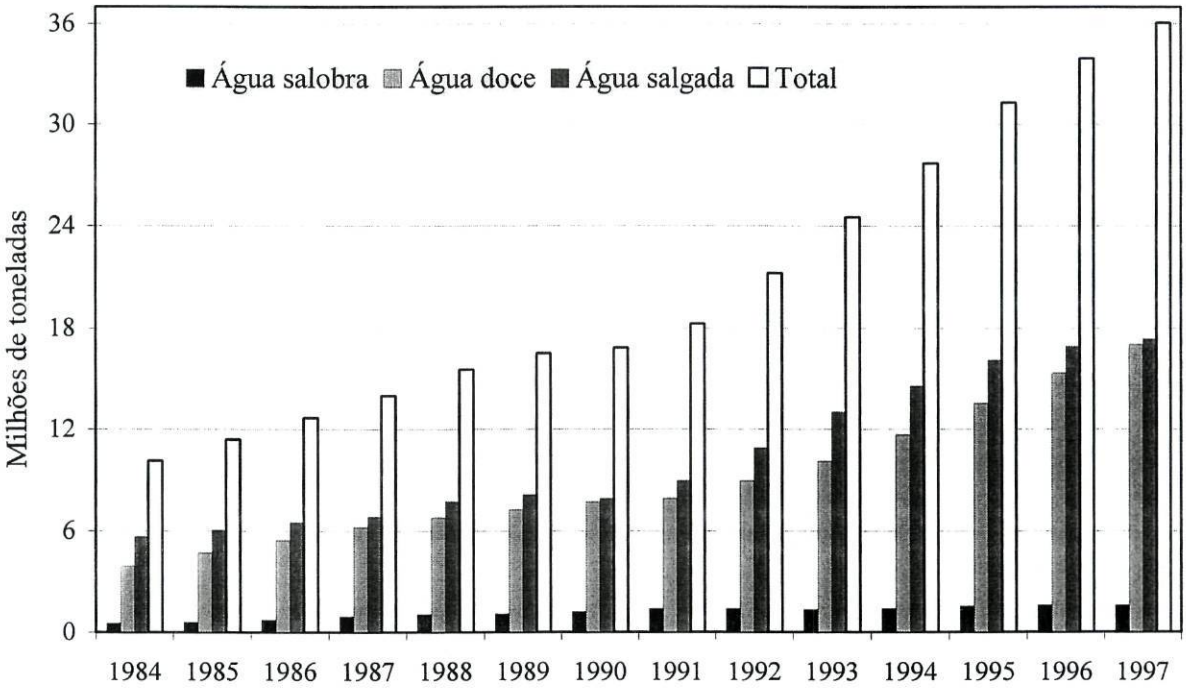


Figura 1.1 Produção mundial em aquacultura por tipo de ambiente (milhões de toneladas) (FAO, 1997).

A produção aquícola dos países mediterrânicos apresentou um crescimento muito elevado num período inferior a uma década. De facto, em 1995 totalizou 31 000 toneladas, igualmente divididas entre a dourada (*Sparus aurata*; 50 %) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*; 48 %), prevendo-se que no ano 2000 a produção destas espécies ultrapasse as 50 000 toneladas (FAO, 1997). Em Portugal, a aquacultura marinha era, até há pouco tempo, uma indústria tradicional, praticada em regime extensivo de policultura nas salinas do centro e sul do país (Gouveia, 1994). A partir dos anos 90, a produção de espécies de água salgada, nomeadamente a dourada, o robalo e o rodovalho (*Scophthalmus maximus)*, tem aumentado significativamente, para o que contribuiu, em grande parte, a entrada em funcionamento de novas unidades de produção e a modernização das existentes, possíveis pelos incentivos financeiros do Programa para o Desenvolvimento Económico de Sector das Pescas (PROPESCAS).

A grande apetência para a produção do robalo em Portugal deve-se à expectativa da manutenção do seu grande valor comercial nos próximos anos e à garantia de obtenção de juvenis necessários para a engorda, possível pela existência de "hatcheries" com domínio da tecnologia necessária para a produção de juvenis em número suficiente e a preços competitivos. A produção de robalo é feita maioritariamente em regime intensivo ou semi-intensivo, concentrada nas regiões centro e sul do país, nomeadamente na ria de Aveiro, na Figueira da Foz, nos estuários do Sado e do Tejo e no Algarve.

Em aquacultura intensiva, as características do alimento são um dos factores condicionantes da produtividade. O alimento deve proporcionar as melhores performances zootécnicas, considerar a protecção ambiental e garantir a qualidade do produto final. Para a formulação de alimento deste tipo é necessário ter-se um bom conhecimento das necessidades nutricionais da espécie considerada e da utilização dos nutrientes. No entanto, apesar do crescente número de espécies com interesse comercial, tais especificações estão definidas apenas para um número restrito de espécies, sobretudo de água doce. Uma recente compilação das necessidades quantitativas dos mais de quarenta nutrientes essenciais, mostra claramente que os dados referentes às espécies marinhas são bastante limitados (NRC, 1993). O estado actual do conhecimento da nutrição dos peixes marinhos disponibiliza pouco mais do que dados preliminares sobre algumas das necessidades nutricionais e sobre o efeito de certos factores abióticos nessas necessidades.

Para o robalo, os alimentos compostos, actualmente em uso, são formulados recorrendo a dados obtidos em estudos antigos (Alliot et al., 1974, 1979 a, 1984; Alliot e Pastoureaud, 1984; Hidalgo et al., 1987a; Hidalgo e Alliot, 1988), apesar de nos últimos dez anos ter-se assistido a uma evolução considerável no que diz respeito à nutrição de espécies dulciaquícolas, particularmente dos salmonídeos (NRC, 1993; Kaushik e Médale, 1994; Kaushik, 1995a; Azevedo et al., 1998; Sargent et al., 1999a). Todavia, os estudos sobre a nutrição de espécies marinhas, como o robalo e a dourada, não acompanharam tal evolução. A título de exemplo, enquanto que as necessidades proteicas da dourada foram inicialmente estimadas em 40% por Luquet e Sabaut (1974), um estudo recente demonstrou que o crescimento máximo só era atingido com teores proteicos na dieta de pelo menos 48% (Santinha et al., 1996). Deste modo, justifica-se uma reavaliação das necessidades nutricionais, assim como o aprofundar do conhecimento sobre a utilização dos nutrientes e da energia nestas espécies.

A piscicultura, como qualquer outro tipo de produção animal, tem um impacto directo no meio ambiente, nomeadamente através das perdas de material não digestível das dietas e dos produtos finais do metabolismo. Estas perdas estão directamente relacionadas com a qualidade do alimento e a gestão da alimentação. A aplicação de estratégias nutricionais que permitam reduzir as perdas de origem alimentar é, pois, de grande interesse tanto para os produtores como para a administração. Estas perdas relacionadas com o alimento foram bem estudadas em salmonídeos, tendo a indústria de alimentos compostos e os produtores tirado largos benefícios da informação obtida. Contudo, para os peixes marinhos não existe informação consistente nesta área, o que faz com que não seja possível estimar correctamente as perdas digestivas e metabólicas dos peixes em relação à quantidade e qualidade do alimento. Isto dificulta não só uma estimativa fiável da capacidade de carga das pisciculturas, como também o estabelecimento de modelos preditivos do impacto ambiental das explorações.

Deste modo, pensamos ser plenamente justificado e estarem reunidas as condições para a realização de um trabalho de investigação, que contribua para um melhor conhecimento da utilização das proteínas e da energia por juvenis de robalo. Assim sendo, espera-se obter dados que contribuam para a formulação de dietas mais equilibradas e menos poluentes para a espécie em questão.

O tipo de aproximação experimental utilizada neste trabalho foi simultaneamente zootécnica e metabólica. Os estudos zootécnicos permitem a obtenção de dados fundamentais sobre a resposta global do organismo ao alimento fornecido, nomeadamente sobre o crescimento, a utilização do alimento e a composição corporal dos animais. Os ensaios de metabolismo permitem uma melhor compreensão sobre a utilização, a nível metabólico, da proteína e da energia. Os ensaio de metabolismo também fornecem informação sobre a excreção de amónia e o consumo de oxigénio por unidade de alimento ingerido, com aplicação prática na gestão da água de uma piscicultura e na estimativa da carga poluente dos efluentes piscícolas.

O estudo do teor proteico óptimo de uma dieta é geralmente considerado prioritário relativamente aos restantes nutrientes, atendendo não só às suas implicações no crescimento mas também devido ao elevado preço das fontes proteicas. Deste modo, o primeiro objectivo deste trabalho foi:

- **estimar as necessidades proteicas e energéticas de manutenção do robalo**
- **estudar a influência da temperatura da água na utilização da proteína**
- **estimar o perfil das necessidades de aminoácidos essenciais do robalo.**

Uma vez que a relação proteína digestível/energia digestível da dieta influencia significativamente a utilização do alimento (Cho e Kaushik, 1990) e com base nos resultados obtidos no trabalho anterior, investigou-se a utilização da energia e de fontes energéticas das dietas através dos seguintes estudos:

- **efeito do nível de inclusão lipídica da dieta**
- **efeito da disponibilidade dos hidratos de carbono da dieta**
- **teste de tolerância à glucose.**

Num estudo complementar, procurou-se avaliar em que medida seria possível a substituição do azoto proteico por azoto não proteico em dietas para o robalo, pelo que investigou-se:

- **o efeito da substituição da proteína por um extracto de ácido ribonucleico na dieta.**

1.2. Considerações gerais sobre a produção de robalo

O robalo (*Dicentrachus labrax* L., 1758) é um teleósteo relativamente abundante no mar Mediterrâneo, na costa este do Atlântico entre a Europa e o Norte de África, nos mares da Irlanda, do Norte e do Báltico. Habita preferencialmente nas zonas costeiras pouco profundas, de águas batidas e bem oxigenadas, apesar de poder ser encontrado, durante a fase de juvenil, em águas salobras mais protegidas (Serrano-Gordo, 1989; Barnabé, 1990; Coves et al., 1991).

O robalo é uma espécie rústica, euritérmica e eurialina, pelo que é encontrada em condições de temperatura e salinidade muito diversas. Esta espécie frequenta águas cuja temperatura oscila entre 4 e 6 °C no Inverno e 32 °C no Verão, podendo a sua salinidade variar entre 0,5 e 90 ‰ (Chervinki, 1975; Barnabé, 1990). Contudo, variações bruscas, quer de temperatura quer de salinidade, afectam significativamente a sua capacidade de adaptação, podendo inclusivamente resultar na morte (Haddj-Kacem et al., 1987; Dalla Via et al., 1989).

A maturidade sexual do robalo é atingida mais cedo nos machos do que nas fêmeas e mais cedo no Mediterrâneo do que no Atlântico (2 - 3 anos para o macho e 3 - 4 anos para a fêmea no Mediterrâneo; 3 - 5 anos para o macho e 5 - 8 anos para a fêmea no Atlântico). A postura ocorre uma vez por ano, entre Dezembro e Março, em águas com temperatura inferior a ± 14 °C (Aston, 1981).

O robalo é um carnívoro voraz, cuja dieta natural varia com o tamanho, a idade e a distribuição local e sazonal das presas que, durante as fases juvenil e adulta, são constituídas maioritariamente por crustáceos e peixes (Léauté, 1986; Picket e Pawson, 1994). A temperatura influencia significativamente a ingestão de alimento, a qual cessa cerca dos 7 °C (Barnabé, 1990).

Sendo um peixe muito apreciado e de elevado valor comercial, já no século passado procedia-se à captura de juvenis para serem estabulados nos lagos costeiros de alguns países mediterrânicos. Uma progressiva diminuição dos efectivos provenientes da pesca veio

justificar e incentivar a sua produção intensiva, passando a ser um dos poucos peixes marinhos produzidos em grande escala na Europa (Coves et al., 1991). Para tal, contribuiu grandemente o desenvolvimento de técnicas de controlo e de gestão da reprodução e da fase larvar (Zoar et al., 1984).

Na Europa, o robalo é produzido não só em regime semi-intensivo (em meio natural protegido) como também em regime intensivo. O robalo produzido em aquacultura é valorizado como produto fresco e é vendido inteiro como dois produtos distintos: o robalo porção, com 350 a 400 g, obtido durante o segundo ano de engorda, e o robalo de 800 g a 1 kg, obtido durante o terceiro ano (CNEXO, 1983).

Em cativeiro, a produção de ovos e larvas é possível durante todo o ano, mediante a indução hormonal ou a gestão da temperatura e do fotoperíodo. Apesar da desova ser induzida, a expulsão dos ovos (180 000 ovos/kg peso corporal da fêmea) e a fertilização ocorrem naturalmente. Os ovos (1,3 a 1,5 mm) são recolhidos na superfície da água, tratados com uma solução à base de iodo e incubados, com uma densidade óptima de 5 000 a 10 000 ovos/litro. As larvas são alimentadas a partir do 6° dia com alimento vivo (rotíferos e artémia), cujo tamanho é ajustado ao tamanho da boca das larvas, e a partir do 50° dia apenas com alimento artificial.

No final do período larvar e de adaptação ao alimento composto (± 60 dias), os alevins (peso < 0,1 g) são transferidos dos tanques de produção larvar para os tanques de alevinagem, onde permanecem cerca de 60 a 90 dias, dependendo da temperatura, até atingirem 2 a 3 g de peso vivo. Durante a fase de alevinagem, a temperatura óptima é de 18 a 20 °C, o oxigénio não deve ser inferior a 80 % de saturação e a densidade óptima é de 4 alevins/litro. Ainda durante esta fase, o comportamento dos robalos é muito agressivo, pelo que deve-se proceder a triagens quinzenais, de modo a evitar fenómenos de canibalismo e de dominância.

No início da Primavera, os juvenis de robalos (2 – 3g) são transferidos para tanques exteriores ou jangadas, onde permanecem até atingirem 50g de peso vivo. De seguida, são transferidos para os tanques de engorda, onde permanecem cerca de um a dois anos, até atingirem o tamanho comercial. A engorda é realizada em jangadas (densidade óptima de 15

a 18 kg/m^3, de acordo com a qualidade e a renovação da água pela corrente) ou em tanques (densidade óptima 10 kg/m^3).

Durante as fases de pré-engorda e engorda, o intervalo de temperatura e salinidade óptimo para o crescimento desta espécie é, respectivamente, de 23 a 25 °C e de 30 a 35 ‰ (Aston, 1981). Os seus requisitos em oxigénio são bastante elevados, sendo a concentração mínima aconselhada de 4,5 mg/litro ou 90% da saturação, apesar de não terem sido registados efeitos adversos quando os níveis de oxigénio atingem os 3 mg/litro (Barnabé, 1990).

De referir que nos sistemas de produção intensiva de robalo a densidade de peixes nos tanques é geralmente elevada e as renovações de água são muitas vezes reduzidas. Nestas condições, os peixes podem ficar expostos a elevadas concentrações de amónia na água, sobretudo nos períodos pós-prandiais. Para os juvenis de robalo, as concentrações letais (96-h LC 50s) são de 1,3 - 2,6 mg NH_3.N/litro (76 - 153 μmol/litro), valores relativamente elevados quando comparados com as concentrações de toxicidade crónica: 0,1 - 0,4 mg NH_3.N/litro (6 - 23 μmol/litro) (Person Le-Ruyet et al., 1995, 1997 e 1998).

As dietas actualmente em uso para o robalo são apresentadas sob a forma de grânulos secos e o nível corrente de fornecimento varia entre 1,5% (14 – 16 °C) e 2,5% (24 – 26°C), da biomassa (Barnabé, 1990). Os teor proteico da dieta é de cerca de 50% e o teor lipídico ronda os 12% da dieta (Alliot e Pastoureaud, 1984). Em condições de produção bem controladas, a eficiência de utilização do alimento (ganho de peso fresco / peso seco do alimento ingerido) varia entre 0,24 a 0,74 e a taxa de crescimento específico entre 0,3 a 1,7, dependendo estes parâmetros essencialmente da temperatura da água, do tamanho do animal e da composição das dietas (tabela 1.1).

Tabela 1.1. Dados bibliográficos referentes ao crescimento e utilização do alimento no robalo.

Referência	Peso individual (g)	Temperatura °C	TCE[1] %	ECA[2]
Alliot et al. (1979a)	6	18	0,32 – 0,91	0,19 – 0,64
Métailler et al. (1981)	75	19	0,43 – 0,50	0,42 – 0,50
Hidalgo e Alliot (1988)	31	15	0,25 – 0,44	0,24 – 0,48
Hidalgo e Alliot (1988)	37	20	0,55 – 0,92	0,34 – 0,64
Spyridakis (1989)	13	18	0,52 – 0,66	0,40 – 0,50
Tibaldi et al. (1991)	19	20	1,18 – 1,32	0,48 – 0,56
Ballestrazzi et al. (1994)	75	26	0,58 – 0,68	0,51 – 0,60
Peres (1995)	10	20	1,54 – 1,66	0,63 – 0,70
Morales e Oliva-Teles (1995)	4	20	1,02 – 1,12	0,50 – 0,60
Pérez et al. (1997)	2	28	1,82 – 2,05	0,38 – 0,74
Dias et al. (1998)	6	18	0,77 – 0,86	0,59 – 0,75
Ballestrazzi et al. (1998)	80	23	0,60 – 0,74	0,61 – 0,73

[1]Taxa de crescimento específico

[2]Eficiência de conversão alimentar

1.3. Nutrição de peixes marinhos

1.3.1. Proteína e aminoácidos

As necessidades proteicas consideradas óptimas para o crescimento de várias espécies marinhas e de salmonídeos são apresentadas na tabela 1.2 (Kaushik, 1997a). Uma vez que a qualidade da proteína da dieta e a relação proteína digestível/energia digestível da dieta influenciam significativamente a utilização do alimento, os valores da literatura foram recalculados de modo a serem expressos não só em percentagem da dieta, mas também em termos absolutos (g /kg peso corporal ou por kg de peso ganho).

As dietas usadas em maricultura contêm, em geral, taxas proteicas superiores às das espécies dulciaquícolas, conforme o exposto na tabela 1.2. No entanto, actualmente ainda é pouco claro se estas diferenças representam diferenças reais nas necessidades metabólicas. Com efeito, dada a falta de dados científicos sobre a nutrição destas espécies, tal facto poderá ser imputado a problemas de ordem metodológica, tais como a baixas taxas de crescimento e de ingestão de alimento ou à não adequação da dieta em termos de perfil aminoacídico ou da relação proteína digestível/energia digestível (Kaushik, 1995a).

Tabela 1.2. Necessidades proteicas de alguns espécies de juvenis de peixes marinhos e de salmonídeos[1].

Espécie	% PD dieta	g/kg PV/dia	g/kg peso ganho	PD/ED[2]
Robalo (*Dicentrarchus labrax*)	40-48	7-10	600-800	21-24
Dourada (*Sparus aurata*)	40-48	7-10	560-780	21-24
Dentex (*Dentex dentex*)	40-48	8-10	500-670	21-24
Rodovalho (*Scophthalmus maximus*)	50-55	9-11	400-450	22-25
Seriola (*Seriola quinqueradiata*)	42-48	8-11	600-800	22-25
Salmonídeos	38-42	6-9	400-450	18-22

[1]Adaptado de Kaushik (1997 a)

[2]Quociente entre proteína digestível / energia digestível da dieta

PD: proteína digestível

ED: energia digestível

PV: peso vivo

No robalo, o teor proteico óptimo da dieta foi estimado em cerca de 50%, em dietas com 12% de lípidos (Alliot et al., 1974; Hidalgo e Alliot, 1988). Hidalgo e Alliot (1988) estudaram o efeito da temperatura da água nas necessidades proteicas de juvenis de robalo e verificaram que aumentaram de 5 para 8 g/kg peso vivo/dia com o aumento da temperatura da água de 15 para 20 °C. Contudo, se o teor proteico óptimo for considerado em termos de percentagem da dieta, foi igual para as duas temperaturas.

A maioria das espécies produzidas em aquacultura requer dietas com níveis proteicos mais elevados do que as dos animais de pecuária, apesar de em termos absolutos (por unidade de peso corporal ou por unidade de peso ganho) não necessitarem de maior quantidade de proteína (Bowen, 1987).

As necessidades proteicas mais elevadas foram, no início, atribuídas aos hábitos carnívoros dos peixes (Cowey, 1975; Watanabe et al., 1979). No entanto, mesmo as espécies omnívoras e herbívoras, como a tilápia (*Oreochromis* spp.), a carpa (*Cyprinus carpio*) ou o peixe gato (*Ictalurus punctatus*), requerem dietas com um teor proteico mais elevado (35 a 50% em base seca) do que os animais terrestres (Siddiqui et al., 1988; De Silva et al., 1989; Reis et al., 1989; Filipiak, 1991; El-Sayed e Teshima, 1992).

Bowen (1987) comparou diversos estudos sobre as necessidades proteicas dos mamíferos, das aves e dos teleósteos, tendo verificado que as necessidades proteicas, assim como a eficiência de utilização da proteína alimentar, eram similares, diferindo apenas na concentração relativa de proteína na dieta necessária para obter o crescimento máximo (tabela 1.3). Segundo o mesmo autor, esta diferença atribui-se ao facto de os peixes serem animais poiquilotérmicos e amoniotélicos, tendo, por isso, necessidades energéticas de manutenção mais baixas. Para além disso, as necessidades proteicas de manutenção dos peixes parecem também ser mais baixas. Apesar de terem sido determinadas apenas para algumas espécies de juvenis de peixes, os dados disponíveis indicam que as necessidades proteicas de manutenção representam apenas 15 a 30% das necessidades totais em proteína (Kaushik, 1995a).

Deste modo, as evidências apontam para que as necessidades proteicas da maioria dos teleósteos sejam apenas aparentemente superiores às dos animais terrestres. Para além disso, o nível proteico na dieta dos peixes pode ainda eventualmente ser reduzido se for dada especial atenção à interacção entre a proteína e a energia da dieta (Cho e Kaushik, 1990). Por exemplo, a relação óptima entre proteína digestível /energia digestível das dietas dos salmonídeos foi reavaliada em 17–18 mg/kJ (Hillestrad e Johnsen, 1994; Médale et al., 1995), valor consideravelmente inferior às recomendações anteriores (22 – 25 mg /kJ; NRC, 1981).

Tabela 1.3. Análise comparativa da eficiência de utilização do alimento e da proteína nos peixes, mamíferos e aves (valores médios)[1].

	Peixes	Mamíferos e Aves
Taxa de crescimento específico	2,77	2,45
Eficiência de conversão alimentar	0,78	0,26
Teor proteico da dieta (%)	40,3	20,0
Retenção proteica diária (g/kg PM[†]/dia)	16,5	12,0
Coeficiente de eficácia proteica	1,95	1,97
Retenção proteica (% proteína ingerida)	31,0	29,0

[1]Adaptado de Bowen (1987)

[†]Peso médio

Nos peixes, os factores ambientais, tais como a temperatura e a salinidade, influenciam significativamente numerosas funções fisiológicas (taxa metabólica, osmorregulação). Contudo, ainda não existe evidência conclusiva sobre o papel destes factores ambientais nas necessidades em proteína (NRC, 1993).

A influência da temperatura da água nas necessidades proteicas tem sido objecto de numerosa investigação, persistindo, no entanto, uma certa controvérsia sobre o seu efeito. Alguns autores observaram um aumento das necessidades proteicas com o aumento da temperatura da água (DeLong et al., 1958; Millikin, 1983), enquanto que outros não observaram qualquer efeito (Slinger et al., 1977; Cho e Slinger, 1979, NRC, 1981). Actualmente, admite-se que a temperatura da água não influencia o teor proteico óptimo da dieta, mas afecta significativamente as necessidades absolutas de proteína dos peixes (NRC, 1993). Em geral, o aumento da temperatura da água, até um nível óptimo, é acompanhado por um aumento da taxa de crescimento, da taxa de ingestão (Brett et al., 1969; Choubert et al., 1982), do trânsito intestinal (Ross e Jaunsey, 1981; Fauconneau et al., 1983) e da taxa metabólica (Jobling, 1983), sem contudo implicar o aumento do teor proteico óptimo das dietas.

A bibliografia disponível sobre o efeito da salinidade nas necessidades proteicas é relativamente escassa. Para os salmonídeos foi demonstrado que um aumento da salinidade da água afecta negativamente a digestibilidade das proteínas (Lall e Bishop, 1976; Ringo, 1991; Usher et al., 1990). Contudo, não existem dados consistentes que demonstrem que as necessidades proteicas aumentam com o aumento da salinidade da água. Numa experiência conduzida com juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Zeitoun et al. (1973) demonstraram que o teor proteico óptimo da dieta aumentava com o aumento da salinidade da água de 10 para 20‰. No entanto, em experiências similares com o salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) e com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), não foi demonstrado qualquer efeito da salinidade sobre as necessidades proteicas (Zeitoun et al., 1974; De Silva e Perera, 1985).

As necessidades proteicas são afectadas e interagem com a idade ou com o estado de desenvolvimento do peixe. Os peixes mais jovens ou mais pequenos necessitam de maior concentração de proteína na dieta do que os de maior idade ou tamanho (Page e Andrews, 1973; Cho et al., 1985; Wilson e Halver, 1986; Steffens, 1989; Li e Lovell, 1992). Este facto relaciona-se com a diminuição da velocidade de síntese da proteína corporal, que pressupõe uma progressiva diminuição da velocidade de crescimento, à medida que os peixes se aproximam da maturidade (Fauconneau, 1985; Houlihan et al., 1986).

Teoricamente, os peixes não necessitam de proteína na dieta *per si*, mas requerem uma fonte de aminoácidos essenciais (AAE), indispensáveis à manutenção e crescimento tecidular. Aparentemente, todos os peixes requerem os mesmos dez AAE que a maioria dos outros animais (NRC, 1993). A optimização do aporte em AAE é um princípio básico da nutrição azotada de todos os animais monogástricos, uma vez que a deficiência de apenas um AAE reduz a utilização da proteína da dieta e, por conseguinte, reduz o crescimento e a eficiência de utilização do alimento.

Os requisitos quantitativos dos dez AAE foram estimados, em ensaios de dose-resposta, apenas para algumas espécies de teleósteos de água doce, nomeadamente a carpa (Nose, 1979), a enguia japonesa (*Anguilla japonica*; Nose, 1979), a tilápia do Nilo (Santiago e Lovell, 1988), o salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*; Halver et al., 1958, 1959; Chance et al., 1964; Halver, 1965; Klein e Halver, 1970), o salmão prateado (Arai e Ogata, 1991), o salmão keta (*Oncorhynchus keta*; Akiyama e Arai, 1991), a seriola (*Seriola quinqueradiata*;

Watanabe et al., 1995), o peixe gato (Wilson e Poe, 1985), o peixe leite (*Chanos chanos*; Borlongan e Coloso, 1993) e o esturjão (*Acipenser* spp.; Ng e Hung, 1995). Para a truta arco-íris e para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), as duas espécies mais representativas da produção intensiva em aquacultura, as necessidades quantitativas de todos os dez AAE não foram ainda determinadas. Para o robalo, as necessidades em AAE foram estimadas apenas para a metionina, a lisina, a arginina, o triptofano e a treonina (Thebault et al., 1985; Hidalgo et al., 1987b; Tibaldi e Lanari, 1991; Tibaldi et al., 1993; Tibaldi et al., 1994; Tibaldi e Tulli, 1999).

Na tabela 1.4 são apresentadas as necessidades de alguns AAE da truta arco-íris, da dourada e do robalo. Para permitir uma melhor comparação entre espécies, os dados são expressos em percentagem da proteína, uma vez que o teor proteico e energético das dietas piscícolas varia consideravelmente (Cowey, 1994).

Tabela 1.4. Conhecimento actual das necessidades de aminoácidos essenciais de algumas espécies de teleósteos (g/16 g azoto).

	Truta arco-íris[1] *Oncorhynchus mykiss*	Dourada[2] *Sparus aurata*	Robalo *Dicentrarchus labrax*
Arginina	3,3–5,9	5,0	3,9[3]
Lisina	3,7–6,1	5,0	4,8[4]
Metionina	1,5–3,0	4,0	1,8[5]–2,0[6]
Triptofano	0,5–1,4	0,6	0,5[7]
Treonina	3,0		2,6[8]

[1]NRC, 1993; [2]Luquet e Sabaut, 1974; [3]Tibaldi et al., 1994; [4]Tibaldi e Lanari, 1991; [5]Hidalgo et al., 1987b; [6]Thebault et al., 1985; [7]Tibaldi et al., 1993; [8]Tibaldi e Tulli, 1999.

A análise dos dados disponíveis sobre as necessidades de AAE para o crescimento máximo de diferentes espécies de peixes, incluindo as marinhas, revela semelhanças mas também diferenças inter e intra espécies (Cowey, 1994). Esta variabilidade de resultados poderá ser

atribuída, pelo menos em parte, a diferenças nas condições experimentais (dietas base, taxa de ingestão do alimento, condições ambientais), ao critério usado para estimar as necessidades (crescimento, bioquímico, metabólico ou patológico) ou, simplesmente, ao modo como os dados são expressos (percentagem da dieta, percentagem da proteína) (Kaushik, 1995a).

Apesar de as necessidades em AAE para muitas das espécies com interesse aquícola ainda não terem sido estimadas, o seu conhecimento é muito importante para a formulação de dietas nutricionalmente equilibradas. Em termos práticos, a ausência de dados é superada tendo em consideração os valores disponíveis para outras espécies e o perfil de AAE das proteínas corporais da espécie em causa. Na realidade, está bem documentada a estreita relação entre o perfil de AAE das proteínas corporais e o perfil das necessidades em AAE dessa espécie (figura 1.2) (Wilson e Cowey, 1985; Wilson e Poe, 1985; Gatlin, 1987; Mambrini e Kaushik, 1995). Em face do exposto e uma vez que a composição em AAE dos peixes inteiros varia pouco com a espécie e a idade, pode-se inferir que as necessidades em AAE (% da proteína) não variam com a espécie ou com o tamanho do peixe (Wilson e Cowey, 1985; Kaushik et al., 1991).

Inicialmente, as necessidades quantitativas em AAE foram estimadas apenas pelo método convencional de dose-resposta, o qual é baseado no crescimento ou na resposta metabólica dos peixes alimentados com dietas purificadas, que incorporam níveis crescentes de um determinado AAE a ser estudado (EIFAC, 1993). Alguns métodos empíricos têm sido utilizados, nomeadamente a aproximação à proteína ideal (Akiyama et al., 1997) e a determinação do acréscimo diário de AAE do peixe inteiro (Ogino, 1980). Segundo o primeiro método, a necessidade de um único AAE é determinada com base no método de dose-resposta e as necessidades dos restantes nove AAE são estimadas como sendo proporcionais ao perfil dos AAE da proteína corporal. Segundo o método de Ogino (1980), as necessidades de AAE são equivalentes ao ganho diário de AAE do peixe inteiro, pelo que reflectem apenas as necessidades para a síntese proteica, não considerando os gastos de manutenção e a biodisponibilidade de cada um dos AAE das fontes proteicas (Wilson e Poe, 1985).

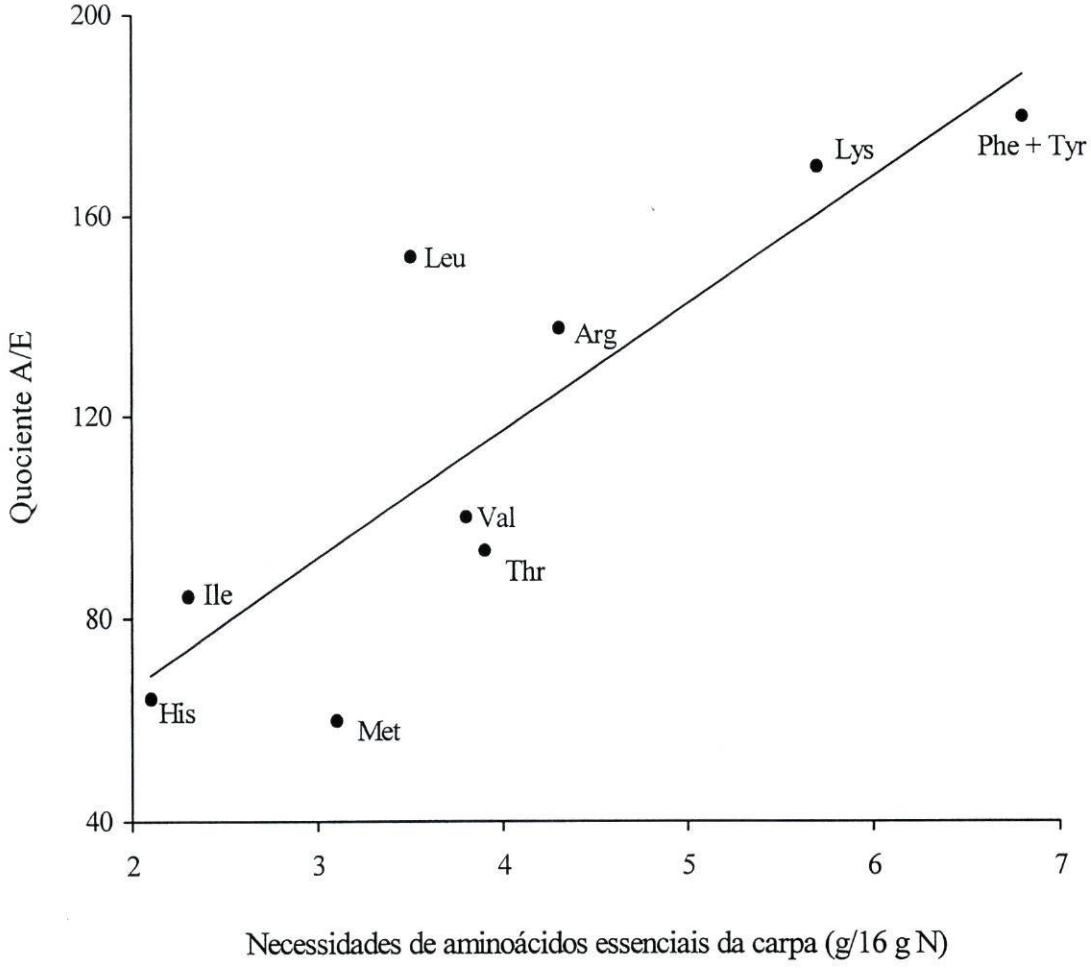


Figura 1.2. Relação entre o perfil de aminoácidos essenciais da proteína corporal da carpa e as suas necessidades quantitativas de aminoácidos essenciais. (*Quociente A/E: (AAE/soma AAE) × 1000; Arg: arginina; Lys: lisina; His: histidina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Val: valina; Met: metiona; Phe: fenilalanina; Thr: treonina; Tyr: tirosina. Dados de Ogino, 1980; NRC, 1993).

Como foi anteriormente referido, a estreita relação entre o perfil das necessidades de AAE e o da composição das proteínas corporais faz com que a farinha de peixe represente a fonte proteica mais apropriada para as dietas de peixes (Tacon, 1994). Na realidade, os níveis de inclusão da farinha de peixe oscilam entre 25 a 75% do alimento, com média de aproximadamente 50% (Murai, 1992; Tacon, 1993). Face a esta excessiva dependência da formulação das dietas piscícolas relativamente a um único ingrediente – a farinha de peixe -

investigadores e produtores de alimento composto têm dado especial atenção à sua substituição, parcial ou total, por outras fontes proteicas (Tacon e Jackson, 1985; Kaushik, 1990 a).

Em geral, as fontes proteicas alternativas à farinha de peixe apresentam desequilíbrios de aminoácidos e carência em um ou mais AAE. Com vista a melhorar o valor biológico destas proteínas, a suplementação adequada das dietas com os AAE limitantes demonstrou melhorar a utilização da proteína e reduzir os dejectos azotados em diferentes espécies de teleósteos (Ketola, 1982; Tacon et al., 1983; Chiu et al., 1986; Murai et al., 1987; Viola et al., 1992 a, b; Lee et al., 1993). Para os animais monogástricos terrestres, os efeitos benéficos da suplementação das dietas com os AAE limitantes está também documentada (Cromwell et al., 1983; Henry, 1993; Leclercq e Tesseraud, 1993).

No que diz respeito à qualidade da carcaça, a substituição da farinha de peixe por outras fontes proteicas, em dietas para peixes, parece não afectar a quantidade nem a qualidade da proteína corporal (Smith et al., 1988; Cowey, 1993; Kaushik et al., 1995 a).

1.3.2. Lípidos

A importância dos lípidos na alimentação dos peixes é indiscutível. Conforme veremos, os lípidos desempenham um papel fundamental na economia das proteínas da dieta. Este papel assume particular importância nos peixes uma vez que estes digerem mal os hidratos de carbono complexos, que são a principal fonte de energia dos animais de pecuária. No entanto, em oposição aos hidratos de carbono, não constituem apenas uma fonte energética mas são a fonte de ácidos gordos essenciais (AGE), necessários para um crescimento e desenvolvimento normais do peixe (NRC, 1993). Além destas funções, os lípidos têm outras não menos importantes, tais como serem vectores de compostos lipossolúveis, nomeadamente de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), de esteróides e de pigmentos, além de serem componentes de hormonas e percursores de prostaglandinas (Bell et al., 1995; Sargent et al., 1999 a). Têm ainda um papel fundamental no bom funcionamento celular e na manutenção da integridade das estruturas membranares, aspectos de particular importância no meio aquático

onde as variações térmicas e osmóticas são importantes (Cowey, 1988). Alguns dos ácidos gordos com maior importância nutricional são apresentados na tabela 1.5.

A riqueza em ácidos gordos poli-insaturados (AGPI) da série ω-3 é uma particularidade dos ecossistemas aquáticos. Os AGPI ω-3 são sintetizados pelo fitoplâncton, que conta, em média, com mais de 40 % destes ácidos gordos, os quais são conservados nos níveis tróficos superiores: 15 a 20% no zooplâncton e cerca de 20% nos peixes (Bell et al., 1986; Sargent et al., 1989; Sargent, 1997). Contudo, existe uma grande diferença entre o ecossistema de água doce e o marinho relativamente à natureza destes ácidos gordos. Enquanto que no ecossistema marinho são os AGPI de cadeia longa (mais de 20C) que predominam no fitoplâncton (25 a 38% para a *Chlorella*), no ecossistema dulciaquícola, para esta mesma alga, o ácido linolénico é maioritário (9 a 15%) e o ácido eicosapentaenóico representa apenas 1% (Sargent et al., 1999 b). Estas diferenças entre o meio marinho e o de água doce irão ter repercussões sobre as necessidades e a capacidade de síntese de ácidos gordos nos peixes.

Tabela 1.5. Alguns ácidos gordos com interesse na alimentação dos peixes.

Denominação do ácido gordo	Fórmula química
Ácidos gordos da série ω-3	
Ácido linolénico	C18:3ω-3
Ácido eicosapentaenóico (EPA)	C20:5ω-3
Ácido docosahexaenóico (DHA)	C22:6ω-3
Ácidos gordos da série ω-6	
Ácido linoleico	C18:2ω-6
Ácido araquidónico	C20:4ω-6

À semelhança de outros vertebrados, os peixes não podem sintetizar *de novo* quer o ácido linoleico quer o linolénico, pelo que um deles ou os dois, têm de ser fornecidos na dieta de modo a manter as funções celulares (Sargent et al., 1999 a). Contudo, existem diferenças entre os peixes marinhos e os dulciaquícolas quanto à capacidade de bioconversão dos ácidos gordos C18 (18:2ω-6 e 18:3ω-3) em AGPI de cadeia longa. Enquanto que os peixes dulciaquícolas realizam esta bioconversão (Kanazawa et al., 1979; Mugrditchian et al., 1981; Satoh et al., 1989 a, b), os de água salgada não são capazes de o fazer por completo (Owen et al., 1975; Kanazawa et al., 1979; Yamada et al., 1980; Hardy et al., 1987; Castell et al., 1994), devido à ausência ou a uma actividade reduzida das enzimas (dessaturases e elongases) intervenientes nestes processos (Yamada et al., 1980; Watanabe, 1982). Isto justifica não só as necessidades qualitativas diferentes em AGE, como também as diferenças na composição da fracção lipídica do músculo do peixe segundo o meio (tabela 1.6).

Tabela 1.6. Composição média* em ácidos gordos do músculo de algumas espécies de teleósteos[1].

Ácidos gordos	Truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*	Carpa *Cyprinus carpio*	Robalo *Dicentrarchus labrax*	Rodovalho *Scophthalmus maximus*
Saturados	35,8	36,3	29,2	20,6
Monoinsaturados	39,8	35,6	43,3	36,8
Soma dos ω-6	5,6	9,4	2,1	8,6
Soma dos ω-3	15,8	18,5	25,4	25,4
Soma dos AGPI	21,3	27,9	27,5	34,0
AGPI / Saturados	0,59	0,78	0,94	1,65
ω-3 / ω-6	2,8	2,0	12,0	3,0

*De referir que a composição em ácidos gordos corporais é fortemente influenciada pela alimentação lipídica.

[1]Adatpado de Kaushik (1997 b)

Os peixes de água doce e os salmonídeos necessitam, em geral, de 1% de 18:3ω-3 ou de 0,3 - 0,5 % de 20:5ω-3 ou 22:6ω-3, uma vez que os AGPI de cadeia longa são mais eficientes como AGE (tabela 1.7). Também para a carpa, o salmão prateado, o salmão keta e a tilápia do Nilo obtiveram-se melhores resultados de crescimento com dietas contendo 0,5% de AGPI de cadeia longa, comparativamente às que continham 1% de 18:3ω-3 (Takeuchi e Watanabe, 1977a, b, 1980, 1982; Stickney e Hardy, 1989). Para os peixes marinhos, as necessidades de AGE não são satisfeitas apenas com 18:2ω-6 ou 18:3ω-3, o que torna imperativo o fornecimento na dieta de 20:5ω-3 ou 22:6ω-3, na proporção de 0,5 a 1% da dieta (tabela 1.7). Actualmente, defende-se que mais importante do que as necessidades quantitativas destes dois AGPI de cadeia longa é a proporção relativa de cada um deles na dieta (Bell et al., 1995; Ibeas et al., 1996, 1997). Em geral, os ácidos gordos da série ω-3 são essenciais para os peixes, contudo, a maioria das espécies, sobretudo as de água doce, necessitam igualmente de ácidos gordos da série ω-6 (C18:2 e C20:4) (Watanabe, 1982; Henderson e Tocher, 1987).

A utilização de dietas em que o conteúdo lipídico não satisfaz as necessidades em AGE do peixe leva ao aparecimento de sintomas de carência, que se traduzem por diminuição do crescimento e da eficiência de utilização do alimento, degenerescência hepática e lesões dérmicas, que podem levar à erosão completa da barbatana caudal (Takeuchi e Watanabe, 1977a; Takeuchi et al., 1980; Watanabe, 1982; Sargent et al., 1989; Satoh et al., 1989a; Alexis, 1997). Em reprodutores, a carência de AGE na dieta conduz a uma diminuição das performances reprodutivas do robalo (Ramos et al., 1993; Bruce et al., 1999), assim como de outras espécies de teleósteos (Corraze et al., 1993; Fernández-Palacios et al., 1995; Rodriguez et al., 1998).

Pelo contrário, um excesso de AGE na dieta pode também ter consequências negativas para o peixe. No caso da truta arco-íris, as dietas contendo 4% de C18:3ω-3 ou 2% de AGPI de cadeia longa, isto é, quatro vezes as necessidades em AGE desta espécie, provocaram um efeito negativo no crescimento e uma diminuição da eficiência de conversão alimentar (Takeuchi e Watanabe, 1979; Watanabe, 1982). Deste modo, torna-se muito importante vigiar o teor de ácidos gordos contidos nos lípidos alimentares, de modo a evitar situações de carência ou de excesso de AGE (Corraze, 1994).

Tabela 1.7. Necessidades em ácidos gordos essenciais (AGE) de diferentes espécies de peixes.

Espécie	AGE	Necessidades (% dieta)	Referência
Truta arco-íris	18:3ω-3	0,7–1,0	Castell et al. (1972)
(*Oncorhynchus mykiss*)	AGPI ω-3	0,4–0,5	Takeuchi e Watanabe (1976)
Salmão keta	18:2ω-6 *e*	1,0	
(*Oncorhynchus keta*)	18:3ω-3	1,0	Takeuchi et al. (1979a)
Salmão prateado	18:2ω-6 *e*	1,0	
(*Oncorhynchus kisutch*)	18 :3ω-3	1,0	Yu e Sinnhuber (1979)
Carpa	18:2ω-6 *e*	1,0	
(*Cyprinus carpio*)	18:3ω-3	1,0	Takeuchi e Watanabe (1977a)
Enguia japonesa	18:2ω-6	0,5	
(*Anguilla japonica*)	18:3ω-3	0,5	Takeuchi et al. (1980)
Tilápia do Nilo	18:2ω-6	1,0	Kanazawa et al. (1980)
(*Oreochromis niloticus*)	18:2ω-6	0,5	Takeuchi et al. (1983)
Peixe gato	18:3ω-3	1,0–2,0	
(*Ictalurus punctatus*)	AGPI ω-3	0,5–0,8	Satoh et al. (1989a)
Dourada	AGPI ω-3	0,9	Kalogeropoulos et al. (1992)
(*Sparus aurata*)			
Rodovalho	AGPI ω-3	0,8	Gatesoupe et al. (1977)
(*Scophthalmus maximus*)			
Seriola	20:5ω-3 *ou*		
(*Seriola quinqueradiata*)	20:5ω-3	2,0	Deshimaru e Kuroki (1983)
Dourada japonesa	20:5ω-3 *ou*		
(*Pagrus major*)	AGPI ω-3	0,5	Yone (1978)

O primeiro factor condicionante da escolha da fonte lipídica a empregar na formulação de dietas para peixes relaciona-se com o seu conteúdo em ácidos gordos. A título elucidativo, é apresentada na tabela 1.8 a composição em AGE de alguns óleos usados no fabrico de alimentos compostos para peixes. Os óleos de peixe são muito ricos em AGPI ω-3, contrariamente aos óleos vegetais. Para os salmonídeos, as necessidades em AGE podem ser satisfeitas mediante a incorporação nas dietas de 10% de óleo de soja ou de colza, que fornecem cerca de 1% de C18:3ω-3. No caso dos peixes marinhos, a inclusão de óleos de peixes nas dietas é imprescindível, porque apenas estes contêm os AGPI de cadeia longa.

Tabela 1.8. Teor em ácidos gordos essenciais de alguns óleos empregues na formulação de dietas para peixes (%)[1].

Óleo	Milho	Soja	Colza	Capelim*	Fígado de bacalhau
Ácido linoleico (18 :2ω-6)	58	55	23	1,5	2
Ácido linolénico (18 :3ω-3)	0	9,9	8,9	0,6	1
Ácido eicosapentaenóico (20 :5ω-3)	0	0	0	9,9	9,8
Ácido docosahexaenóico (22 :6ω-3)	0	0	0	3,3	12,6

[1] Adaptado de Corraze (1994).

* *Mallotus villosus*

A incorporação de fontes lipídicas ricas em AGPI pode levar a fenómenos de peroxidação das dietas devido, entre outros factores, à susceptibilidade destes ácidos gordos aos tratamentos térmicos, tão importantes e frequentes no fabrico de dietas para peixes (Hung et

al., 1980; Cowey et al., 1981; Mugrditchian et al., 1981; Watanabe et al., 1981; Chan et al., 1982; Cowey et al., 1983). A peroxidação dos lípidos da dieta acarreta numerosas consequências nefastas para o animal (destruição dos AGE e das vitaminas lipossolúveis, esteatose hepática, distrofia muscular) e para a qualidade do produto final (sabor, pigmentação, duração da conservação do pescado) (Miki et al., 1994; Kaushik, 1997 b; Hardy e Roby, 1998). No entanto, é possível prevenir a peroxidação dos ácidos gordos da dieta mediante a incorporação de antioxidantes naturais tais como a vitamina E e o selénio (Cowey et al., 1984; Bell e Cowey, 1985; Frigg et al., 1990; Stephan et al., 1995) ou sintéticos tais como o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA) e a etoxiquinina (Hardy e Roby, 1998).

As reservas lipídicas nos peixes são condicionadas, quantitativa e qualitativamente, por diversos factores que actuam ao nível da síntese *de novo* dos ácidos gordos, da acumulação dos lípidos da dieta e da lipólise. Para além dos factores naturais, como a idade e o ciclo sexual, a composição da dieta também é importante (Thomassen e Røsjø,, 1989; Kaushik, 1990 b; Corraze, 1997). A incorporação de elevados níveis de energia digestível, especialmente sob a forma de lípidos, induz modificações na composição corporal dos salmonídeos, caracterizadas por um aumento do teor lipídico e por uma diminuição do teor em humidade (Takeuchi et al., 1978a; Watanabe, 1982; Green e Selivonchick, 1987). Para as espécies de água salgada foi também observado uma relação similar entre o conteúdo em lípidos da dieta e o conteúdo lipídico corporal (Ellis e Reigh, 1991; Nematipour et al., 1992a; Serrano et al., 1992; Andersen e Alsted, 1993; Stephan et al., 1995, 1996).

No que diz respeito ao aspecto qualitativo das reservas lipídicas corporais, diversos estudos demonstraram que a composição em ácidos gordos dos tecidos reflecte a composição dos lípidos da dieta ingerida (Thomassen e Røsjø,, 1989; Greene e Selivonchick, 1990; Arzel et al., 1994; Rechignat et al., 1995; El-Kerdawy e Salama, 1997; Steffens, 1997). No caso dos lípidos musculares este aspecto assume particular importância, uma vez que é a riqueza em AGPI do músculo que confere ao peixe a sua qualidade nutricional e valor dietético, em grande parte pelo seu efeito protector das doenças cardiovasculares (Ackman, 1995). Um desequilíbrio na relação dos ácidos gordos ω-3 e ω-6 da dieta também induz modificações em diversos tecidos, tanto ao nível dos triglicerídeos como ao nível dos fosfolípidos, podendo afectar a capacidade de osmorregulação dos peixes (Leray e Pelletier, 1985; Bell et al., 1995).

A importância, a localização e a composição das reservas lipídicas corporais são aspectos intimamente relacionados com a qualidade e a rentabilidade do produto final (Thomassen e Røsjø, 1989; Cowey, 1993; Guillaume et al., 1996). Os principais locais de deposição lipídica são o fígado, o tecido adiposo e o músculo, cuja importância varia consoante a espécie de teleósteo (figura 1.3) (Sheridan, 1988; 1994). Os salmonídeos acumulam as reservas lipídicas sobretudo no tecido perivisceral e em menor extensão no músculo, enquanto que as espécies de água salgada, como o robalo, acumulam os lípidos preferencialmente no fígado (McClelland et al., 1995). Para a truta arco-íris, o aumento do teor lipídico da dieta de 8 para 18% conduziu a um aumento moderado do teor em lípidos musculares e a um aumento significativo do teor lipídico visceral, sendo este último o grande responsável pelo aumento dos lípidos corporais. No entanto, para o robalo, o mesmo aumento do teor lipídico da dieta teve repercussões diferentes, tendo aumentado significativamente os lípidos hepáticos e em menor extensão os lípidos musculares (tabela 1.9) (Corraze, 1997).

Figura 1.3. Distribuição das reservas lipídicas (g/100g peso vivo) nos salmonídeos e no robalo (Dias, 1999).

Salmonídeos	Robalo
(10 - 15 g lípidos totais/ 100 g peso vivo)	(12 - 14 g lípidos totais/ 100 g peso vivo)

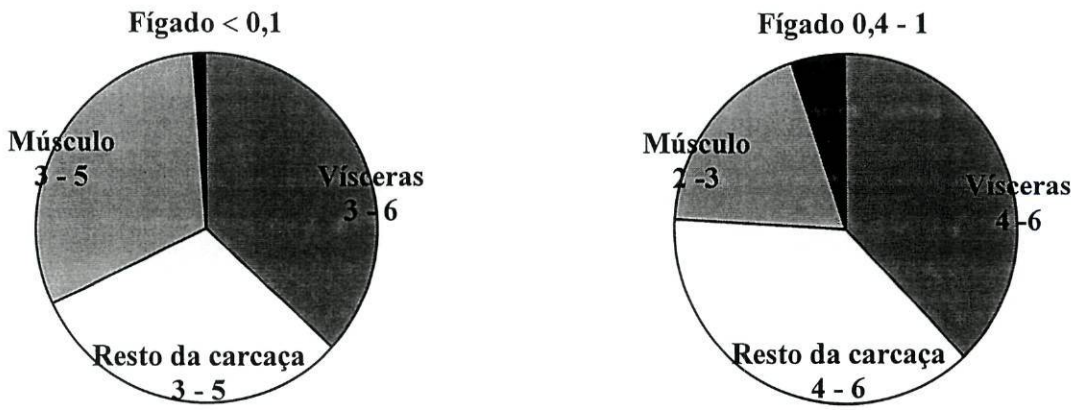


Tabela 1.9. Influência do teor lipídico da dieta no conteúdo lipídico dos diferentes tecidos da truta arco-íris e do robalo[1].

	Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)		Robalo (*Dicentrarchus labrax*)	
Teor lipídico da dieta (%)	8	18	8	18
Fígado (% peso fresco do fígado)	4,6	4,9	15,1	23,6
Músculo dorsal (% peso fresco do músculo)	4,9	6,8	4,2	4,8
Músculo ventral (% peso fresco do músculo)	7,1	10,9	6,4	7,0
Vísceras (% peso fresco das vísceras)	44,9	59,5	60,5	59,6

[1]Adaptado de Corraze (1997).

Apesar das principais vias bioquímicas e metabólicas da lipogénese terem sido identificadas nos peixes (Walton e Cowey, 1982), a relação quantitativa entre o aporte em energia digestível das dietas, a actividade lipogénica ou o conteúdo lipídico do músculo é ainda pouco clara nos peixes. A informação disponível está limitada a um pequeno número de espécies de peixes. Estes estudos demonstraram que os processos da lipogénese dos peixes são comparáveis aos dos vertebrados terrestres, embora menos eficazes e de resposta mais demorada (Lin et al., 1977; Brauge et al., 1995; Dias, 1999). Com efeito, as dietas ricas em lípidos diminuem a actividade das enzimas da lipogénese (Lin et al., 1977; Arnesen et al., 1993), enquanto que as dietas ricas em hidratos de carbono estimulam as enzimas da lipogénese (Likimani e Wilson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992; Corraze et al., 1998).

Para a maioria dos mamíferos, o tecido adiposo e o fígado parecem ter igual importância na síntese *de novo* de ácidos gordos, enquanto que nos peixes esta ocorre preferencialmente no tecido hepático (Lin et al., 1977; Likimani e Wilson, 1982; Sargent et al., 1989). No robalo, a bibliografia disponível refere que o principal órgão responsável pela lipogénese é o fígado e que a composição da dieta parece regular a actividade das enzimas da lipogénese (Dias, 1999).

O nível óptimo de incorporação lipídica em dietas de algumas espécies de peixes marinhos é apresentado na tabela 1.10. Para o robalo, um baixo teor lipídico da dieta (5%) conduziu a uma diminuição das performances de crescimento (Alliot et al., 1974). Quando este teor lipídico mínimo foi ultrapassado, as performances zootécnicas melhoraram significativamente. Contudo, foi demonstrado que níveis de incorporação lipídica superior a 15% não influenciam significativamente a taxa de crescimento do robalo (Métailler et al., 1981).

Tabela 1.10. Teor lipídico óptimo da dieta (em base seca) de algumas espécies marinhas com relevo em aquacultura.

	Lípidos (%)	Referência
Robalo (*Dicentrarchus labrax*)	9 – 12	Alliot et al. (1974)
Dourada (*Sparus aurata*)	12	Guinea e Fernandez (1997)
Rodovalho (*Scophthalmus maximus*)	<15	Andersen e Alsted (1993)
Seriola (*Seriola quinqueradiata*)	11	Deshimaru et al. (1986)
Peixe leite (*Chanos chanos*)	7 – 10	Alava e De La Cruz (1983)
Dourada japonesa (*Pagrus major*)	10	Yone et al. (1971)

1.3.3. Hidratos de carbono

Os peixes, à semelhança dos outros animais, não têm necessidades de hidratos de carbono. Contudo, utilizam os glúcidos como fonte de energia imediata ou de reserva sob a forma de glicogénio ou de gordura (Watanabe, 1988). Apesar de não se verificarem sintomas de carência quando os hidratos de carbono estão ausentes na dieta (Zamora e Echevarria, 1987), a verdade é que a sua não inclusão origina que outros nutrientes, como as proteínas e os lípidos, sejam catabolizados para a obtenção de energia e para a síntese de vários

componentes biológicos geralmente derivados dos hidratos de carbono. Assim, é benéfico o fornecimento, em concentrações adequadas, de hidratos de carbono nas dietas para peixes.

Devido ao meio natural dos peixes, onde os hidratos de carbono são escassos, o sistema digestivo e metabólico destes animais está, sem dúvida, melhor adaptado à utilização de proteínas e lípidos para a obtenção de energia em detrimento dos hidratos de carbono (Walton Cowey, 1982). O valor nutricional dos hidratos de carbono varia consideravelmente entre espécies piscícolas e parece estar associado ao tipo de regime alimentar no meio natural (NRC, 1993).

Alguma controvérsia persiste relativamente ao efeito benéfico da incorporação de elevados níveis de hidratos de carbono digestíveis nas dietas para peixes. Segundo Hilton e Atkinson (1982), níveis de incorporação de amido gelatinizado superiores a 14 % da dieta da truta arco-íris reduzem significativamente a performance de crescimento. Contudo, outros autores referem que a incorporação de níveis mais elevados de amido gelatinizado melhorou a retenção proteica e energética (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Kaushik et al., 1989a; Takeuchi et al., 1990; Jeong et al., 1991; Hernández et al., 1994). Ainda, segundo Pierper e Pfeffer (1980), na alimentação dos salmonídeos o amido gelatinizado constitui uma fonte energética tão eficiente quanto os lípidos.

De um modo geral, considera-se que os hidratos de carbono não devem ultrapassar os 20% em dietas para o salmão do Atlântico (Helland et al., 1991) e do Pacífico (Hardy, 1991) e para peixes marinhos como o rodovalho, o linguado (*Solea solea*) e a solha (*Pleuronectes platessa*) (Guillaume et al., 1991). No entanto, níveis superiores de hidratos de carbono poderão ser utilizados nas dietas de peixes de águas quentes, uma vez que estes apresentam maior capacidade digestiva dos hidratos de carbono, devido à maior actividade da amilase intestinal (Shimeno et al., 1977; Hofer e Sturmbauer, 1985; Hidalgo et al., 1999) (tabela 1.11).

Para o robalo, poucos são os trabalhos que visam o estudo da utilização dos hidratos de carbono. O amido cru é uma fonte energética relativamente mal utilizada pelos juvenis de robalo (Alliot et al., 1979 a; Métailler et al., 1981). A inclusão de mais de 20 % de amido cru na dieta do robalo induziu hepatomegalia e diminuição da eficiência de utilização da dieta. No entanto, quando o amido é gelatinizado a sua utilização melhora significativamente. Gouveia et al. (1995) verificaram que a incorporação de 15 ou 25 % de amido gelatinizado, em dietas

para juvenis de robalo, não afectou negativamente o crescimento ou a eficiência de utilização do alimento. Segundo Alliot e Pastoureaud (1984), o nível de incorporação de hidratos de carbono digestíveis, como a dextrina ou o amido gelatinizado, não deve ultrapassar os 30 % em dietas para o robalo.

Tabela 1.11. Níveis recomendados de incorporação de hidratos de carbono digestíveis nas dietas (em base seca) de diferentes espécies de peixes[1].

	Hidratos de carbono digestíveis (%)	Referência
Peixes marinhos ou de águas frias		
Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)	≤ 20	NRC (1981)
Salmão do Atlântico (*Salmo salar*)	≤ 20	Helland et al. (1991)
Salmão do Pacífico (*Oncorhynchus* spp.)	≤ 20	Hardy (1991)
Solha (*Pleuronectes platessa*)	≤ 20	Cowey et al. (1975)
Seriola (*Seriola quinqueradiata*)	≤ 10	Shimeno (1991)
Robalo asiático (*Lates calcarifer*)	≤ 20	Boonyaratpalin (1991)
Peixes de água doce ou de águas quentes		
Carpa (*Cryprinus carpio*)	30-40	Satoh (1991)
Enguia (*Anguilla* spp.)	20-30	Arai (1991)
Tilápia (*Orechromis spp.*)	≈ 40	Luquet (1991)
Peixe gato (*Ictalurus punctatus*)	25-30	Wilson (1991)
Peixe leite (*Chanos chanos*)	35-45	Lim (1991)

Nos peixes, a utilização digestiva dos hidratos de carbono parece estar relacionada com a complexidade estrutural da molécula e o seu nível de incorporação nas dietas. A glucose, a maltose e a sacarose proporcionam melhores taxas de crescimento do salmão real, seguidas por ordem decrescente da dextrina, da frutose, da galactose e do amido (NRC, 1993). Os tratamentos tecnológicos que provocam a gelatinização do amido, tais como a cozedura, a extrusão e a floculagem, permitem aumentar significativamente a sua digestibilidade e, portanto, aumentar o valor de energia digestível da dieta (Bergot e Brèque, 1983; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Furuichi et al., 1987; Jeong et al., 1991; Champ e Faisant, 1992; Kim e Kaushik, 1992).

Nos salmonídeos, a capacidade de utilização digestiva do amido cru é de 38 a 50 % (Sing e Nose, 1967; Bergot, 1979 a, b; Spannhof e Plantikow, 1983), enquanto que a do amido gelatinizado é de 60 a 80 % (Bergot e Brèque, 1983; Furuichi et al., 1987; Jeong et al., 1991; Champ e Faisant, 1992; Kim e Kaushik, 1992). Para o robalo, a utilização digestiva do amido cru (70 a 80 %) e do amido gelatinizado (85 a 95 %) demonstrou ser relativamente mais elevada do que a dos salmonídeos e estar relacionada com o seu nível de inclusão nas dietas (Spyridakis, 1989; Dias, 1999). A digestibilidade do amido está, também, dependente do seu nível de incorporação nas dietas, isto é, diminuiu com o aumento do teor em amido das dietas (Bergot, 1979a; Rychly e Spannhof, 1979; Kim e Kaushik, 1992).

A utilização digestiva dos hidratos de carbono parece estar também relacionada com a temperatura da água. Na truta arco-íris, o aumento da temperatura da água conduziu a um aumentou significativo da digestibilidade do amido (Médale et al., 1991a; Brauge, 1994). Na realidade, existem evidências de que a actividade das enzimas digestivas, nomeadamente da amilase, é termo-dependente (Pérès et al., 1973; Hofer, 1979 a, b; Hidalgo et al., 1999).

A capacidade dos peixes de metabolizar a glucose absorvida e, portanto, de regular os níveis plasmáticos de glucose é relativamente limitada quando comparada com a dos mamíferos. Com efeito, a ingestão de dietas com elevados níveis de incorporação de hidratos de carbono digestíveis resulta em estados diabéticos, caracterizados por uma prolongada hiperglicémia pós-prandial, que se mantém durante várias horas (figura 1.4) (Tashima e Cahill, 1968; Palmer e Ryman, 1972; Thorpe e Ince, 1974; Bergot, 1979b; Furuichi e Yone, 1981; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Wilson e Poe, 1987; Mazur et al., 1992; Brauge et al., 1994).

A capacidade de regulação dos níveis de glucose sanguínea varia de acordo com a espécie de peixe. Nos peixes omnívoros, como a carpa, a capacidade de regulação da glicémia é consideravelmente mais elevada do que a dos peixes carnívoros (Médale et al., 1998). No entanto, mesmo nas espécies com maior tolerância à glucose, a ingestão de hidratos de carbono digestíveis induz um aumento mais acentuado da glicémia e um retorno aos valores basais mais lento do que nos mamíferos omnívoros (figura 1.4).

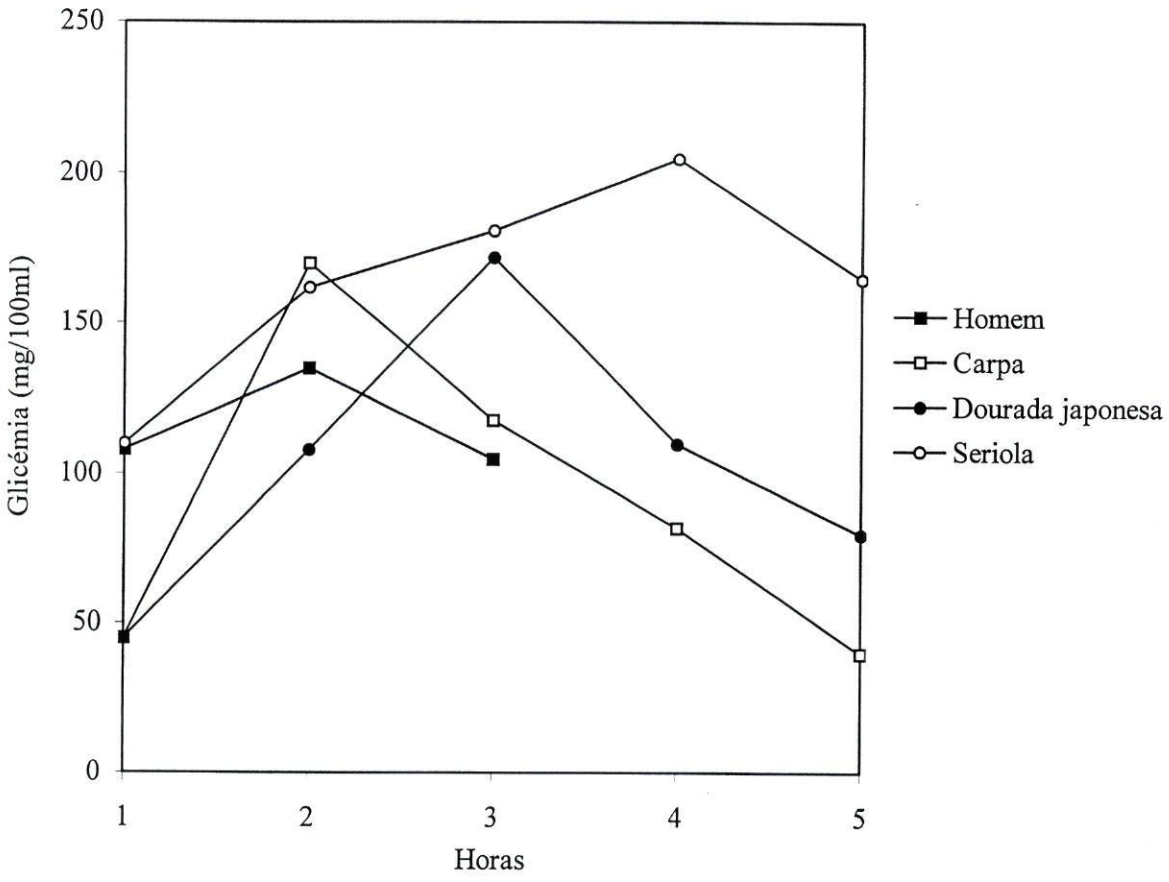


Figura 1.4. Variação dos níveis de glucose plasmática após administração oral de 167 mg de glucose por 100 g de peso corporal (Furuichi e Yone, 1981).

Nos peixes, a baixa capacidade de metabolizar a glucose foi inicialmente atribuída a uma insuficiente secreção insulínica (Palmer e Ryman, 1972; Thorpe e Ince, 1974). No entanto, mediante a utilização de novos métodos radioimunológicos foi demonstrado que os níveis plasmáticos de insulina dos peixes eram comparáveis aos dos mamíferos (Gutierrez et al., 1986; Hertz et al., 1989; Mommsen e Plisetskaya, 1991). A baixa actividade da enzima hexoquinase hepática (Nagayama et al., 1973; Cowey et al., 1977; Furuichi e Yone, 1982c) e a ausência da enzima glucoquinase (Nagayama e Ohshima, 1974; Cowey et al., 1977) foram também considerados como factores limitativos da capacidade de regulação da glicémia nos peixes. Contudo, um trabalho recente demonstrou, na truta arco-íris e na carpa, que estas duas enzimas estão presentes e que a sua actividade é condicionada pelo teor em hidratos de carbono digestíveis da dieta com que os peixes foram alimentados (Médale et al., 1998). A prolongada hiperglicémia nos peixes parece, assim, resultar da combinação de diversos factores, nomeadamente da menor capacidade da glucose em estimular a libertação da insulina comparativamente com determinados aminoácidos (Thorpe e Ince, 1976; Cowey e Walton, 1989; Mommsen e Plisetskaya, 1991), da inibição da secreção insulínica devido à secreção de somatostatina, que parece ser mais sensível ao aumento de glucose no sangue (Harmon et al., 1991; Sheridan et al., 1991), da menor capacidade de fosforilação do complexo insulina/receptor com tirosina cinase (Gutiérrez et al., 1984, 1991; Mommsen e Plisetskaya, 1991) e do menor número de receptores insulínicos do músculo esquelético (Gutiérrez et al., 1991). No entanto, os mecanismos responsáveis pela limitada utilização metabólica dos glúcidos nos peixes permanecem pouco claros (Shiau, 1997).

Relativamente à composição corporal, foi demonstrado que nos salmonídeos níveis elevados de hidratos de carbono nas dietas induzem o aumento do glicogénio hepático e do peso do fígado (Phillips et al., 1948; Lee e Putman, 1973; Bergot, 1979 a, b; Pieper e Pfeffer, 1979; Hilton e Atkinson, 1982; Kim e Kaushik, 1990, 1992). Resultados similares foram também observados em peixes marinhos, como o robalo (Spyridakis, 1989; Gouveia et al., 1995), a dourada japonesa (*Pagrus major*; Furuichi e Yone, 1971), a solha (Cowey et al., 1975) e a seriola (Shimeno et al., 1979).

1.3.4. Energia

Os peixes, como qualquer outro animal, necessitam de energia para a maioria das funções celulares envolvidas na manutenção dos processos vitais, no crescimento e na reprodução. Esta energia provém da oxidação de compostos orgânicos resultantes da digestão e absorção do alimento. Todavia, quando o aporte energético de uma dieta é insuficiente para satisfazer as necessidades energéticas do animal, as reservas corporais de proteínas, lípidos e glicogénio são mobilizadas para esse fim. Deste modo, a continuidade da vida depende do fornecimento de energia pelos alimentos, a qual deve satisfazer as necessidades em energia do animal, mas também considerar as potenciais perdas ocorridas na digestão e metabolização da energia ingerida (figura 1.5). A amplitude destas perdas de energia dependem, em primeiro lugar, da espécie de peixe, das características do alimento, da taxa de ingestão e também da idade do animal e da temperatura da água (NRC, 1993).

As necessidades energéticas aumentam ou diminuem consoante a actividade metabólica dos animais, sendo influenciadas pela idade e estado fisiológico do animal e pelos factores ambientais (Brett e Groves, 1979). Os peixes mais jovens parecem necessitar de menos energia por unidade de peso ganho do que os mais velhos. Para os salmonídeos, as necessidades energéticas dos juvenis e dos peixe de 5 kg foram estimadas em 10 e 18 MJ/kg peso ganho, respectivamente (Cho, 1992). Esta diferença deve-se, entre outros factores, a alterações da composição corporal que ocorrem com a idade. Com efeito, nos peixes mais jovens predomina a síntese e a deposição de proteína, enquanto nos mais velhos predomina a síntese e a deposição de gordura (Kaushik e Médale, 1994).

No que se refere aos factores ambientais, a temperatura da água é o factor principal na regulação da taxa metabólica. Com o aumento da temperatura as necessidades energéticas dos peixes aumentam e, como consequência, a taxa de ingestão voluntária também aumenta. Contudo, o efeito da temperatura nos diferentes componentes do balanço energético permanece controverso, particularmente no que se refere às perdas de energia fecal. Alguns autores verificaram que a digestibilidade da energia era positivamente afectada pela temperatura (Atherton e Aitken, 1970; Choubert et al., 1982; Oliva-Teles e Rodrigues, 1993), enquanto outros não observaram qualquer efeito da temperatura na digestibilidade da energia

(Cho e Slinger,1979; Luquet e Fauconneau, 1979; Kaushik, 1981; Cho et al., 1982; Médale et al., 1991a; Iwata et al., 1994).

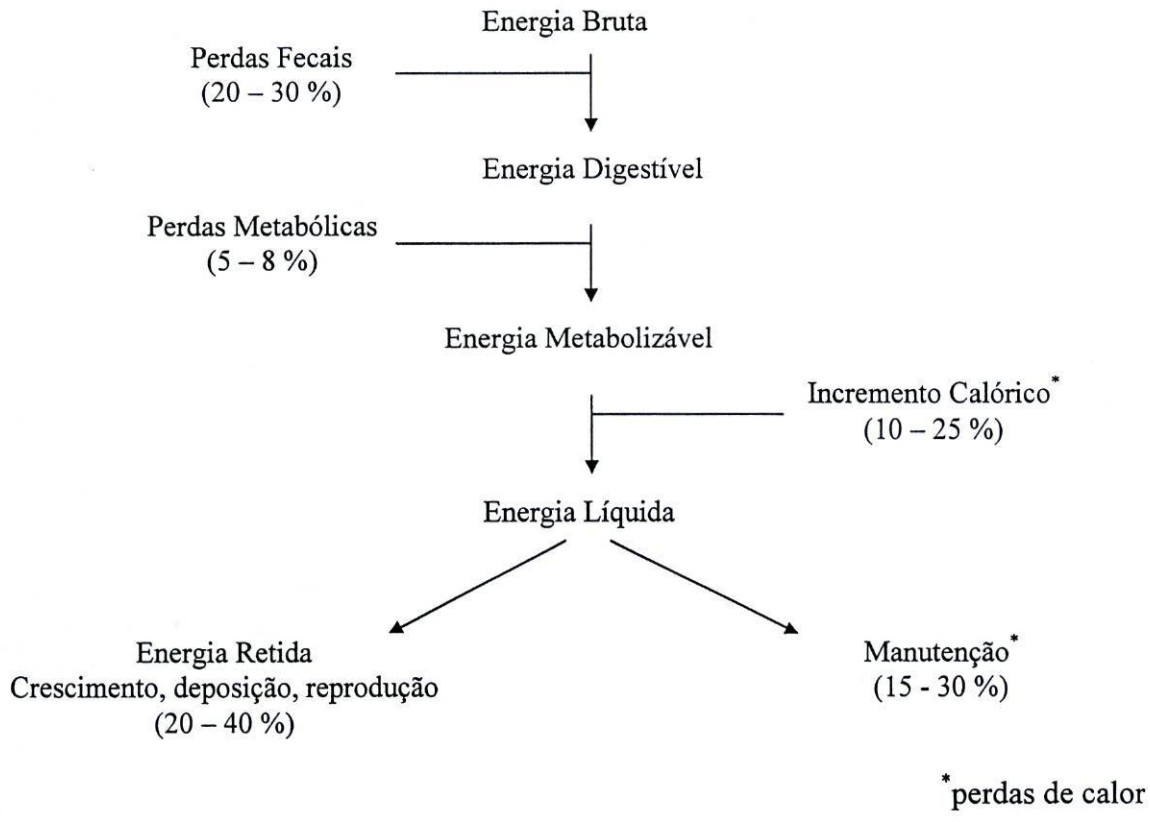


Figura 1.5. Representação esquemática da utilização da energia dos alimentos nos salmonídeos (Kaushik e Médale, 1994).

A relação entre a proteína e a energia da dieta deve manter-se em equilíbrio, de modo a optimizar a utilização da proteína e a reduzir as perdas de compostos azotados para o meio ambiente. Quando a dieta fornecida é deficiente em energia não proteica, as proteínas são utilizadas para o fornecimento da energia necessária para fins de manutenção. De modo inverso, quando a dieta fornecida contem um excesso de energia não proteica, o apetite dos peixes pode ser saciado antes da ingestão dos nutrientes essenciais em quantidade suficiente

para satisfazer as necessidades de crescimento e o excesso de energia fornecida é depositada sob a forma de gordura nas carcaças, alterando as sua características organolépticas (qualidade do produto final) e a duração da conservação do pescado (NRC, 1993).

A relação óptima entre a proteína digestível e a energia digestível (PD/ED) da dieta para o crescimento máximo foi estimada para diversas espécies de teleósteos e indica-se na tabela 1.12. O valor da relação PD/ED das dietas dos peixes é substancialmente superior ao estimado para os suínos e as aves (9,5 a 14,5 mg/kJ; NRC, 1984, 1988). Dado que os peixes convertem a proteína da dieta em proteína corporal tão eficientemente quanto os animais terrestres (Smith, 1989), a razão desta diferença atribui-se a uma menor necessidade em energia para fins de manutenção nos peixes.

Tabela 1.12. Relação óptima entre a proteína digestível e a energia digestível (PD/ED) da dieta para o crescimento de diferentes espécies de teleósteos.

	ED (kJ/g dieta)	PD/ED (mg/kJ)	Referência
Truta arco-íris	15,1	22,0	Cho e Kaushik (1990)
(*Oncorhynchus mykiss*)	17,2	25,1	Cho e Woodward (1989)
Carpa	12,1	18 - 20	Kaushik (1995 b)
(*Cyprinus carpio*)			
Peixe gato	12,8	22,5	Garling e Wilson (1976)
(*Ictalurus punctatus*)	11,6	23,2	Mangalik (1986)
Tilápia do Nilo	12,1	24,6	El-Sayed (1987)
(*Oreochromis niloticus*)			

Inicialmente, as recomendações da relação PD/ED óptima das dietas para salmonídeos eram da ordem dos 22 – 25 mg /kJ, com níveis de energia digestível de 15 – 17 kJ/g dieta (Cho e Woodward, 1989; Cowey, 1992). No entanto, as dietas actualmente empregues na produção de salmonídeos contêm elevados níveis lipídicos (> 30% em base seca) (Lie, 1997), e a relação óptima PD/ED foi consideravelmente reduzida (15 –16 mg/kJ). Os efeitos benéficos destas dietas no crescimento e na economia das proteínas da dieta foram referidos por diferentes autores (Hillestrad e Johnsen, 1994; Médale et al., 1995).

Para a maioria dos peixes marinhos, a relação PD/ED óptima da dieta está relativamente mal conhecida. Para a dourada e para o dentex (*Dentex dentex*) a relação PD/ED óptima foi estimada, respectivamente, em 29,8 mg/kJ (Santinha et al., 1996) e em 24,3 mg/kJ (Tibaldi et al., 1996a). Para o robalo, a relação de PD/ED óptima da dieta foi, inicialmente, estimada em 25–30 mg/kJ (Alliot et al., 1979 a; Métailler et al., 1981). Trabalhos mais recentes demonstraram que o valor da relação PD/ED poderia ser diminuído para 19–20 mg/kJ em dietas com um teor em energia digestível de, pelo menos, 21 kJ/g (em base seca) (Dias et al., 1998).

Uma vez que a informação disponível sobre as necessidades energéticas está limitada a um pequeno número de espécies de peixes, por vezes recorre-se a uma estimativa empírica das necessidades energéticas. Este tipo de aproximação baseia-se no estudo dos balanços energéticos, que permitem estimar a energia retida com base na determinação da energia dos produtos de excreção e da produção total de calor. Cho e Kaushik (1990), com base em diversos balanços energéticos estabelecidos em condições laboratoriais, estimaram que a truta arco-íris, mantida a 15 °C, necessita de 14,9 MJ de energia digestível por kg de peso ganho. Contudo, diversos factores influenciam o balanço energético dos peixes, tais como a composição da dieta, a taxa de ingestão e a composição química do ganho corporal. Deste modo, este tipo de aproximação deve ser usada cuidadosamente até que exista informação suficiente sobre as necessidades energéticas para as diferentes condições de produção aquícola de uma determinada espécie.

1.4. Nutrição, aquacultura e ambiente

Hoje em dia, a aquacultura é uma indústria confrontada com o grande desafio de aumentar a produtividade sem prejudicar a qualidade do meio ambiente. Em geral, a maioria das práticas de aquacultura são reconhecidas como tendo um grande interesse na produção de proteína de elevado valor nutricional e um reduzido custo ambiental (FAO, 1997). No entanto, face ao aumento da produção aquícola, traduzida pela intensificação dos sistemas de produção, o impacto ambiental assumiu-se como um dos principais factores condicionantes do desenvolvimento sustentado desta indústria, principalmente nas zonas costeiras de alguns países (Shehadeh e Pedini, 1997).

O reconhecimento da importância da expansão sustentada da aquacultura tem impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias de produção. Estas visam atingir um equilíbrio entre a produção e o custo ambiental, em grande parte relacionado com a qualidade dos efluentes aquícolas e com a excessiva dependência da produção aquícola relativamente aos recursos piscícolas enquanto fontes alimentares (Tacon, 1997).

Relativamente à qualidade dos efluentes aquícolas, em termos quantitativos a aquacultura está longe de ser uma fonte importante de poluição dos recursos hídricos. Contudo, dada a extrema dependência da produção aquícola de água de boa qualidade, as considerações sobre a poluição têm um significado maior no contexto da aquacultura do que em qualquer outro sistema de produção (Roberts e Muir, 1995; Pillay, 1996).

A redução do impacto ambiental dos efluentes aquícolas envolve o seu tratamento antes de serem lançados no meio ambiente e, sobretudo, a redução dos dejectos na fonte. Do ponto de vista nutricional e para os salmonídeos, foram realizados grandes progressos no sentido de reduzir os dejectos na fonte, isto é, de maximizar a retenção dos nutrientes e minimizar as sua perdas para os efluentes aquícolas (Watanabe et al., 1987a; Kaushik e Médale, 1994; Rérat e Kaushik, 1995; Tacon, 1997). Para os peixes marinhos pouco trabalho foi realizado neste domínio, apesar do seu evidente interesse e importância (Watanabe, 1991).

As estratégias nutricionais de redução das cargas poluentes dos efluentes piscícolas englobam a formulação de dietas que satisfaçam as necessidades nutricionais dos peixes, sem excessos e tendo em conta a biodisponibilidade e possíveis interacções dos nutrientes, o aumento da digestibilidade das dietas (matéria orgânica, proteína, energia e fósforo) e a gestão adequada da alimentação (tabela 1.13).

Tabela 1.13. Estratégias nutricionais para a redução dos dejectos aquícolas[1].

Dejectos	Estratégias nutricionais
Sólidos suspensos	**Gestão da alimentação e qualidade das matérias primas**
Alimento (< 30 %)	Modalidade da alimentação
Fezes:	Aumento da digestibilidade das dietas:
Matéria seca (<30 %)	Aumento da energia digestível (fibra alimentar)
Azoto (< 20 %)	Aumento da disponibilidade azotada
Fósforo (30 - 60%)	Fonte de fósforo, fitases
Compostos solúveis	**Formulação das dietas/ interacção entre nutrientes das dietas**
Azoto (40 - 60 %)	Relação proteína/energia; perfil aminoacídico
Fósforo (15 - 25 %)	?

[1]Adaptado de Kaushik (1996a).

Os dejectos aquícolas são excretados sob a forma de sólidos suspensos e de compostos solúveis. Os sólidos suspensos resultam tanto da má gestão da alimentação (desperdício de alimento) quanto da utilização digestiva dos alimentos (perdas de origem fecal). A redução do desperdício de alimento implica uma gestão da alimentação que considere todos os factores

que influenciam a ingestão voluntária do animal, nomeadamente factores ambientais (temperatura), factores intrínsecos ao animal (ritmo e comportamento alimentar, velocidade do transito intestinal) e composição da dieta (dieta nutricionalmente equilibrada, densidade energética da dieta) (Thorpe e Cho, 1985).

O conhecimento da digestibilidade das matérias primas é imprescindível para a formulação de dietas que visam a redução das perdas fecais. De modo geral, pode-se dizer que a digestibilidade das proteínas e das gorduras é elevada (Austereng et al., 1980; Cho, 1993). Deste modo, a digestibilidade da dieta está grandemente associada aos hidratos de carbono. A utilização digestiva dos hidratos de carbono depende da natureza e complexidade da molécula e do seu nível de incorporação na dieta. O recurso a tratamentos hidrotérmicos, como a extrusão das matérias primas ou do alimento, permite melhorar a utilização digestiva dos hidratos de carbono e inibir os factores anti-nutricionais, os quais estão presentes em algumas matérias primas vegetais e diminuem a digestibilidade das proteínas (Krogdahl e Holm, 1983; Jeong et al., 1991). O fabrico de dietas de elevada densidade energética, em que a fibra e os hidratos de carbono não digestíveis são reduzidos, contribui significativamente para a redução das perdas fecais (Johnsen e Wandsvik, 1991).

Os dejectos solúveis são representados maioritariamente por compostos azotados e fosforados. Como foi referido anteriormente, a contribuição da energia proteica para o metabolismo energético total dos peixes é bastante elevada, correspondendo entre 30 a 70% da proteína da dieta (Kaushik e Cowey, 1991). Como consequência, os peixes excretam uma considerável quantidade de amónia, proporcional à quantidade de proteína ingerida (Rychly, 1980; Kaushik e Cowey, 1991). A importância nutricional, ambiental e económica da redução da utilização da proteína da dieta para fins energéticos incentivou, desde os anos 70, a realização de trabalhos sobre a economia proteica, mediante o aumento da energia digestível das dietas (Lee e Putnam, 1973). A utilização de dietas de elevada densidade de nutrientes e de energia possibilitou o desenvolvimento de dietas menos poluentes ou "ecológicas" (Cho, 1993). Em salmonicultura intensiva, a utilização deste tipo de dietas provou melhorar a eficiência de conversão alimentar e reduzir significativamente as perdas azotadas (figura 1.6), sem contudo afectar negativamente as performances zootécnicas dos peixes (Kiaerskou, 1991; Johnsen e Wandsvik, 1991).

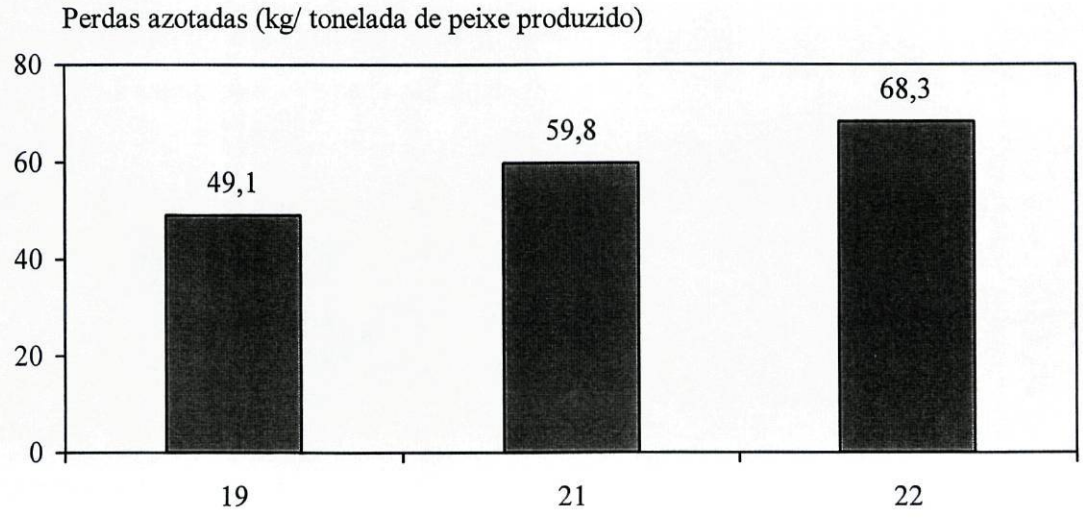


Figura 1.6. Influência da relação proteína digestível/energia digestível da dieta na excreção azotada da truta arco-íris (Robert et al., 1993).

A alimentação é a principal responsável pelas elevadas cargas de fósforo dos efluentes piscícolas. Em geral, o teor em fósforo das dietas para peixes ultrapassa largamente as suas necessidades, estimadas em 0,3 – 0,7% da dieta (NRC, 1993). Todo o fósforo excedente é excretado directamente na água, na forma particulada ou solúvel, podendo perfazer 80% do fósforo da dieta (Ketola e Hapland, 1993). Para a redução efectiva das descargas de fósforo é imprescindível a redução do aporte alimentar em fósforo, nomeadamente do aporte mineral, e a avaliação precisa da disponibilidade do fósforo nas diferentes matérias primas. A título de exemplo, para os salmonídeos foi demonstrado que a diminuição do nível de incorporação de fósforo na dieta de 2 para 1% conduziu a um aumento da digestibilidade do fósforo de 47 para 60% e a uma diminuição do fósforo eliminado de 18 para 6 g/kg de peixe produzido (Médale et al., 1997). A disponibilidade do fósforo alimentar é influenciada por diversos factores, tais como a forma química, a digestibilidade, a absorção e a utilização metabólica. A disponibilidade do fósforo das matérias primas de origem animal é, em geral, superior à das de origem vegetal. A incorporação nas dietas de farinhas de peixe de qualidade superior, com uma elevada disponibilidade de fósforo e um baixo teor em cinzas e fósforo, permite reduzir

os dejectos fosforados dos peixes (Jacobsen e Børresen, 1995). O fósforo presente nas matérias primas vegetais sob a forma de ácido fítico é praticamente indisponível devido à ausência de fitases no tubo digestivo dos peixes. Para algumas espécies de peixe, incluindo o robalo, foi demonstrado que a incorporação nas dietas de fitases, de origem microbiana ou outra, aumenta significativamente a digestibilidade do fósforo de origem fítica, o que permite reduzir o aporte suplementar de fósforo inorgânico e diminuir as perdas para o meio ambiente (Rodehutscord e Pfeffer, 1995; Schäfer et al., 1995; Oliva-Teles et al., 1998).

O estabelecimento de modelos preditivos das descargas de nutrientes, baseados apenas em estudos limnológicos, permite obter informação *a posteriori* sobre as quantidades reais de dejectos sólidos e solúveis dos efluentes. O método biológico, baseado em dados nutricionais (ingestão e digestibilidade do alimento; retenção por kg de peso ganho), permite obter informação *a priori* das potenciais perdas fecais e metabólicas. Dada as dificuldades técnicas e metodológicas envolvidas nos estudos limnológicos, o método biológico foi proposto como sendo o mais prático, para além de ser o mais sensível na avaliação das descargas de nutrientes para o ambiente aquático (Cho, 1993; Rodrigues, 1995).

2. Metodologia Geral

2.1. Material animal

Todos os ensaios foram realizados com juvenis de robalo, *Dicentrarchus labrax* L., adquiridos em pisciculturas comerciais.

Os animais foram transportados das pisciculturas para as instalações experimentais da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" da Faculdade de Ciências do Porto em tanques de fibra de vidro de 200 litros de capacidade, com arejamento constante assegurado por uma garrafa de ar comprimido. À chegada às instalações experimentais, os peixes eram submetidos a um banho de desinfecção com formol a 1%, durante 15 minutos, com vista à eliminação de eventuais ectoparasitas. De seguida, eram alojados em tanques cilíndricos de 300 litros de capacidade e mantidos em quarentena durante uma a duas semanas. Durante esse período os peixes eram alimentados com uma ração de manutenção.

2.2. Ensaios de crescimento

2.2.1. Instalações experimentais

O sistema experimental era constituído por uma ou duas baterias de 12 tanques cilíndricos de fibra de vidro, de 100 litros de capacidade, montados em série num sistema de recirculação de água com renovação parcial (figura 2.1).

Em cada um dos tanques estabeleceu-se uma corrente contínua de água salgada, cujo débito era ajustado de acordo com a biomassa do tanque. O efluente dos tanques desaguava numa caleira comum, que conduzia a água até ao sistema de filtração. O sistema de filtração era constituído por 2 tanques quadrangulares de 500 litros de capacidade e um filtro de areia. O primeiro tanque compreendia duas zonas: zona de recepção da água dos tanques, que funcionava como bacia de sedimentação e onde estava colocada uma armação plástica contendo um filtro mecânico (esponja), para retenção dos detritos mais grosseiros e zona de filtração biológica que continha ouriços filtrantes de alta densidade. Deste tanque, a água era

conduzida para o segundo tanque constituído por uma zona de filtração biológica, com ouriços filtrantes de alta densidade, e uma zona de adução da água à bomba. Antes da água ser bombeada para os tanques passava ainda por um filtro de areia acoplado à bomba eléctrica (figura 2.1).

Os ensaios decorreram em condições de temperatura controlada a 18, 22 ou 25 °C, consoante a experiência. Para tal, recorreu-se a um sistema de refrigeração ou a uma resistência de aquecimento conforme o caso.

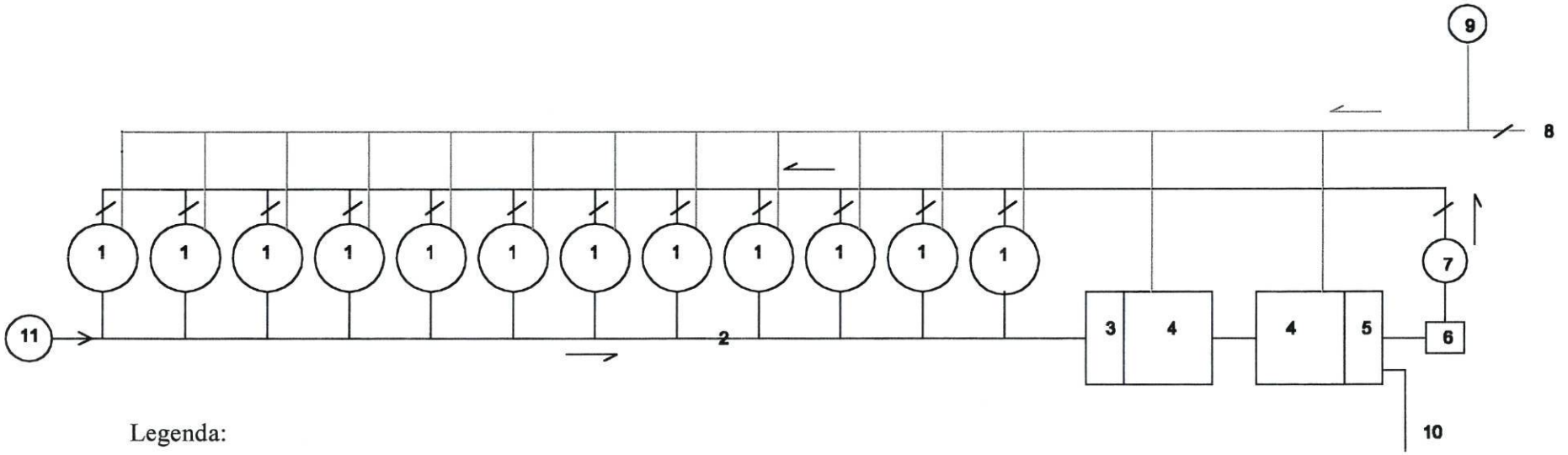
A aerificação da água de cada um dos tanques e do biofiltro era assegurada por um sistema de ar comprimido. Um sistema de arejamento de emergência, constituído por 4 garrafas de oxigénio comprimido, era accionado por uma electroválvula em caso de falha eléctrica.

2.2.2. Protocolo experimental

Todos os peixes utilizados em cada um dos ensaios de crescimento provinham de um lote de peixes comum. Depois de uma a duas semana de adaptação às condições experimentais, constituíam-se 12 ou 24 grupos de 25 peixes, com um peso médio inicial idêntico. De modo a constituir os grupos da forma mais homogénea possível, os peixes eram levemente anestesiados (éter etilenoglicolmonofenílico; 0,3 ml/litro), enxugados com um pano e pesados em grupos de 5 peixes. Antes do início do ensaio efectuava-se uma análise de variância de modo a confirmar que o peso dos grupos experimentais não diferia entre si.

Com excepção do primeiro ensaio (ver especificações no capítulo 3), as dietas experimentais eram distribuídas a triplicados destes grupos, escolhidos de modo aleatório. Os animais eram alimentados manualmente, até à saciedade visual, duas vezes ao dia, sete dias por semanas, excepto no dia anterior ao das pesagens. A ingestão de alimento era quantificada diariamente.

Quinzenalmente, os peixes de cada grupo eram ligeiramente anestesiados (éter etilenoglicolmonofenílico; 0,3 ml/litro), contados e pesados em grupo.



Legenda:

1 Tanques experimentais
2 Calha de esgoto
3 Sistema de filtração (zona de recepção do esgoto)
4 Sistema de filtração (filtro biológico)
5 Sistema de filtração (zona de adução)
6 Filtro de areia
7 Bomba eléctrica
9 Garrafa de ar comprimido
11 Esgoto do sistema
12 Entrada de água e filtro mecânico
→ Circulação de água
→ Circulação do ar

Figura 2.1. Representação esquemática do sistema experimental onde foram efectuados os ensaios de crescimento.

Para a análise da composição corporal eram retirados aleatoriamente 6 a 12 peixes do lote de peixes inicial e 6 peixes de cada grupo experimental no final do ensaio. Estes peixes eram pesados individualmente e o peso do fígado e das vísceras quantificado, com vista à determinação dos índices hepatossomático e visceral. No final do 3° e 4° ensaios de crescimento, 4 outros animais eram amostrados para recolhas de sangue, fígado e músculo. A colheita de sangue era efectuada por punção venosa caudal, com agulha heparinizada, seguida de centrifugação imediata e congelação do plasma para posterior análise. O fígado era recolhido, pesado e congelado a –70 °C para análise posterior. As amostras de músculo eram colhidas da área dorso-lateral do corpo, caudalmente à barbatana dorsal, e congeladas a – 70 °C para análise posterior.

Durante o ensaio de crescimento a temperatura e a salinidade da água eram registadas diariamente. Os teores de amónia, de nitritos e de oxigénio eram verificados periodicamente. O fotoperíodo era o natural para o época do ano em que se desenrolaram os ensaios.

2.3. Ensaios de digestibilidade

2.3.1. Instalações experimentais

O sistema experimental era constituído por 4, 8 ou 12 tanques de fibra de vidro, de 55 litros de capacidade, montados em série num sistema de recirculação de água com renovação parcial (figura 2.2). Cada um dos tanques tinha acoplado, à saída da água, uma coluna de sedimentação de fezes. A estrutura dos tanques e da coluna de sedimentação era idêntica à do Sistema de Guelph para estudos de digestibilidade, descrito por Cho et al. (1982) (figura 2.3).

As fezes eram conduzidas do tanque até à coluna de sedimentação pela corrente de água resultante da entrada de água pela parte posterior do tanque. A velocidade da corrente da água era ajustada, de modo a que este percurso fosse percorrido rapidamente. As fezes depositavam-se na zona terminal da coluna de sedimentação, com água estagnada, onde permaneciam até serem recolhidas.

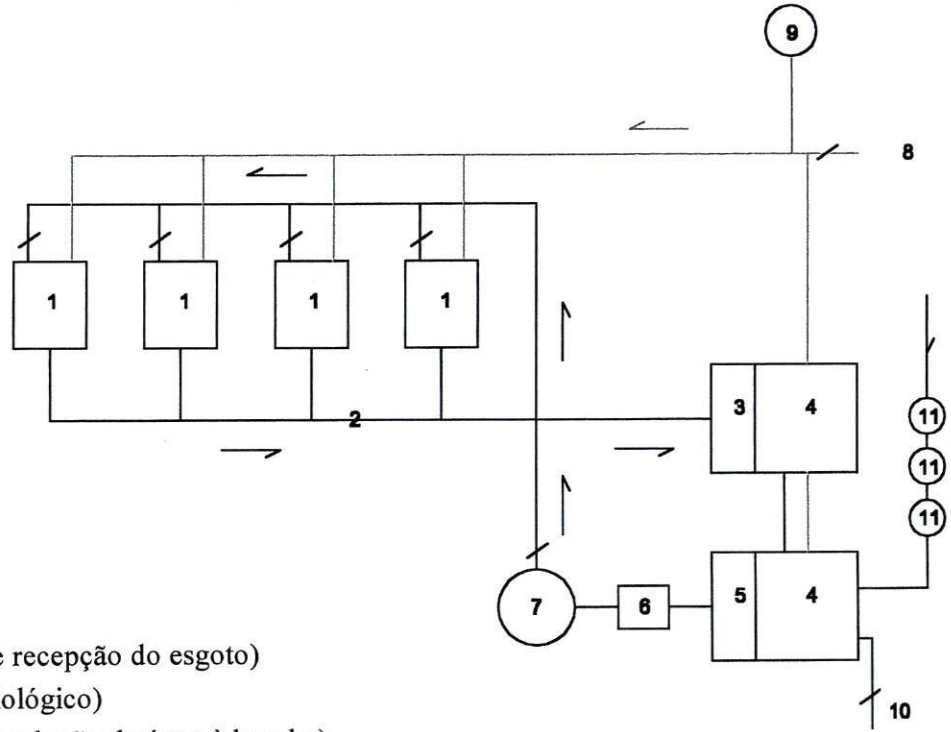
O efluente de cada um dos tanques desaguava numa caleira comum, que conduzia a água até ao sistema de filtração, cuja constituição era similar à descrita nas instalações experimentais dos ensaios de crescimento.

Os ensaios de digestibilidade eram realizados a uma temperatura da água constante (18, 22 ou 25 °C), recorrendo-se a um sistema de termorregulação idêntico ao descrito para os ensaios de crescimento. O sistema de aerificação dos tanques e do sistema de filtração, assim como o sistema de aerificação de emergência, eram idênticos ao descrito nas instalações experimentais dos ensaios de crescimento.

2.3.2. Protocolo experimental

No final do ensaio de crescimento, os peixes eram transferidos para os tanques de digestibilidade, onde permaneciam durante 10 a 15 dias para adaptação às novas condições experimentais. Decorrido este período, os animais eram levemente anestesiados (éter etilenoglicolmonofenílico; 0,3 ml/litro), enxugados com um pano e pesados de modo a constituírem-se 4, 8 ou 12 grupos experimentais de peso equivalente.

As dietas experimentais eram testadas em triplicado, com excepção do primeiro e do último ensaio em que foram testadas em duplicado. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia, manualmente, até à saciedade visual (excepto no primeiro ensaio). As fezes eram recolhidas diariamente, uma hora antes da primeira refeição, imediatamente centrifugadas (3500 rpm; 30 minutos) para retirar a água e congeladas a –20 °C, para posterior análise. A limpeza do sistema era efectuada uma hora após a última refeição do dia, com o auxílio de uma escova, provocando um fluxo grande de água pela abertura da torneira da coluna de sedimentação e, deste modo, removendo qualquer resíduo de alimento ou fezes. Mais de metade da água de cada tanque era drenada neste processo.



Legenda:

1 Tanques experimentais
2 Calha de esgoto
3 Sistema de filtração (zona de recepção do esgoto)
4 Sistema de filtração (filtro biológico)
5 Sistema de filtração (zona de adução da água à bomba)
6 Filtro de areia
7 Bomba eléctrica
9 Garrafa de ar comprimido
11 Esgoto do sistema
12 Entrada de água e filtro mecânico
→ Circulação de água
→ Circulação do ar

Figura 2.2. Representação esquemática do sistema experimental onde foram efectuados os ensaios de digestibilidade.

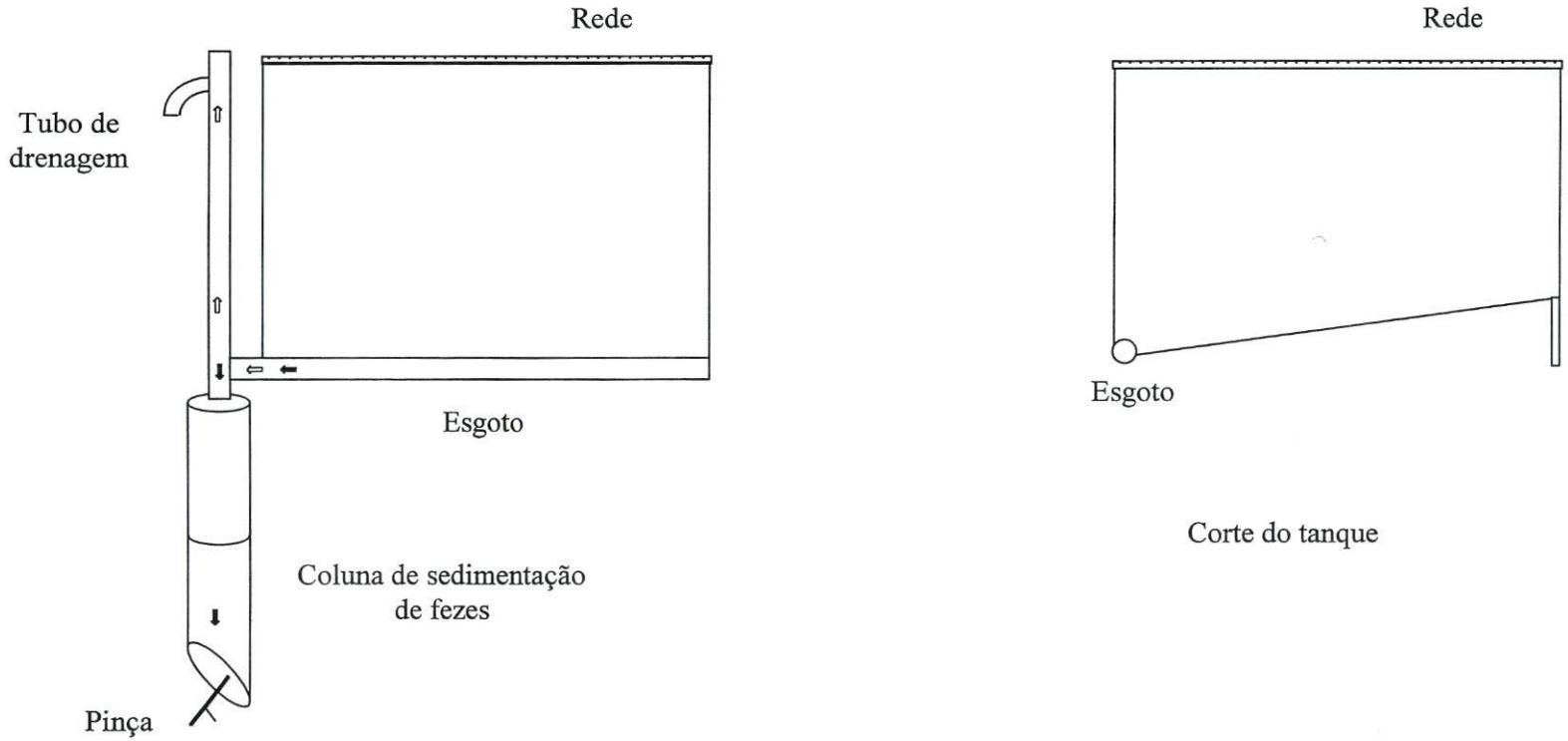


Figura 2.3. Representação esquemática de um tanque experimental e da coluna de sedimentação de fezes do sistema de digestibilidade (setas vazias representam a circulação da água; setas a cheio representam a circulação das fezes).

Consoante o ensaio de digestibilidade, consideraram-se um ou três períodos experimentais consecutivos. No primeiro caso, todas as dietas experimentais eram testadas simultaneamente em duplicado ou em triplicado. No segundo caso e em cada período experimental, as dietas eram distribuídas aleatoriamente entre os grupo experimentais, obtendo-se assim uma réplica de cada uma das dietas experimentais por período (figura 2.4). Em cada período, todas as fezes correspondentes a uma dieta eram armazenadas em conjunto. Cada período compreendia 7 dias de adaptação ao alimento e 15 a 20 dias consecutivos de recolha de fezes.

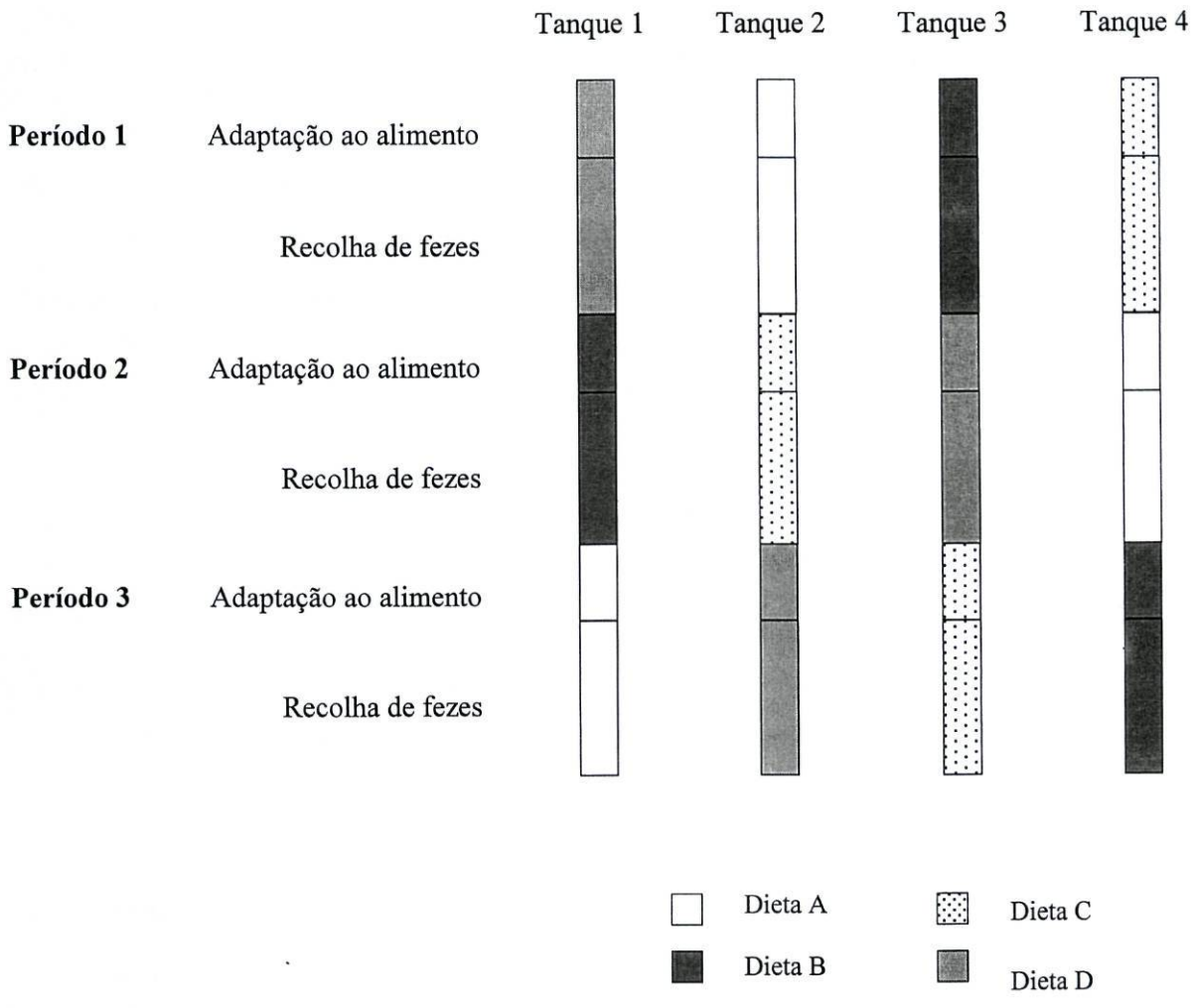


Figura 2.4. Representação esquemática do protocolo experimental seguido nos ensaios de digestibilidade realizados em três períodos.

2.4. Ensaios de metabolismo

2.4.1. Instalações experimentais

Os ensaios de metabolismo eram efectuados no mesmo sistema experimental utilizado para os ensaios de digestibilidade. Cada ensaio era realizado com 4 tanques com peixes, um tanque sem peixes e um recipiente contendo uma solução padrão de amónia. Cada um dos tanques era tapado com uma tampa flutuante em acrílico transparente ajustada às paredes, de modo a evitar trocas gasosas com o ar (figura 2.5).

A aerificação dos tanques era suprimida e a do filtro intensificada. O débito de água em cada um dos tanques era ajustado de acordo com o número e peso dos peixes, de modo a que o teor em oxigénio dissolvido fosse sempre superior a 75% do valor da saturação. Estabeleceu-se um fotoperíodo constante de 24 horas de luz, de modo a minimizar as flutuações diurnas da taxa metabólica (Hutchinson e Kohl, 1971). Os ensaios eram realizados a temperatura constante (18 ou 25 °C), recorrendo-se a um sistema de termorregulação idêntico ao descrito para os ensaios de crescimento.

2.4.2. Protocolo experimental

Os peixes utilizados nestas experiências provinham do lote inicial ou do ensaio de digestibilidade. Os peixes eram levemente anestesiados, enxugados com um pano e pesados, de modo a constituírem-se 4 grupos de animais de peso equivalente.

A adaptação às condições experimentais durava pelo menos uma semana, durante a qual os peixes eram alimentados manualmente com as diferentes dietas experimentais, duas vezes ao dia (11 e 17 horas), até à saciedade visual.

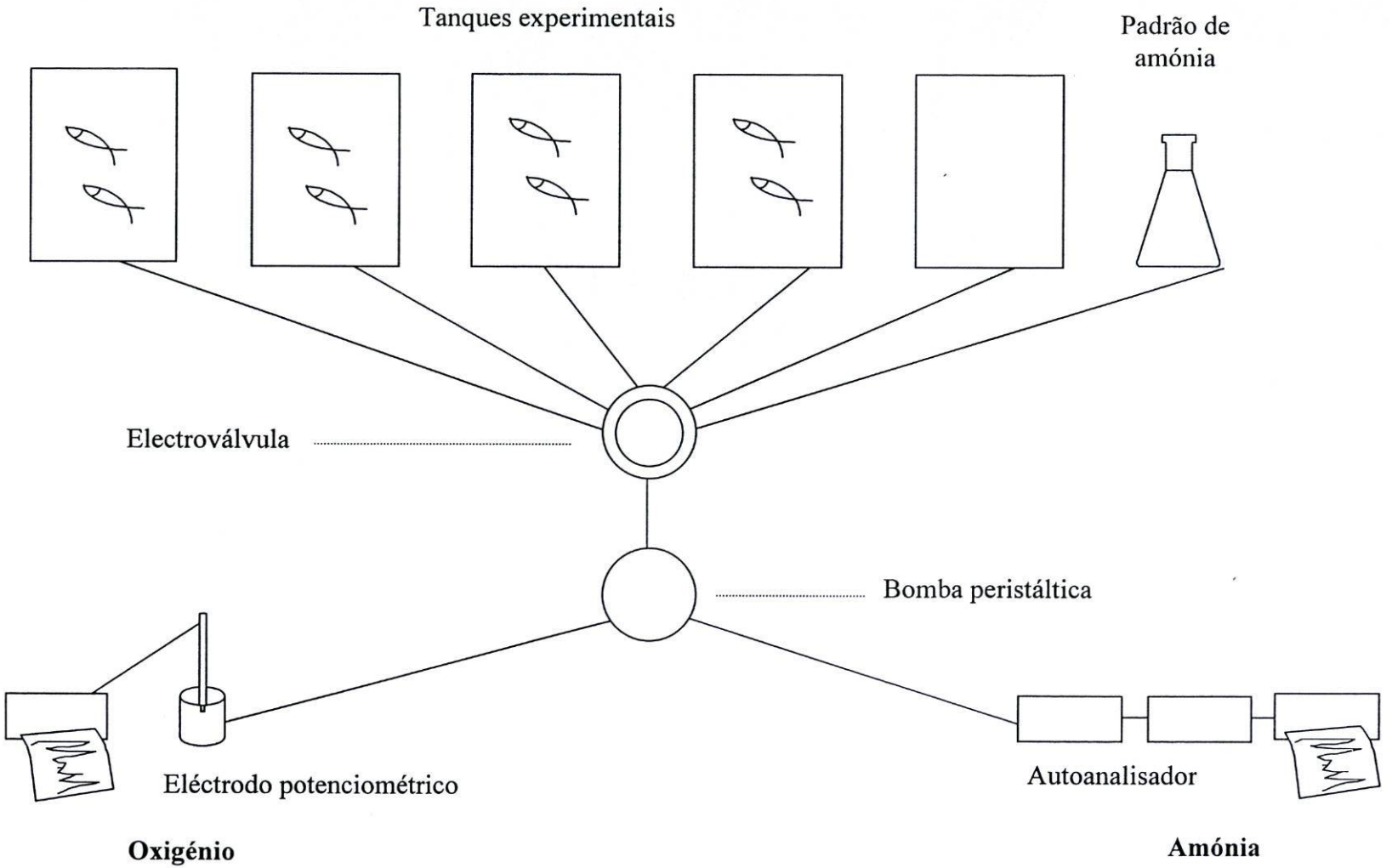


Figura 2.5. Representação esquemática do sistema experimental usado no ensaio de metabolismo.

Findo o período de adaptação, os peixes eram pesados em grupo e no dia seguinte dava-se início ao doseamento em contínuo do consumo de oxigénio e da excreção de azoto amoniacal pós-prandiais, durante 3 ciclos diários consecutivos. Uma hora era utilizada para a limpeza e a calibração do sistema. Em cada ciclo diário, a distribuição de alimento era espaçada 5 minutos entre cada tanque, de modo a que a recolha de amostras de água fosse realizada em intervalos idênticos após as refeições. De seguida, os peixes eram privados de alimento, doseava-se o consumo de oxigénio e a excreção de azoto amoniacal, durante um ciclo diário, ao 4°, 7° e 9° dias de jejum no primeiro ensaio e ao 9° dia de jejum nos restantes ensaios. No dia anterior aos doseamentos em condições de jejum os peixes eram pesados em conjunto.

As amostras de água e da solução padrão de amónia eram recolhidas automaticamente por meio de tubos de *teflon*, de comprimentos iguais, que se colocavam perto do efluente de cada tanque. Estes tubos estavam ligados a uma electroválvula de seis posições (RHEODYNE 5012P), regulada por um temporizador e conectada a uma bomba peristáltica (figura 2.5). Em cada ciclo de 30 minutos, a solução padrão de amónia e os efluente de cada um dos tanques com peixes e do tanque sem peixes eram analisados continuamente durante 5 minutos. Cada amostra de água era dividida em duas partes. Uma parte era dirigida para um eléctrodo potenciométrico de oxigénio (WTW OXI 91) para doseamento do teor em oxigénio dissolvido e a outra era dirigida para um autoanalisador CHEMLAB, para análise do azoto amoniacal.

Durante o ensaio, a temperatura e a salinidade da água eram verificadas duas vezes por dia. O débito de água de cada um dos tanques era controlado seis a oito vezes por dia.

O consumo de oxigénio (O) e a excreção de azoto amoniacal (N) foram calculados pela seguinte formula (Kaushik, 1980):

$$\text{O ou N} = \frac{(S_2 - E_2) - (S_1 - E_1)}{P} \times V + \frac{(S_2 - E_2) + (S_1 - E_1)}{2 \times P} \times D$$

em que:

O: oxigénio (em mg/kg peso vivo/hora)

N: azoto amoniacal (em mg/kg peso vivo/hora)

S1 e S2: concentração de oxigénio ou amónia no tanque com peixes, respectivamente no tempo 1 e 2 (em mg/litro)

E1 e E2: concentração de oxigénio ou amónia no tanque sem peixes, respectivamente no tempo 1 e 2 (em mg/litro)

P: peso do grupo de peixes (em kg)

V: volume de água no tanque (em litro)

D: débito de água (em litro/hora)

2.5. Dietas experimentais

A composição das dietas experimentais utilizadas nos diferentes ensaios é descrita nos capítulos respectivos. As dietas experimentais eram formuladas com base na análise prévia da composição química e do valor energético dos respectivos ingredientes. Em todas as dietas era incorporado óxido de crómio (Cr_2O_3), como marcador externo, para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente das dietas.

Após a pesagem individual de todos os ingredientes da dieta, procedia-se em primeiro lugar à mistura dos ingredientes secos, aos quais eram depois adicionados os complexos vitamínico (tabela 2.1) e mineral (tabela 2.2), o cloreto de colina, o sulfato de lenhina e o óxido de crómio, numa misturadora laboratorial *Alexanderwerk*. De seguida, adicionava-se o óleo, previamente misturado com um antioxidante (butilhidroxitolueno (BTH); 0,02g/100g dieta, em base seca). Por fim, adicionava-se água (em média 5% do peso total), de modo a obter uma mistura coesa que era granulada a seco numa granuladora laboratorial CPM (*California Pellet Mill*), através de uma matriz de 2 - 3 mm, dependendo do tamanho do peixe a que se destinava a dieta. Depois de arrefecidos ao ar, os grânulos eram peneirados, ensacados e armazenados numa câmara frigorífica (0 – 4 °C).

Tabela 2.1. Composição do complexo vitamínico (UI ou mg/kg dieta).

Retinol (UI/kg dieta)	15000
Colecalciferol (UI/kg dieta)	1667
α Tocoferol (mg/kg dieta)	83,3
Menadiona sódio-bis (mg/kg dieta)	16,6
Tiamina (mg/kg dieta)	12,5
Riboflavina (mg/kg dieta)	12,5
Pantotenato de cálcio (mg/kg dieta)	33,3
Ácido nicotínico (mg/kg dieta)	116,7
Piridoxina (mg/kg dieta)	8,3
Ácido fólico (mg/kg dieta)	4,2
Cianocobalamina (mg/kg dieta)	0,04
Biotina (mg/kg dieta)	0,5
Ácido ascórbico (stay C) (mg/kg dieta)	83,3
Inositol (mg/kg dieta)	250

Tabela 2.2. Composição do complexo mineral (mg ou g/kg dieta).

Sulfato de cobalto (mg/kg dieta)	1,91
Sulfato de cobre (mg/kg dieta)	19,6
Sulfato de ferro (mg/kg dieta)	200
Fluoreto de sódio (mg/kg dieta)	2,21
Iodeto de potássio (mg/kg dieta)	0,78
Óxido de magnésio (mg/kg dieta)	830
Óxido de manganésio (mg/kg dieta)	26
Selenito de sódio (mg/kg dieta)	0,66
Óxido de zinco (mg/kg dieta)	37,5
Fosfato dicálcico (g/kg dieta)	8,02
Cloreto de potássio(g/kg dieta)	1,15
Cloreto de sódio (g/kg dieta)	0,44

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Preparação das amostras

De cada dieta experimental eram retiradas 2 amostras representativas, que eram em seguida moídas até uma granulometria inferior a 1 mm e guardadas em frascos de plástico tapados para posterior análise.

Os peixes retirados para análise da composição corporal eram secos em estufa até um peso constante e em seguida moídos num triturador *Moulinex*, até a granulometria não exceder 1 mm. As amostras assim obtidas eram guardadas em frascos plásticos tapados para posterior análise.

Os peixes retirados para a recolha de fígado, músculo e sangue eram pesados individualmente e o peso do fígado quantificado. As amostras de sangue eram recolhidas em seringas heparinizadas, imediatamente centrifugadas (3500 rpm, 5 minutos) em tubos *epandorf* e o plasma congelado a –20 °C, para posterior análise.

As fezes recolhidas no ensaio de digestibilidade eram secas em estufa até um peso constante. De seguida, eram moídas num almofariz, peneiradas (crivo de 1 mm) para a remoção de escamas e guardadas em frascos plásticos tapados para posterior análise.

2.6.2. Técnicas analíticas para avaliação da composição das dietas, carcaças e fezes

2.6.2.1 Humidade

Por secagem das amostras em estufa a 105° C até peso constante.

2.6.2.2 Cinzas

Por incineração das amostras numa mufla a 450° C durante 16 horas.

2.6.2.3 Proteína bruta

Determinada segundo o método Kjeldahl, em amostras de 0,5 g, para análise de matérias primas, dietas e carcaças, e de 0,15 g para análise das fezes, usando um digestor "1016 Digestor System" e destilador "Kjeltec System 1002". A proteína bruta foi calculada multiplicando o teor em azoto total pelo factor empírico de 6,25.

2.6.2.4 Azoto não proteico

Determinado mediante extracção com ácido tricloroacético segundo o método de Mezincescu e Szabo (1936).

2.6.2.5 Aminoácidos

Avaliados por cromatografia de fase líquida de alta resolução (HPLC), após hidrólise ácida das amostras e derivação com ortoftaldeído segundo as técnicas "modificadas" de Gardner e Miller (1980) e Rajendra (1987). Este procedimento não permitiu o doseamento do triptofano.

2.6.2.6 Lípidos

Determinados mediante extracção contínua com éter de petróleo, num extractor "Soxtec System HT - Tecator".

2.6.2.7 Amido

Determinado pelo método enzimático (amiloglucosidase), segundo a metodologia descrita por Thivend et al. (1972).

2.6.2.8 Óxido de crómio

Determinado pelo método de digestão ácida das amostras, em tomas de cerca de 50 mg nas amostras de fezes e 200 mg nas de dietas, segundo a metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

2.6.2.9 Energia bruta

Determinada mediante combustão total da amostra, numa bomba calorimétrica adiabática, modelo "Parr 1261". As amostras de fezes foram queimadas em pastilhas de 250 mg e as outras amostras em pastilhas de cerca de 500 mg. O aparelho foi previamente calibrado com ácido benzóico. O factor de conversão do valor calórico, para efeito de cálculo foi o seguinte: 1 cal = 4,1814 Joule.

2.6.3. Técnicas analíticas para avaliação da composição do fígado, músculo e plasma

2.6.3.1 Proteína total

Determinada segundo o método de Lowry et al. (1951).

2.6.3.2 Lípidos totais

Determinados segundo o método de Folch et al. (1957).

2.6.3.3 Glicogénio

Determinado segundo o método de Plummer (1987).

2.6.3.4 Aminoácidos totais no plasma

Determinados segundo o método de Spies (1957).

2.6.3.5 Glucose plasmática

Determinada por um método enzimático-colorimétrico (kit de glucose, cod. 1001190; *Spinreact*).

2.6.3.6 Triglicerídeos plasmáticos

Determinados por um método enzimático-colorimétrico (kit de triglicerídeos, cod. 1001312, *Spinreact*).

2.6.4. Técnicas analíticas para avaliação da água dos tanque

2.6.4.1 Oxigénio

A percentagem de saturação do oxigénio dissolvido na água foi doseada com um eléctrodo potenciométrico de oxigénio com ajuste automático de temperatura (WTW OXI 91) e convertido em mg/litro com base em tabelas.

2.6.4.2 Amónia

A amónia dissolvida na água foi doseada num autoanalisador CHEMLAB, segundo o método de Krom et al. (1985).

2.7. Definição dos termos utilizados

2.7.1. Peso Médio (g)

$$PM = \frac{(PMf - PMi)}{2}$$

PMi: peso médio inicial (g peso fresco)

PMf: peso médio final (g peso fresco)

2.7.2. Ganho de Peso (g/kg PM/dia)

$$\frac{(PMf - PMi) \times 1000}{PM \times t}$$

t: intervalo de tempo, em dias

2.7.3. Taxa de Crescimento Específico

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

2.7.4. Unidade Térmica de Crescimento

$$UTC = \frac{(PMf^{1/3} - PMi^{1/3})}{(Temperatura \times t)}$$

Temperatura em °C

2.7.5. Eficiência de Conversão Alimentar

$$ECA = \frac{PMf - PMi}{\text{Alimento ingerido (g MS)}}$$

MS: matéria seca

2.7.6. Coeficiente de Eficácia Proteica

$$CEP = \frac{PMf - PMi}{\text{Ingestão de proteína (g MS)}}$$

2.7.7. Coeficiente de Utilização Digestiva Aparente

$$CUDa\ (\%) = 100 - \frac{100 \times (\ \%\ Cr_2O_3\ A \times \%\ NF\ )}{(\%\ Cr_2O_3\ F \times \%\ NA)}$$

Cr_2O_3 A: óxido de crómio no alimento

Cr_2O_3 F: óxido de crómio nas fezes

NA: nutriente, matéria seca ou energia no alimento

NF: nutriente, matéria seca ou energia nas fezes

2.7.8. Taxa de Retenção

$$RN\ (\%) = \frac{(PMf \times \%\ Nf) - (PMi - \%\ Ni)}{NI} \times 100$$

N: Nutriente, matéria seca ou energia

Ni: Conteúdo inicial dos peixes em nutriente, matéria seca ou energia (% ou kJ)

Nf: Conteúdo final dos peixes em nutriente, matéria seca ou energia (% ou kJ)

NI: Ingestão do nutriente, matéria seca ou energia (g MS ou kJ)

2.7.9. Índice Hepatossomático

$$\text{IHS (\%)} = \frac{\text{Peso fresco do fígado (g)}}{\text{Peso fresco do peixe inteiro (g)}} \times 100$$

2.7.10. Índice Visceral

$$\text{IV (\%)} = \frac{\text{Peso fresco das vísceras (g)}}{\text{Peso fresco do peixe inteiro (g)}} \times 100$$

2.7.11. Balanço Energético

Energia ingerida

EI = Alimento ingerido (g MS) × energia bruta do alimento (kJ/g MS)

Energia digestível

ED = EI × % CUDa energia

Energia metabolizável

EM = ED – E(U+B)

Energia líquida

EL = EM – IC

IC: incremento calórico

Energia retida

ER = EL – E manutenção

Energia fecal

$$EF = EI - ED$$

Energia urinária e branquial

$$E(U + B) = 24{,}9^{*} \times N(U + B)$$

N(U + B): azoto urinário e branquial

*assumindo-se que o valor energético do azoto amoniacal/ureico é de 24,9 kJ/g de azoto (Elliott e Davison, 1975).

Produção de calor

$$PC = \text{consumo } O_2 \text{ pós-prandial} \times 13{,}6^{**}$$

Incremento calórico

$$IC = (\text{consumo } O_2 \text{ pós-prandial} - \text{consumo } O_2 \text{ em jejum}) \times 13{,}6^{**}$$

Energia de manutenção

$$E \text{ manutenção} = \text{consumo } O_2 \text{ em jejum} \times 13{,}6^{**}$$

**assumindo-se que o coeficiente oxienergético é igual a 13,6 J/mg de oxigénio consumido (Elliott e Davison, 1975).

2.7.12. Balanço Azotado

Azoto ingerido

$$NI = \text{Alimento ingerido (g MS)} \times \text{azoto total do alimento (\%)}$$

Azoto digestível

$$ND = NI \times \%\ CUDa\ azoto$$

Azoto retido

$$NR = ND - N(U + B)$$

Azoto fecal

$$NF = NI - ND$$

Azoto urinário e branquial*

$$N(U + B) = \text{excreção de azoto amoniacal} + 15\ \%$$

*estimado através do doseamento do azoto amoniacal, assumindo-se que a excreção de azoto amoniacal corresponde a 85% da excreção azotada total (Guerin-Ancey, 1976; Dosdat et al., 1996).

2.7.13. Proporção da Energia Proteica Despendida no Metabolismo Energético Total (%)

a) Estimada com base na modificação da composição corporal do peixe inteiro no início e no final do ensaio de crescimento.

$$P/E\ (\%) = \frac{E\ Prot - E(U + B)}{(EI - EF - E(U\ B) - ER)} \times 100$$

E Prot: Energia proveniente do catabolismo das proteínas (kJ/g)

$$E\ Prot = N(U + B) \times 6{,}25 \times 23{,}6^{*}$$

$$E(U + B) = 24{,}9^{**} \times N(U + B)$$

$$N(U + B) = NI - NF - NR$$

*assumindo-se que 1g de proteína corresponde a 23,6 kJ

**assumindo-se que o valor energético do azoto amoniacal/ureico é de 24,9 kJ/g de azoto (Elliott e Davison, 1975).

b) Estimada com base no quociente de amónia.

$$P/E\ (\%) = QA \times 0{,}27\ \%^{*}$$

$$QA = \frac{\text{moles de } N.NH_4 \text{ excretado}}{\text{moles de } O_2 \text{ consumido}}$$

* assumiu-se que um quociente de amónia de 0,27 corresponde a um catabolismo proteico aeróbico de 100% (Gnaiger, 1983).

2.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância, de uma ou duas vias, usando o *software package* STATGRAPHICS, versão 7. As diferenças entre médias foram calculadas pela aplicação do teste de comparação múltipla de Duncan (Duncan, 1955).

3. Necessidades Proteicas e Energéticas de Manutenção

3.1. Introdução

As células animais são caracterizadas por estarem num estado de equilíbrio dinâmico em que os vários constituintes tecidulares estão em constante degradação e síntese. Em condições de manutenção, o alimento ingerido tem de garantir um aporte adequado de nutrientes e de energia, de modo a compensar as perdas ocorridas na manutenção das funções vitais do animal, evitando assim o catabolismo dos tecidos corporais (Cho, 1990). As necessidades proteicas e energéticas de manutenção representam as quantidades mínimas de proteína e de energia que o animal tem de ingerir, de modo a que o seu balanço proteico e energético seja igualado a zero.

Do ponto de vista comparativo, as necessidades energéticas de manutenção dos peixes são 10 a 30 vezes inferiores às dos mamíferos (tabela 3.1). Isto resulta do modo de vida aquático, da natureza poiquilotérmica e amoniotélica dos peixes. Apesar da forte participação das proteínas no metabolismo energético dos peixes, as necessidades proteicas de manutenção parecem também ser inferiores às dos mamíferos, se expressas por unidade de peso metabólico (tabela 3.1). Porém, expressas por unidade de energia, as perdas azotadas rondam os 0,5 - 0,7 mg N/kJ nos mamíferos e 2 - 5 mg N/kJ nos peixes (Kaushik e Médale, 1994).

Tabela 3.1. Dados comparativos da taxa metabólica basal e das perdas endógenas azotadas[1].

	Taxa metabólica basal ($MJ/kg^{0,75}$/dia)	Perdas endógenas azotadas (mg $N/kg^{0,75}$/dia)
Vaca	0,32	
Porco	0,31	239
Rato	0,30	218
Galinha	0,36	
Homem	0,29	239
Média dos animais terrestres	0,27	254
Diferentes espécies de peixes	0,01 – 0,07	100 – 200

[1]Adaptado de Kaushik e Médale (1994)

O conhecimento das necessidades proteicas e energéticas de manutenção não tem apenas um interesse teórico. Existem determinadas situações no ciclo de produção dos peixes em que a manutenção do peso dos animais torna-se importante, nomeadamente em casos de adaptação às necessidades do mercado ou durante condições ambientais adversas.

Embora os peixes não gastem energia na manutenção de uma temperatura corporal constante, o metabolismo basal é afectado pela temperatura da água. Por exemplo, na truta arco-íris mantida em jejum, a produção de calor aumentou cerca de quatro vezes (de 12 para 42 kJ/kg ^{0,82}/dia) quando a temperatura da água aumentou dos 7,5 para os 20 °C (Cho e Kaushik, 1990).

Os valores da excreção azotada e da perda total de calor nos animais em jejum são frequentemente utilizados como uma estimativa das necessidades de manutenção. Contudo, estes valores subestimam essas necessidades já que não consideram a qualidade do alimento e os gastos com a sua digestão e transformações metabólicas (Brett e Groves, 1979; Cho e Kaushik, 1990). Uma melhor estimativa das necessidades proteicas e energéticas de manutenção só pode ser conseguida em animais alimentados (Kaushik e Médale, 1994).

As necessidades proteicas e energéticas de manutenção têm sido avaliadas segundo o método de dose-resposta, usando diferentes critérios: 1— baseados em ensaios de crescimento, mediante a avaliação do crescimento (Nose, 1971; Huisman, 1976; Kaushik e Luquet, 1984; Storebakken et al., 1991; Tsevis et al., 1992; Hung et al., 1993; Pannevis e Earle, 1994) e tendo em consideração, ou não, as modificações na composição corporal em proteína e energia (Nose, 1971; Storebakken e Austreng, 1987 b; Brown et al., 1990; Médale et al., 1994; Beck e Gropp, 1995; Ohta e Watanabe, 1996 e 1998) e 2— baseados em ensaios de metabolismo, mediante o doseamento da excreção azotada e da produção de calor (Smith et al., 1978; Meyer-Burgdorff et al., 1989; Médale et al., 1994; Beck e Gropp, 1995; Kaushik et al., 1995b; Lupatsch et al., 1998).

O presente estudo tem como objectivo a determinação das necessidades proteicas e energéticas de manutenção de juvenis de robalo, baseada nos critérios acima referenciados.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Ensaios de crescimento e digestibilidade

Os ensaios de crescimento e de digestibilidade foram realizado num sistema constituído por uma bateria de 10 tanques de 55 litros de capacidade (Cho et al., 1982), montados em série num sistema de recirculação de água com renovação parcial, conforme descrito na secção 2.3.1. Em cada um dos tanques foi estabelecido um fluxo contínuo de água salgada filtrada (2,5 l/min). Durante os ensaios, a temperatura da água foi mantida a 25 ± 0,5 °C, a salinidade foi de 34 ± 1‰ e o fotoperíodo foi ajustado a 24 horas de luz.

Duzentos robalos foram distribuídos de modo uniforme pelos tanques experimentais e adaptados às condições experimentais durante 15 dias. Neste período, os animais foram alimentados manualmente com uma dieta comercial, uma vez por dia, até à saciedade visual e a ingestão voluntária de alimento foi quantificada diariamente. Findo este período, constituíram-se 10 grupos de 18 peixes, com peso médio individual de 22 g. Duplicados destes grupos foram alimentados, durante 4 semanas, com uma dieta experimental, uma vez ao dia (11:00 h), com uma quantidade de alimento equivalente a 0,25%; 0,5%; 1% e 1,5% do peso vivo. Dois outros grupos mantiveram-se em jejum durante todo o período experimental. A composição da dieta é apresentada na tabela 3.2.

Os peixes de cada grupo foram pesados em conjunto no início, após duas semanas e no final do ensaio, depois de um dia de jejum. Após a pesagem intercalar, a quantidade de alimento fornecida aos diferentes lotes experimentais foi ajustada de acordo com a biomassa do tanque. Para posterior análise da composição corporal foram retirados aleatoriamente 6 animais do lote de peixes inicial e de cada grupo no final do período experimental.

As fezes de cada grupo experimental foram recolhidas diariamente por decantação, desde o 7° dia até ao 28° dia do ensaio. As fezes de cada grupo foram misturadas, armazenadas em conjunto e congeladas a –20 °C para posterior análise.

Tabela 3.2. Ingredientes e composição química da dieta experimental.

Ingredientes (% matéria seca)	
Farinha de peixe[1]	57,6
CPSP G[2]	5,0
Óleo de fígado de bacalhau	5,6
Dextrina amarela	28,3
Complexo vitamínico[3]	0,5
Complexo mineral[4]	1,0
Cloreto de colina (50%)	0,5
Sulfato de lenhina	1,0
Óxido de crómio	0,5
Composição química (% matéria seca)	
Matéria seca	88,9
Proteína	45,3
Lípidos	15,3
Cinzas	8,6
Óxido de crómio	0,43
Energia (kJ/g matéria seca)	22,8

[1]Farinha de peixe da Noruega; Proteína: 72%; Lípidos: 13%

[2]Concentrado de proteína solúvel de peixe; Proteína: 75%; Lípidos: 21%; Sopropêche, França

[3 e 4]Composição indicada na tabela 2.1 e 2.2

3.2.2. Ensaio de metabolismo

Após o ensaio de crescimento estabeleceu-se, a partir dos duplicados de cada tratamento, um único grupo de 14 peixes para cada uma das taxas de ingestão (0,25%; 0,5%; 1%; 1,5 % peso vivo). Estes grupos foram colocados nos mesmos tanques, aos quais foi suprimido o arejamento.

Depois de um período de adaptação de 7 dias às novas condições experimentais, doseou-se a excreção de amónia e o consumo de oxigénio pós-prandiais durante 3 ciclos diários, conforme indicado na metodologia geral (secção 2.4.2). A excreção de amónia e o consumo de oxigénio foram também doseados ao 4°, 7° e 9° dia de jejum. Durante o ensaio a temperatura foi de 25 °C, a salinidade média foi de 33 ‰ e o fotoperíodo manteve-se em 24 horas de luz.

3.3. Resultados

3.3.1. Crescimento e digestibilidade

Os dados relativos ao crescimento dos robalos e à eficiência de utilização da dieta experimental são apresentados na tabela 3.3.

O ganho de peso aumentou em relação directa com a taxa de ingestão ($r^2 = 0,98$; $p < 0,01$) e o peso médio final dos robalos alimentados com 0,5 % peso vivo (PV) foi praticamente o mesmo que no início do ensaio. A relação entre a taxa de crescimento específico (TCE) e a taxa de ingestão diária de alimento (X) é descrita pela seguinte equação:

$$TCE = -0,53\ X^2 + 1,99\ X - 0,76 \qquad (r^2 = 0,99;\ n = 10;\ p < 0,01)$$

Tabela 3.3. Crescimento e eficiência de utilização do alimento nos robalos[1].

	Taxa de ingestão (% PV*)				
	0	0,25	0,5	1	1,5
Peso médio inicial (g)	22,2	22,2	22,3	22,2	22,2
Peso médio final (g)	$17,9^{a}$ ±0,2	$20,6^{b}$ ±0,6	$22,8^{c}$ ±0,4	$27,1^{d}$ ±0,3	$29,8^{e}$ ±0,5
Ganho de peso (g/kg PM†/dia)	$-7,6^{a}$ ±0,6	$-2,7^{b}$ ±0,9	$0,9^{c}$ ±0,6	$7,0^{d}$ ±0,5	$10,4^{e}$ ±0,6
Taxa de crescimento específico	$-0,77^{a}$ ±0,06	$-0,27^{b}$ ±0,09	$0,09^{c}$ ±0,06	$0,71^{d}$ ±0,05	$1,05^{e}$ ±0,06
Eficiência de conversão alimentar	—	$-1,08^{a}$ ±0,35	$0,19^{b}$ ±0,13	$0,75^{b}$ ±0,05	$0,76^{b}$ ±0,05
Coeficiente de eficácia proteica	—	$-2,58^{a}$ ±0,77	$0,42^{b}$ ±0,28	$1,66^{b}$ ±0,12	$1,67^{b}$ ±0,11
Retenção azotada (% N ingerido)	—	$12,0^{a}$ ±1,1	$42,7^{b}$ ±1,4	$39,7^{b}$ ±0,6	$35,8^{b}$ ±2,1
Retenção energética (% E ingerida)	—	$-33,2^{a}$ ±10,7	$9,1^{b}$ ±3,9	$30,4^{bc}$ ±1,6	$38,8^{c}$ ±1,7
Retenção lipídica (% L ingeridos)	—	$-295,5^{a}$ ±0,6	$-87,6^{b}$ ±6,8	$26,7^{c}$ ±14,7	$71,8^{d}$ ±9,4

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*Peso vivo

†Peso médio

N: azoto; E: energia; L: lípidos

A eficiência de conversão alimentar e o coeficiente de eficácia proteica aumentaram com o aumento da taxa de ingestão até 1% PV, não tendo variado com o aumento da taxa de ingestão para 1,5% PV (tabela 3.3). Para a taxa de ingestão mais baixa (0,25 % PV) o balanço energético foi negativo, enquanto que o balanço azotado foi positivo para todas as taxas de ingestão testadas. A retenção azotada (% azoto ingerido) aumentou significativamente com o aumento da taxa de ingestão de 0,25 para 0,5% PV e diminuiu, mas não de um modo significativo, para valores de ingestão mais elevados. Pelo contrário, as retenções energética e lipídica (% energia ou lípidos ingeridos, respectivamente) aumentaram significativamente com o aumento da taxa de ingestão (tabela 3.3).

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta experimental são apresentados na tabela 3.4. O CDA da matéria seca não foi significativamente afectado pela taxa de ingestão. O CDA da proteína foi igual nos níveis de ingestão mais baixos, mas foi significativamente menor para a taxa de ingestão de 1,5% PV. O CDA da energia diminuiu significativamente com o aumento da taxa de ingestão.

Tabela 3.4. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) da dieta experimental[1].

	Taxa de ingestão (% PV*)			
	0,25	0,5	1	1,5
Matéria seca	99,1 ±0,1	91,4 ±0,0	92,3 ±0,1	91,6 ±0,1
Proteína	$97,1^{b}$ ±0,2	$97,4^{b}$ ±0,0	$97,1^{b}$ ±0,1	$96,3^{a}$ ±0,1
Energia	$98,8^{c}$ ±0,1	$97,7^{b}$ ±0,2	$97,4^{b}$ ±0,1	$96,7^{a}$ ±0,0

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*Peso vivo

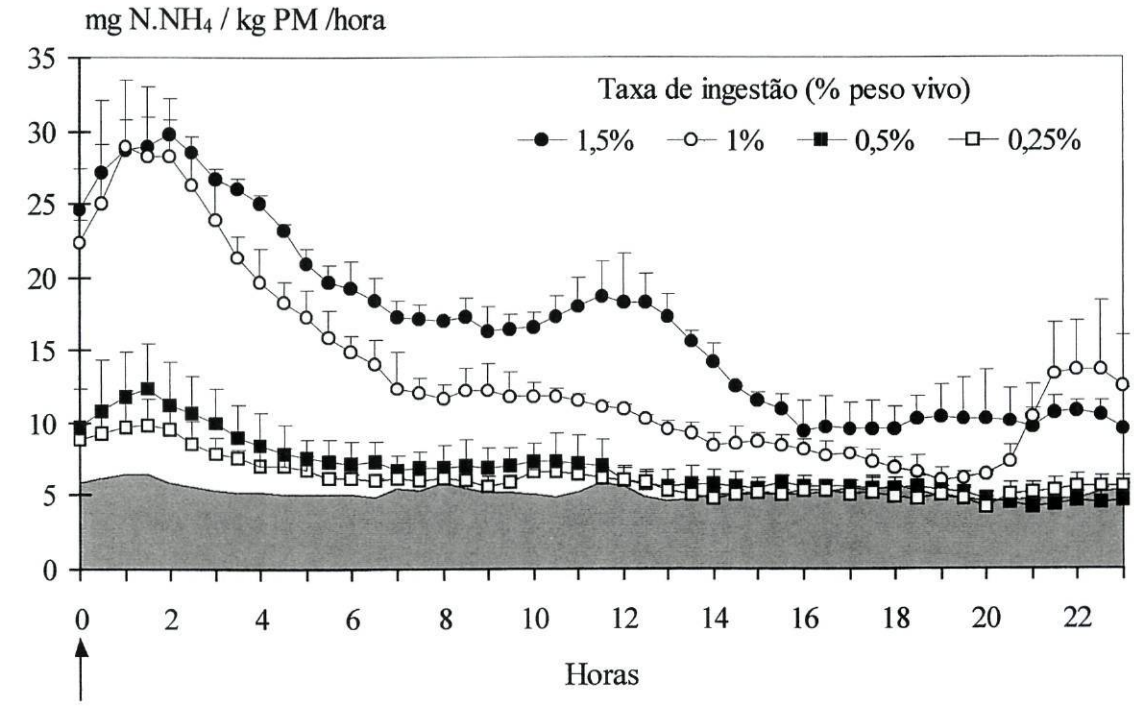
No final do ensaio de crescimento o teor em humidade, proteína e energia corporal não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, enquanto que o teor lipídico aumentou com o aumento da taxa de ingestão. Os índices hepatossomático e visceral aumentaram significativamente com o aumento da taxa de ingestão (tabela 3.5).

Tabela 3.5. Composição corporal dos robalos (% peso fresco) no início e no final do ensaio de crescimento[1].

		Taxa de ingestão (% PV*)				
	Inicial	0	0,25	0,5	1	1,5
Matéria seca	31,9	30,7 ±0,6	32,1 ±0,8	32,6 ±0,4	32,0 ±0,8	34,3 ±1,0
Proteína	17,6	18,0 ±0,1	19,4 ±0,8	19,8 ±0,3	18,7 ±0,2	18,6 ±0,0
Lípidos	10,3	$7,9^{a}$ ±0,7	$7,7^{a}$ ±0,2	$8,2^{a}$ ±0,0	$9,4^{ab}$ ±0,8	$11,4^{b}$ ±0,7
Cinzas	5,2	6,2 ±0,1	6,4 ±0,1	5,0 ±0,3	5,4 ±0,1	5,0 ±0,1
Energia (kJ/g)	7,0	6,6 ±0,4	7,0 ±0,4	7,1 ±0,1	7,4 ±0,4	8,2 ±0,1
Índice hepatossomático	1,5	$1,2^{a}$ ±0,1	$1,1^{a}$ ±0,1	$1,3^{a}$ ±0,5	$1,7^{b}$ ±0,0	$1,9^{b}$ ±0,2
Índice visceral	9,0	$5,5^{a}$ ±0,2	$5,1^{a}$ ±0,1	$5,3^{a}$ ±0,2	$6,9^{b}$ ±0,6	$8,8^{c}$ ±0,5

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*Peso vivo



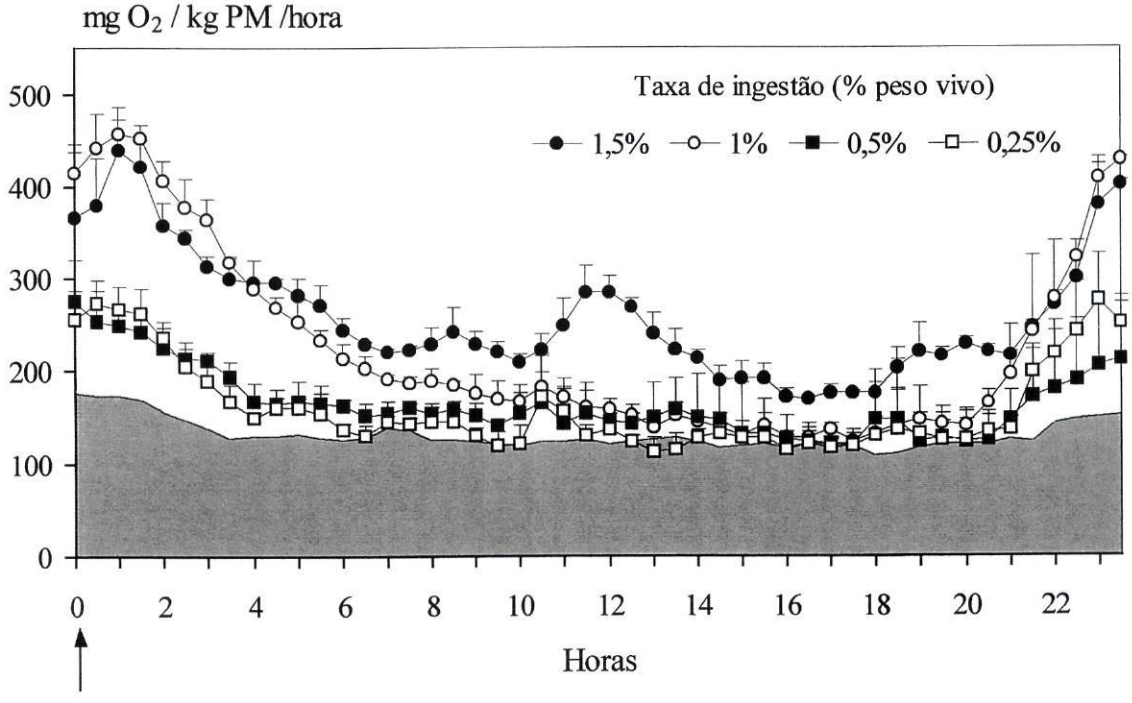


Figura 3.1. Perfil diário da excreção de amónia e do consumo de oxigénio pós-prandiais e no 9º dia de jejum (área a sombreado). Valores médios ± erro padrão. A seta indica a refeição.

3.3.2. Ensaio de metabolismo

Os perfis diários da excreção de amónia e do consumo de oxigénio dos robalos alimentados com as diferentes taxas de ingestão e em jejum, são apresentados na figura 3.1.

Relativamente à excreção de amónia, em todos os grupos registou-se um aumento da excreção imediatamente após a refeição, que atingiu um pico 1 a 2 horas depois e cuja amplitude foi tanto maior quanto maior a taxa de ingestão. De seguida, a excreção de amónia diminuiu gradualmente, tendo estabilizado 5 a 6 horas após a refeição nos grupos alimentados com 0,25 e 0,5% PV e cerca de 16 horas após a refeição nos restantes grupos. No grupo alimentado com 1% PV, a excreção de amónia começou de novo a aumentar após 20 horas da refeição.

Tabela 3.6. Excreção de amónia dos robalos alimentados e em jejum[1].

	Taxa de ingestão (% PV*)			
	0,25	0,5	1	1,5
Pós-prandial				
(mg $N.NH_4$/kg PM†/dia)	$149,3^{a}$ ±5,1	$157,9^{b}$ ±2,2	$323,5^{c}$ ±3,4	$404,2^{d}$ ±1,2
(% azoto digestível)	$85,4^{a}$ ±0,9	$48,7^{b}$ ±0,7	$47,1^{b}$ ±0,8	$40,3^{c}$ ±0,1
Jejum				
(mg $N.NH_4$/kg PM†/dia)				
4° dia	129,0	185,9	147,4	154,6
7° dia	127,2	152,5	154,6	151,8
9° dia	125,1	127,4	131,9	125,3

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*Peso vivo

†Peso médio

O consumo de oxigénio dos grupos alimentados com 1,5 e 1% PV aumentou imediatamente após a refeição, atingindo um máximo cerca de 1 hora após a ingestão de alimento. Em seguida, diminuiu e voltou a aumentar 21 horas depois da ingestão de alimento. Nos restantes grupos, o consumo de oxigénio diminuiu durante as primeiras 4 horas após a ingestão do alimento. Posteriormente, manteve-se relativamente estável até às 20 - 21 horas, altura em que começou a aumentar significativamente até um valor máximo, aquando da ingestão do alimento.

A excreção diária de amónia (mg/kg PM/dia) aumentou significativamente com a taxa de ingestão (tabela 3.6). No entanto, quando expressa em percentagem do azoto digestível, a excreção de amónia diminuiu significativamente com o aumento da taxa de ingestão. A excreção de azoto endógeno diminuiu com o número de dias de jejum e variou entre os grupos experimentais até ter estabilizado no 9° dia de jejum, num valor médio de 127,4 mg $N.NH_4$/ kg PM/ dia (tabela 3.6).

Em valores absolutos, o consumo de oxigénio pós-prandial (g/ kg PM/ dia) aumentou significativamente com a quantidade de alimento ingerido ($r^2 = 0,94$; $p < 0,05$; tabela 3.7). Para os peixes em jejum, o consumo de oxigénio (g/ kg PM/ dia) foi gradualmente diminuindo para um valor mínimo de 3,4 - 3,8 g O_2/ kg PM/ dia, entre o 7° e o 9° dia de jejum.

A produção de calor (% energia digestível) diminuiu significativamente com o aumento da taxa de ingestão. A proporção de energia proteica despendida no metabolismo energético pós-prandial, estimada com base nos valores do quociente de amónia, aumentou significativamente com o aumento da taxa de ingestão. No 9° dia de jejum, a contribuição média do catabolismo das proteínas corporais para o metabolismo energético total foi de 30% (tabela 3.7).

O balanço energético, estimado com base na excreção de amónia, no consumo de oxigénio e na digestibilidade aparente da dieta experimental, é apresentado na figura 3.2. A magnitude da energia retida e das perdas de energia fecal, urinária e branquial e de calor aumentam significativamente com o aumento da energia ingerida. O dispêndio de energia para a manutenção foi independente da quantidade de energia ingerida.

Tabela 3.7. Consumo de oxigénio, produção de calor e proporção de energia proteica despendida no metabolismo energético total[1].

	Taxa de ingestão (% PV*)			
	0,25	0,5	1	1,5
Consumo de oxigénio				
Pós-prandial				
(g O_2/kg PM†/dia)	$3,8^a$ ±0,1	$3,9^a$ ±0,1	$5,6^b$ ±0,1	$6,1^c$ ±0,1
Jejum				
(g O_2/kg PM†/dia)				
4° dia	3,5	4,4	4,6	4,8
7° dia	3,4	3,8	3,7	3,7
9° dia	3,4	3,6	3,7	3,8
Produção de calor				
(% energia digestível)	$103,3^d$ ±0,4	$55,2^c$ ±0,5	$39,9^b$ ±0,4	$29,4^a$ ±0,3
Quociente P/E (%)[2]				
Pós-prandial	$33,5^a$ ±1,5	$34,1^a$ ±2,5	$48,7^b$ ±0,7	$56,3^c$ ±0,5
Jejum (9° dia)	30,9	30,3	30,2	28,2

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[2]Proporção de energia proteica despendida no metabolismo energético total, estimada com base nos valores do quociente de amónia.

*Peso vivo

†Peso médio

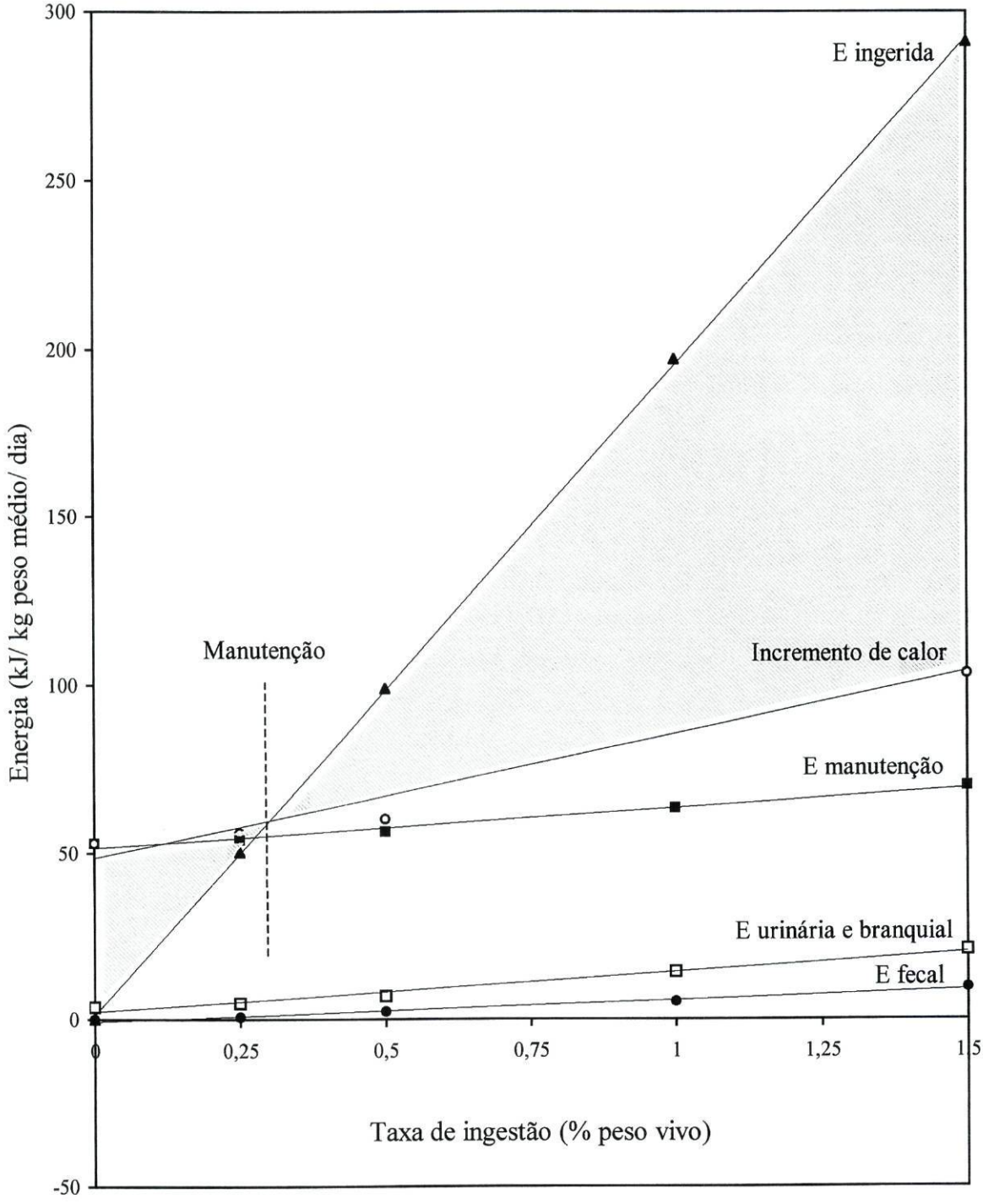


Figura 3.2. Balanço energético estimado com base nos dados da excreção de amónia, do consumo de oxigénio e da digestibilidade aparente da dieta experimental (E: energia).

3.3.3. Necessidades proteicas e energéticas de manutenção

Baseado nos dados de crescimento e na composição corporal dos robalos, as necessidades proteicas de manutenção foram estimadas em 1,26 g proteína digestível (PD)/kg PM/dia (figura 3.3; equação 1). Este valor é muito semelhante ao estimado com base no doseamento da excreção de amónia (1,19 g PD/kg PM/dia; equação 2), assumindo-se que a excreção de azoto amoniacal corresponde a 85% da excreção azotada total (Guerin-Ancey, 1976; Dosdat et al., 1996).

$$y = 0{,}54\,x - 0{,}68 \qquad (r^2 = 0{,}90;\ n = 10;\ p<0{,}01) \qquad \text{(eq. 1)}$$

$$y = 0{,}64\,x - 0{,}76 \qquad (r^2 = 0{,}99;\ n = 15;\ p<0{,}01) \qquad \text{(eq. 2)}$$

em que: y representa a retenção proteica diária (g/kg PM/dia) e x representa a ingestão de proteína digestível (g/kg PM/dia).

As necessidades energéticas de manutenção foram estimadas em 98,6 kJ energia digestível (ED)/kg PM/dia (figura 3.4; equação 3), com base nos dados de crescimento e composição corporal e, com base nos dados da calorimetria indirecta, foram estimadas em 57,2 kJ ED/kg PM/dia (equação 4).

$$y = 0{,}60\,x - 59{,}43 \qquad (r^2 = 0{,}98;\ n = 10;\ p<0{,}01) \qquad \text{(eq. 3)}$$

$$y = 0{,}83\,x - 47{,}48 \qquad (r^2 = 1{,}00;\ n = 15;\ p<0{,}01) \qquad \text{(eq. 4)}$$

em que: y representa a retenção energética diária (kJ/kg PM/dia) e x representa a ingestão de energia digestível (kJ/kg PM/dia).

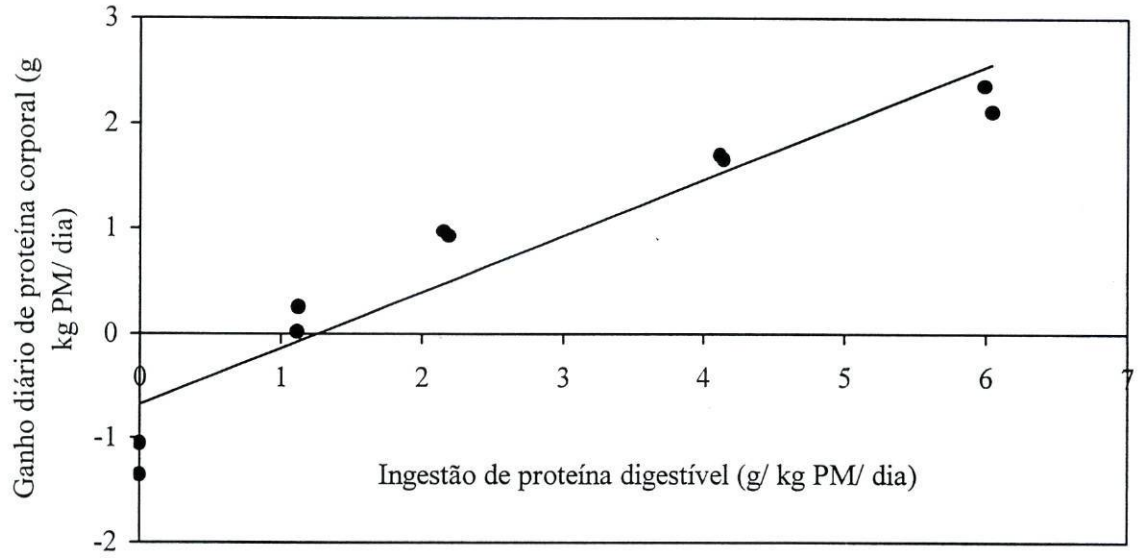


Figura 3.3. Relação entre a ingestão de proteína digestível e a retenção diária de proteína.

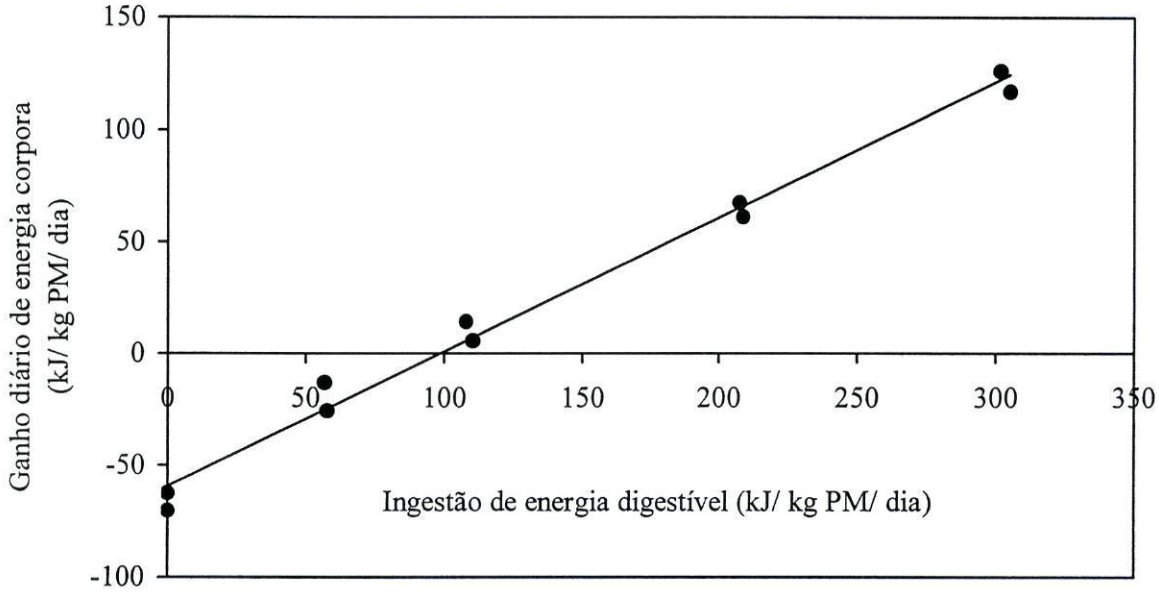


Figura 3.4. Relação entre a ingestão de energia digestível e a retenção diária de energia.

3.4. Discussão

No que diz respeito ao efeito benéfico do aumento da taxa de ingestão no crescimento, os resultados deste trabalho estão de acordo com os dados bibliográficos disponíveis para os juvenis de robalo (Hidalgo et al., 1987a; Tsevis et al., 1992; Lemarie et al., 1997).

O aumento da taxa de ingestão teve pouca influência na composição corporal dos robalos no final do ensaio de crescimento, o que está de acordo com o referido por Hidalgo et al. (1987a) e Langar (1992) para a mesma espécie. No entanto, trabalhos com outras espécies de teleósteos referem um aumento do conteúdo corporal em matéria seca e lípidos com o aumento da taxa de ingestão (Storebakken e Austreng, 1987 a, b; Azevedo et al., 1998). Os índices hepatossomático e visceral diminuíram significativamente com a diminuição da quantidade de alimento ingerido, resultados consistentes com os de Hidalgo et al. (1987a) e Echevarría et al. (1997) na mesma espécie, e os de Storebakken e Austreng (1987b), Storebakken et al. (1991) e Hung et al. (1993) noutras espécies. A diminuição destes índices deve-se, provavelmente, a uma mobilização das reservas energéticas (lípidos e glicogénio hepático) em resposta à restrição alimentar, uma vez que no robalo as reservas lipídicas localizam-se preferencialmente no fígado e no tecido perivisceral (McClelland et al., 1995). Hung et al. (1997) e Shimeno et al. (1997) estudaram o efeito da restrição alimentar na actividade de diversas enzimas e concluíram que a restrição alimentar estimulou a mobilização dos ácidos gordos e do glicogénio, localizados preferencialmente nas vísceras, não afectou a gluconeogénese ou a degradação de aminoácidos, mas diminuiu a glicólise e a lipogénese no fígado.

Nos robalos alimentados com 0,25 e 0,5% PV observou-se uma elevada mobilização dos lípidos corporais, o que é consistente com o baixo valor da contribuição da energia proteica no metabolismo energético total (P/E) nestes grupos. Uma tendência similar foi observada na truta arco-íris mantida em condições de manutenção (Kaushik e Gomes, 1988).

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da dieta experimental foram elevados, no entanto dentro dos valores esperados, atendendo aos elevados CDA dos ingredientes que a constituem (Alexis, 1997; Silva e Oliva-Teles, 1998). A diminuição dos CDA da proteína e da energia com o aumento da taxa de ingestão foi também observado nesta espécie por Langar

(1992), bem como noutras espécies de peixes (Pfeffer et al., 1991; Fernández et al., 1998; Ohta e Watanabe, 1998).

A excreção de amónia, em valores absolutos, está directamente relacionada com a quantidade de proteína ingerida. Contudo, em proporção do azoto digestível a excreção de amónia diminuiu com o aumento da taxa de ingestão. Resultados semelhantes foram também observados noutras espécies (Kaushik, 1980; Gershanovich e Pototskij, 1992; Chakraborty et al., 1995; Médale et al., 1995). Uma estabilização da excreção endógena de azoto amoniacal entre o sétimo e o nono dia de jejum é também consistente com o observado por outros autores (Savitz, 1971; Smith e Thorpe, 1976; Kaushik, 1980; Jayaram e Beamish, 1992).

O aumento significativo da produção de calor com o aumento da taxa de ingestão, observado neste ensaio, está de acordo com o postulado por Jobling (1981) de que a produção de calor e o crescimento são interactivos, isto é, níveis elevados de crescimento correspondem a perdas de calor elevadas. Na realidade, com o aumento da taxa de ingestão uma maior proporção de energia ingerida fica disponível para o crescimento (Hidalgo et al., 1987a; Chakraborty et al., 1995; Xie et al., 1997).

As necessidades proteicas de manutenção estimadas com base nos dados do ensaio de crescimento (1,26 g proteína digestível (PD)/kg PM/dia) ou com base no doseamento da excreção de amónia (1,19 g PD/kg PM/dia) coincidem relativamente bem. Estes valores são, no entanto, ligeiramente mais baixos do que outros valores disponíveis na literatura para o robalo e outras espécies, nomeadamente para o bacalhau (1,4 a 1,9g proteína bruta (PB)/kg PM/dia), a truta arco-íris (1,8g PB/kg PM/dia), a tilápia do Nilo (2 g PB/kg PM/dia), a dourada (0,9 g PB/$kg^{0,7}$ PM/dia) e o corvinão de pintas (*Sciaenops ocellatus*) (Ramnarine et al., 1987; Kaushik e Gomes, 1988; Houlihan et al., 1989; Kaushik et al., 1995b; Lupatsch et al., 1998; McGoogan e Gatling, 1998). Para robalos de 10 g, mantidos à temperatura de 20 °C, as necessidades proteicas de manutenção foram estimadas em 2,5 g PB/kg PM/dia (Alliot e Pastoureaud, 1984). As necessidades proteicas de manutenção, calculadas a partir dos dados experimentais apresentados por Hidalgo e Alliot (1988), com robalos de 36 g a 20 °C, e por Ballestrazzi et al. (1994), com robalos de 75 g a 22 °C, são de 2,8 g e de 2,0 g PB/kg PM/dia, respectivamente.

As necessidades proteicas não podem ser dissociadas do conteúdo em energia da dieta, o que, em parte, poderá explicar a heterogeneidade de resultados entre os diferentes trabalhos. O baixo valor das necessidades proteicas de manutenção estimadas no presente estudo podem estar relacionadas com uma menor contribuição da energia proteica para o metabolismo energético total (menos de 30%), em robalos alimentados com uma dieta de baixo teor proteico e de elevado teor energético. Para a truta arco-íris, Médale et al. (1994) também observou que a participação do catabolismo das proteínas no metabolismo energético total de manutenção, em peixes alimentados com uma dieta de elevada proteína/baixa energia, era superior a 40%, mas quando alimentados com uma dieta com baixa proteína/elevada energia a contribuição da energia proteica diminuía para menos de 30%, valor muito semelhante ao observado neste estudo.

Para os robalos em jejum, a perda de proteína corporal, estimada com base na análise da composição do peixe inteiro (1,1 g proteína/kg PM/dia) ou com base no doseamento da excreção endógena de azoto total (amónia + ureia; 0,92 g proteína/kg PM/dia), coincidem relativamente bem. Apesar da excreção endógena de azoto não ser reconhecida como uma boa estimativa das necessidades proteicas de manutenção (Cho e Kaushik, 1990), este valor é muito próximo ao calculado nos robalos alimentados. Isto indica que o azoto endógeno poderá fornecer uma estimativa fiável das necessidades proteicas de manutenção.

As necessidades energéticas de manutenção, estimadas com base nos dados de crescimento e da composição da carcaça (98,6 kJ energia digestível (ED)/kg PM/dia), foram superiores ao estimado com base nos dados da calorimetria indirecta (57,2 kJ ED/kg PM/dia). Porém, ambos os valores são da mesma ordem de grandeza dos estimados para o peixe gato (72 - 84 kJ energia bruta (EB)/kg PM/dia), a truta arco-íris (53 - 110 kJ EB/kg PM/dia), a tilápia do Nilo (70 kJ EB/kg PM/dia) e a dourada (67 kJ EB/kg PM/dia) (Gathin et al., 1986; Brown et al., 1990; Storebakken et al., 1991; Médale et al., 1994; Kaushik et al., 1995b; Ohta e Watanabe, 1996; Lupatsch et al., 1998).

As necessidades energéticas de manutenção são, por vezes, estimadas a partir do consumo de oxigénio dos peixes mantidos em jejum (Kaushik et al., 1991). Contudo, neste estudo e para os robalos em jejum, as perdas de energia corporal (66,3 kJ/kg PM/dia) e o consumo de oxigénio de rotina (47 - 52 kJ/kg PM/dia) foram consideravelmente mais baixos do que os

valores obtidos a partir dos dados do ensaio de crescimento, não sendo muito diferentes do estimado com base nos dados de calorimetria indirecta.

A ração diária de manutenção, estimada com base nos dados relativos à performance de crescimento e utilização do alimento, foi de 0,43 % PV, o que corresponde a 95,3 kJ ED/kg PM/dia e a 1,89 g PD/kg PM/dia. Apesar do valor obtido para a energia de manutenção ser idêntico ao estimado com base no ensaio de crescimento, o valor para a proteína de manutenção é bastante superior ao obtido com base nos outros métodos. Estes resultados confirmam que uma extrapolação das necessidades de manutenção a partir do crescimento nulo não é suficientemente preciso. Aplicando este método, Hidalgo et al. (1987a) estimou a ração diária de manutenção para robalo em 0,8% PV, a 20 °C e 0,5% PV a 15 °C, o que corresponde, respectivamente, a 4 g e 2,5 g proteína/kg PM/dia, valores muito superiores aos do presente trabalho.

Em condições de manutenção, a excreção azotada por unidade de energia despendida, estimada com base na análise da composição corporal, foi de 2,2 mg azoto digestível/kJ energia digestível, similar ao obtido em condições de jejum (2,5 mg azoto/kJ energia) e comparável ao observado noutras espécies (Cho e Kaushik, 1990; Kaushik e Médale, 1994). Pelo contrário, na truta arco-íris mantida em condições de manutenção, Kaushik e Gomes (1988) verificaram que esta relação era mais de duas vezes superior ao valor observado em condições de jejum.

Os resultados deste estudo indicam que ambos os critérios utilizados — estudos zootécnicos clássicos ou calorimetria indirecta — fornecem estimativas idênticas das necessidades proteicas de manutenção, mas apresentam pequenas diferenças nas estimativas das necessidades energéticas de manutenção.

4. Influência da Temperatura na Utilização da Proteína

4.1. Introdução

As dietas para peixes apresentam um conteúdo proteico mais elevado do que as dietas para animais terrestres produzidos para consumo humano (Bowen, 1987). As proteínas são um dos principais responsáveis pelo preço final das dietas para peixes, dado o seu alto custo económico. Para além disso, os peixes estão bem adaptados, do ponto de vista digestivo e metabólico, para catabolizar as proteínas, usando-as como fonte energética preferencial em detrimento dos lípidos e dos hidratos de carbono, o que contribui para o aumento das cargas azotadas dos efluentes piscícolas (Walton e Cowey, 1982; van den Thillard, 1986). Assim sendo, para a diminuição do custo das dietas e do impacto ambiental das explorações aquícolas, é necessário maximizar a utilização da proteína para fins de crescimento e minimizar a sua utilização para fins energéticos. Justifica-se plenamente o conhecimento adequado das necessidades proteicas e do efeito dos factores ambientais na utilização da proteína das espécies de peixe com interesse em aquacultura.

No que diz respeito às necessidades proteicas para o crescimento de juvenis de robalo, verifica-se uma elevada dispersão de resultados. Alliot et al. (1979 a) citam um melhor crescimento com uma dieta contendo 50% de proteína bruta (PB) do que com as dietas com 43 e 46% PB. Alliot et al. (1984) não obtiveram diferenças de crescimento com dietas contendo 45 ou 60% PB. Hidalgo e Alliot (1988) obtiveram melhores resultados de crescimento com dietas com 50% PB. Por sua vez, Harpaz (1991) refere melhores resultados com dietas com 58% PB do que com 48% e Pérez et al. (1997) obtiveram melhores taxas de crescimento com teores proteicos entre 45 e 50% da dieta. Mais recentemente, Dias et al. (1998) sugerem que as necessidades proteicas rondam apenas os 43% da dieta, desde que esta contenha, pelo menos, 21 kJ/g matéria seca.

O efeito da temperatura da água nas necessidades proteicas para crescimento permanece controverso (Cowey e Luquet, 1983; Tacon e Cowey, 1985). No robalo, o aumento da temperatura da água de 15 para 20 °C não afectou as necessidades proteicas (Hidalgo e Alliot, 1988). Contudo, nesse estudo, as temperaturas testadas situavam-se abaixo do intervalo óptimo para o crescimento desta espécie (23 - 25 °C; Aston, 1981), pelo que os robalos não expressaram o seu potencial máximo de crescimento, o que poderá ter influenciado os resultados.

A optimização do teor proteico das dietas para o robalo pressupõem que a proteína apresente um perfil de aminoácidos essenciais (AAE) equilibrado e adequado à espécie em questão. Para o robalo, o conhecimento das necessidades dos AAE limita-se à arginina, metionina, lisina, triptofano e treonina (Thebault et al., 1985; Hidalgo et al., 1987b; Tibaldi e Lanari, 1991; Tibaldi et al., 1993, 1994; Tibaldi e Tulli, 1999). O ajuste do perfil de AAE das dietas às necessidades de AAE do animal torna-se mais crítico quando se substitui a farinha de peixe por fontes proteicas alternativas, a qual pode provocar situações de desequilíbrios de aminoácidos (Kaushik, 1989a). Com efeito, a farinha de peixe constitui a melhor fonte proteica de dietas para peixes dada a sua composição e qualidade nutricional quase que ideal. No que se refere à qualidade da proteína da farinha de peixe, esta é muito elevada graças ao seu perfil de AAE e ao adequado equilíbrio aminoacídico (Tacon, 1993).

As necessidades quantitativas em AAE têm sido estimadas pelo método convencional de dose-resposta, baseado no crescimento ou na resposta metabólica dos peixes alimentados com dietas purificadas que incorporam níveis crescente do AAE a ser estudado (EIFAC, 1993). Comparativamente com as dietas práticas, este tipo de dietas conduzem geralmente a taxas de crescimento e eficiências de utilização da dieta muito reduzidas (Robinson et al., 1981; Walton et al., 1982; Chiu et al., 1984; Murai et al., 1984), o que pode levar a subestimar as necessidades de AAE para o crescimento máximo (Cho et al., 1985; Cowey, 1994). Deste modo, outras metodologias têm sido usadas, nomeadamente a variação pós-prandial da aminoacidémia do plasma, do fígado e do músculo (Kaushik, 1979) ou a oxidação de aminoácidos marcados radioactivamente (Walton et al., 1982, 1984, 1986; Were, 1989). Contudo, estes métodos são sempre subsidiários dos estudos de crescimento (Kim et al., 1992).

Alguns métodos empíricos foram também propostos, tais como a aproximação à proteína ideal, baseada no perfil de AAE do peixe inteiro (Rumsey e Ketola, 1975; Ketola, 1982; Ogata et al., 1983; Akiyama et al., 1997) e a determinação do acréscimo diário de AAE do peixe inteiro (Ogino, 1980). Apesar de questionáveis, estes métodos permitem uma primeira estimativa das necessidades dos dez AAE, utilizando dietas de elevado valor nutricional que conduzem a performances de crescimento óptimas para a espécie em questão.

Neste trabalho pretendeu-se estudar a utilização da proteína em juvenis de robalo alimentados com dietas de diferentes níveis proteicos (36, 42, 48 e 56%) a duas temperaturas, uma inferior (18 °C) e outra dentro (25 °C) do intervalo de temperaturas óptimas para o crescimento desta espécie. Para além disso, fez-se uma estimativa das necessidades de AAE segundo a metodologia de Ogino (1980).

4.2. Material e métodos

4.2.1. Dietas experimentais

Foram formuladas quatro dietas experimentais com um teor lipídico constante (12 % em base seca) e diferentes teores proteicos (36, 42, 48 e 56 % em base seca), cujas composições e análises químicas são apresentadas na tabela 4.1. As dietas foram preparadas conforme descrito na metodologia geral.

4.2.2. Ensaio de crescimento

O ensaio de crescimento foi realizado a duas temperaturas: 18 ± 0,5 °C e 25 ± 0,5 °C, durante 12 semanas. O sistema experimental era constituído por duas baterias de 12 tanques de 100 litros de capacidade, em circuito semi-fechado e termorregulado, conforme o descrito na secção 2.2.1. Em cada um dos tanques foi estabelecido um fluxo contínuo de água salgada filtrada (2,5 - 3 l/min). Durante o ensaio a salinidade média foi de 34 ± 1 ‰, em ambas as temperaturas, e o fotoperíodo foi o natural para os meses de Setembro a Dezembro.

Tabela 4.1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

	Dietas			
	36P	42P	48P	56P
Ingredientes (% matéria seca)				
Farinha de peixe[1]	45,0	53,4	61,8	72,9
CPSP G[2]	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de fígado de bacalhau	5,2	4,1	3,1	1,6
Dextrina amarela	36,3	29,0	21,6	12,0
Celulose	5,0	5,0	5,0	5,0
Complexo vitamínico[3]	0,5	0,5	0,5	0,5
Complexo mineral[4]	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de lenhina	1,0	1,0	1,0	1,0
Óxido de crómio	0,5	0,5	0,5	0,5
Composição química (% matéria seca)				
Matéria seca	89,2	90,5	90,5	89,9
Proteína	36,7	42,0	47,7	55,8
Lípidos	12,8	12,9	12,9	12,6
Cinzas	8,3	9,3	10,4	12,0
Óxido de crómio	0,45	0,44	0,43	0,42
Energia (kJ/g matéria seca)	19,1	19,2	19,7	19,7
PD/ED (mg/kJ)[5]	19,8	22,7	25,0	29,4

[1]Farinha de peixe da Noruega; Proteína: 71,6%; Lípidos: 12,8 %.

[2]Concentrado de proteína solúvel de peixe; Proteína: 75%; Lípidos: 21%; Sopropêche, França.

[3 e 4]Composição indicada na tabela 2.1 e 2.2.

[5]Razão entre proteína digestível/energia digestível, calculada de acordo com os coeficientes de digestibilidade da proteína e energia apresentados na tabela 4.3.

Quatrocentos robalos foram alojados em cada um dos sistemas experimentais e adaptados aos tanques e à temperatura da água durante 15 dias. Posteriormente, em cada sistema, os robalos foram distribuídos aleatoriamente por 12 grupos de 25 peixes com peso médio individual de 5,6 g. Cada uma das dietas experimentais foi distribuída a triplicados destes grupos. O alimento foi fornecido manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia (9:00 e 17:00 h). Os peixes foram pesados em grupo no início, cada duas semanas e no final do ensaio de crescimento, após um dia de jejum.

Para a análise da composição corporal foram retirados aleatoriamente 12 peixes do lote de peixes inicial e 6 peixes de cada grupo experimental, no final do ensaio. No momento da amostragem, o peso individual de cada peixe, do fígado e das vísceras foi quantificado para posterior cálculo dos índices hepatossomático e visceral.

4.2.3. Ensaio de digestibilidade

Este ensaio decorreu em duas séries, a primeira a 25 °C e a segunda a 18 °C. O sistema experimental era constituído por 12 tanques de digestibilidade, cuja estrutura foi descrita na secção 2.3.1.

Quatrocentos peixes foram distribuídos pelos tanques, onde permaneceram durante 15 dias para adaptação às novas condições experimentais. Findo este período, constituíram-se 12 grupos de 30 peixes com peso médio individual de 12,9 g. Triplicados destes grupos foram alimentados à mão, até à saciedade visual, com uma das quatro dietas experimentais, duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h). Após um período de 10 dias de adaptação às dietas experimentais, as fezes foram recolhidas diariamente, durante 15 dias consecutivos.

Posteriormente, a temperatura da água foi gradualmente reduzida até atingir os 18 °C (1 a 2 graus por dia). Os peixes foram, então, adaptados à nova temperatura da água durante 5 dias. Em seguida, constituíram-se 12 novos grupos de 30 peixes com peso médio individual de 18,1 g. Cada uma das dietas experimentais foi fornecida a 3 grupos, durante 25 dias e nos últimos 15 dias as fezes foram recolhidas diariamente. A alimentação e recolha das fezes foram realizadas do mesmo modo que na série anterior.

4.2.4. Ensaio de metabolismo

O ensaio realizou-se no mesmo sistema do ensaio de digestibilidade, em 5 tanques conforme descrito na secção 2.4.1. O ensaio foi efectuado em duas séries, primeiro a 18 °C e depois a 25 °C.

No final do ensaio de digestibilidade constituíram-se 4 grupos de 20 peixes que foram distribuídos aleatoriamente por cada um dos tanques. Estes foram cobertos com uma tampa flutuante em acrílico transparente, de modo a impedir a troca gasosa entre o ar e a água, e a aerificação foi suprimida. O fotoperíodo foi ajustado a 24 horas de luz.

Cada um dos grupos experimentais foi alimentado manualmente com uma das 4 dietas experimentais, até à saciedade visual, duas vezes ao dia (11:00 e 17:00 h), durante 2 semanas. Ao 11° dia, os peixes foram pesados em grupo (peso médio individual de 37,5 g). Nesse dia foram alimentados apenas à tarde e, a partir do dia seguinte, procedeu-se ao doseamento do consumo de oxigénio e da excreção de amónia durante 3 ciclos diários consecutivos. De seguida, os peixes foram privados de alimento. Ao 8° dia de jejum, os peixes foram pesados em grupo e, no dia seguinte, doseou-se o consumo de oxigénio e a excreção de amónia em contínuo, durante um ciclo diário.

Posteriormente, a temperatura da água foi gradualmente aumentada até aos 25 °C (1 a 2 graus por dia) e, de seguida, os peixes foram redistribuídos de modo a constituírem-se 4 grupos de 18 peixes, que foram alimentados com uma das dietas experimentais durante 2 semanas. O alimento foi fornecido manualmente, duas vezes por dia (11:00 e 17:00), até à saciedade visual. No dia que antecedeu o início dos doseamentos, os peixes foram pesados em grupo (peso médio individual de 42 g), tendo nesse dia recebido apenas a refeição da tarde. O doseamento do consumo de oxigénio e da excreção de amónia pós-prandiais e em jejum foram realizados seguindo o mesmo protocolo experimental descrito atrás.

4.2.5. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais

O doseamento dos aminoácidos foi realizado no laboratório de nutrição de peixes do Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.), em St. Pée-sur-Nivelle, França.

As amostras dos peixes inteiros, após terem sido desengorduradas, foram hidrolisadas com ácido clorídrico (6N) a 110 °C, durante 24 horas. A separação cromatográfica e a análise dos aminoácidos (HPLC - Varinan modelo 5000 – coluna de fase inversa Lichrocart, Merck, ref. 16951) foi realizada, após derivação dos aminoácidos com ortoftaldeído, de acordo com as técnicas "modificadas" de Gardner e Miller (1980) e Rajendra (1987). Este procedimento não permitiu o doseamento do triptofano.

As necessidades quantitativas de AAE foram estimadas com base no ganho diário em AAE (mg/100g peso vivo/dia) dos robalos alimentados com as quatro dietas experimentais do seguinte modo:

$$\text{Ganho diário AAE (mg / 100g peso vivo / dia)} = \frac{(PF \times AAf) - (PI \times AAi)}{(PM \times n^{\circ}\ \text{dias})} \times 100$$

em que:

PI, PF e PM são, respectivamente, peso inicial, peso final e peso médio e

AAi e AAf são, respectivamente, composição corporal inicial e final do aminoácido em questão.

As necessidades de AAE, expressas em percentagem da proteína digestível (PD), foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Necessidade AAE (\% PD)} = \frac{\text{ganho diário AAE}}{\text{proteína digestível}} \times 100$$

4.3. Resultados

4.3.1. Ensaio de crescimento e de digestibilidade

O crescimento, a ingestão voluntária de alimento, a eficiência de conversão alimentar e o coeficiente de utilização proteica foram consideravelmente melhores nos peixes mantidos à temperatura mais elevada (figura 4.1; tabela 4.2). A ambas as temperaturas, a taxa de crescimento específico foi significativamente maior nos peixes alimentados com as dietas 48P e 56P do que com as restantes dietas. A ingestão voluntária de alimento (g/kg PM/dia) diminuiu linearmente com o aumento do teor proteico das dietas (25° C: $r = 0,95$; $n = 12$; $p<0,01$; 18° C: $r = 0,82$; $n =12$; $p<0,01$).

A unidade térmica de crescimento foi significativamente maior à temperatura mais elevada e, em ambas as temperatura, foi significativamente maior com as dietas 48P e 56P do que com as restantes dietas (tabela 4.2).

Independentemente da temperatura da água, a eficiência de conversão alimentar aumentou significativamente com o aumento do teor proteico das dietas. A 25 °C a eficiência de conversão alimentar foi significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta 56P do que nos alimentados com as restantes dietas, enquanto que a 18 °C não se verificaram diferenças significativas entre as dietas 48P e 56P. A 25 °C o coeficiente de eficácia proteica diminuiu significativamente com o aumento do teor proteico da dieta de 36 para 42%, não sendo estatisticamente diferente entre as restantes dietas, enquanto que a 18 °C foi significativamente menor na dieta com 56% de proteína.

Os dados referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas experimentais são apresentados na tabela 4.3. Os CDA da matéria seca, da proteína e da energia foram significativamente maiores a 25 do que a 18 °C. Os CDA da proteína e da energia foram, de modo geral, elevados para cada temperatura, não tendo sido influenciados pelo teor proteico das dietas, com excepção do CDA da proteína da dieta 36P a 18 °C que foi significativamente menor do que o das restantes dietas.

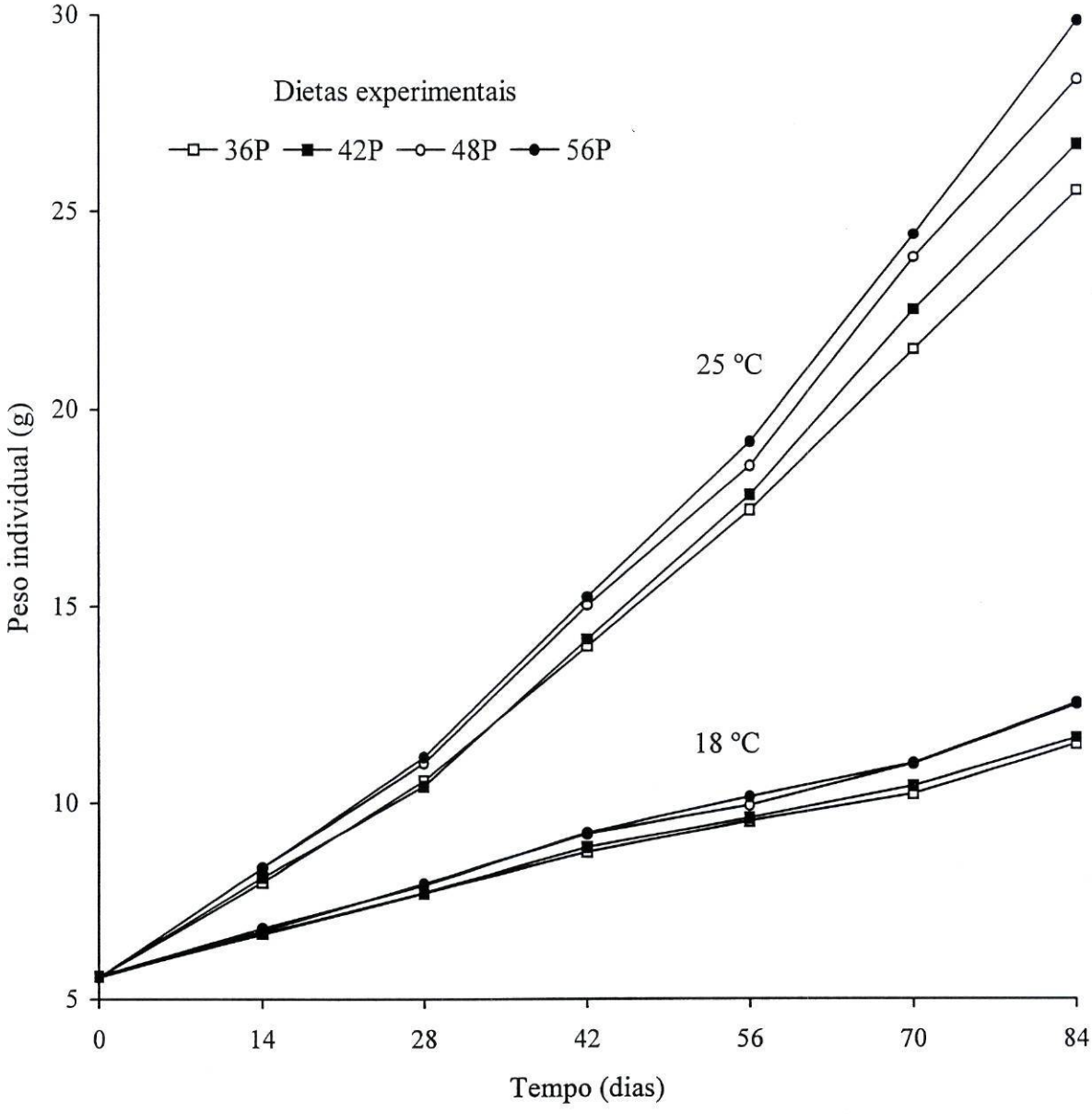


Figura 4.1. Crescimento médio dos robalos alimentados com as diferentes dietas experimentais a 18 e a 25 °C.

Tabela 4.2. Crescimento e eficiência de utilização do alimento nos robalos alimentados com as dietas experimentais[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Peso médio inicial (g)	5,6	5,6	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6
Peso médio final (g)	$25,5^{a}$ ±0,3	$26,7^{a}$ ±0,4	$28,4^{b}$ ±0,4	$29,9^{c}$ ±0,5	$11,5^{a}$ ±0,3	$11,7^{a}$ ±0,2	$12,5^{b}$ ±0,1	$12,6^{b}$ ±0,1
Ganho de peso (g/kg PM†/dia)	$15,3^{a}$ ±0,1	$15,6^{a}$ ±0,1	$16,0^{b}$ ±0,1	$16,4^{b}$ ±0,1	$8,2^{a}$ ±0,2	$8,4^{a}$ ±0,2	$9,1^{b}$ ±0,1	$9,2^{b}$ ±0,1
Taxa de crescimento específico	$1,82^{a}$ ±0,01	$1,87^{a}$ ±0,02	$1,94^{b}$ ±0,02	$2,01^{b}$ ±0,02	$0,86^{a}$ ±0,03	$0,88^{a}$ ±0,02	$0,96^{b}$ ±0,01	$0,96^{b}$ ±0,01
Alimento ingerido (g/kg PM†/dia)	$24,1^{c}$ ±0,6	$23,4^{c}$ ±0,2	$21,2^{b}$ ±0,4	$17,5^{a}$ ±0,3	$15,1^{c}$ ±0,3	$14,4^{bc}$ ±0,3	$13,9^{ab}$ ±0,3	$13,3^{a}$ ±0,3
Eficiência de conversão alimentar	$0,64^{a}$ ±0,02	$0,67^{a}$ ±0,01	$0,76^{b}$ ±0,02	$0,94^{c}$ ±0,01	$0,55^{a}$ ±0,02	$0,59^{a}$ ±0,01	$0,66^{b}$ ±0,01	$0,69^{b}$ ±0,02
Coeficiente de eficácia proteica	$1,73^{b}$ ±0,04	$1,58^{a}$ ±0,02	$1,58^{a}$ ±0,04	$1,68^{ab}$ ±0,02	$1,49^{b}$ ±0,05	$1,40^{b}$ ±0,02	$1,38^{b}$ ±0,03	$1,23^{a}$ ±0,03
Unidade térmica de crescimento	$5,5E\text{-}4^{a}$	$5,7E\text{-}4^{a}$	$6,0E\text{-}4^{b}$	$6,2E\text{-}4^{b}$	$3,1E\text{-}4^{a}$	$3,2E\text{-}4^{a}$	$3,6E\text{-}4^{b}$	$3,6E\text{-}4^{b}$

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Taxa de crescimento específico	***	***	ns
Alimento ingerido (g/kg PM†/dia)	***	***	***
Eficiência de conversão alimentar	***	***	***
Coeficiente de eficácia proteica	***	**	**
Unidade térmica de crescimento	***	***	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.

†Peso médio.

Tabela 4.3. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Matéria seca	83,6 ±0,1	82,0 ±0,9	81,3 ±0,4	82,3 ±0,4	79,2 ±0,3	79,3 ±1,2	77,3 ±0,2	78,3 ±0,1
Proteína	93,9 ±0,1	93,5 ±0,4	94,1 ±0,1	94,5 ±0,1	91,6[a] ±0,3	92,5[b] ±0,3	92,6[b] ±0,1	93,2[b] ±0,1
Energia	91,0 ±0,3	90,1 ±0,9	91,0 ±0,3	90,9 ±0,4	88,9 ±0,2	89,5 ±0,4	89,7 ±0,2	89,9 ±0,2

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Matéria seca	***	*	ns
Proteína	***	**	ns
Energia	***	ns	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.

No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, para cada temperaturas (tabela 4.4). O conteúdo em matéria seca, proteína e cinzas dos robalos mantidos a 18 °C foi significativamente maior do que a 25 °C. O índice hepatossomático variou de modo inverso ao do teor proteico das dietas a 25 °C, enquanto que a 18 °C não foi significativamente afectado pela composição das dietas. O índice visceral foi significativamente maior a 18 do que a 25 °C, não tendo diferido significativamente entre os grupos experimentais, a ambas as temperaturas (tabela 4.4).

A eficiência de utilização do azoto e da energia das dietas experimentais é apresentada na tabela 4.5. A ingestão de azoto (g/kg PM/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C. A 25 °C a ingestão de azoto foi significativamente menor com a dieta 36P do que com as restantes dietas, enquanto que a 18 °C aumentou significativamente com o aumento do teor proteico das dietas. A 18 °C a retenção diária de azoto (g/kg PM/dia) não foi influenciada pela composição das dietas, enquanto que a 25 °C a dieta 56P promoveu uma retenção azotada significativamente maior do que as dietas 36P e 42P. Quando expressa em percentagem do azoto ingerido, a retenção azotada foi significativamente maior a 18 do que a 25 °C. A 25 °C não foram registadas diferenças significativas na retenção azotada (% azoto ingerido) entre os grupos experimentais, enquanto que a 18 °C a retenção aumentou significativamente com a diminuição do teor proteico das dietas.

A ingestão de energia também foi maior a 25 do que a 18 °C (tabela 4.5). A 25 °C a ingestão de energia aumentou significativamente com a diminuição do teor proteico das dietas, enquanto que a 18 °C, apesar de se observar a mesma tendência, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. A ambas as temperatura, a retenção diária de energia (kJ/kg PM/dia) não foi influenciada pela composição das dietas experimentais. Quando expressa em percentagem da energia ingerida, a retenção energética aumentou significativamente com o aumento do teor proteico, mas este aumento só foi estatisticamente significativo a 25 °C (tabela 4.5).

A contribuição da energia proteica no metabolismo energético total (P/E) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C e, às duas temperaturas, verificou-se uma redução significativa do P/E com a diminuição do teor proteico da dieta (tabela 4.5).

Tabela 4.4. Composição corporal dos robalos (% matéria fresca) no início e no final do ensaio de crescimento[1].

Temperatura		25 °C				18 °C			
Dietas	Inicial	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Matéria seca	27,1 ±0,1	34,9 ±0,2	34,7 ±0,2	34,9 ±0,1	35,0 ±0,1	38,5 ±0,8	38,6 ±0,2	37,3 ±0,3	37,0 ±0,2
Proteína	15,2 ±0,1	17,3 ±0,2	17,1 ±0,1	17,1 ±0,1	17,2 ±0,1	20,2 ±0,2	20,8 ±0,1	20,0 ±0,2	20,1 ±0,2
Lípidos	7,3 ±0,1	14,0 ±0,3	14,1 ±0,1	14,0 ±0,2	13,9 ±0,4	13,7 ±0,4	14,1 ±0,2	14,2 ±0,8	13,6 ±0,1
Cinzas	4,8 ±0,1	4,4 ±0,1	4,3 ±0,1	4,2 ±0,1	4,2 ±0,1	$5,1^{b}$ ±0,1	$5,1^{b}$ ±0,1	$4,5^{a}$ ±0,1	$4,5^{a}$ ±0,1
Energia (kJ/g)	6,0 ±0,1	9,0 ±0,1	9,0 ±0,1	9,0 ±0,1	8,9 ±0,1	9,1 ±0,3	9,2 ±0,1	8,8 ±0,5	8,9 ±0,0
Índice hepatossomático	1,8 ±0,1	$3,3^{c}$ ±0,1	$2,8^{b}$ ±0,1	$2,8^{b}$ ±0,1	$2,5^{a}$ ±0,1	2,9 ±0,1	2,7 ±0,1	3,2 ±0,2	2,9 ±0,1
Índice visceral	7,7 ±0,8	12,3 ±0,4	11,9 ±0,1	11,9 ±0,1	11,2 ±0,4	12,9 ±0,2	12,2 ±0,3	13,4 ±0,5	12,4 ±0,2

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Matéria seca	***	ns	ns
Proteína	***	ns	ns
Lípidos	ns	ns	ns
Cinzas	***	*	ns
Energia (kJ/g)	ns	ns	ns
Índice hepatossomático	ns	*	ns
Índice visceral	***	*	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).
*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.

Tabela 4.5. Eficiência de utilização do azoto e da energia das dietas experimentais[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Azoto								
Ingestão (g/kg PM†/dia)	1,41[a] ±0,04	1,58[b] ±0,01	1,62[b] ±0,03	1,56[b] ±0,03	0,88[a] ±0,02	0,97[b] ±0,02	1,05[c] ±0,02	1,19[d] ±0,02
Retenção (g/kg PM†/dia)	0,44[a] ±0,01	0,44[a] ±0,01	0,45[ab] ±0,01	0,46[b] ±0,00	0,33 ±0,01	0,35 ±0,01	0,35 ±0,01	0,35 ±0,00
Retenção (% azoto ingerido)	30,9 ±0,9	27,9 ±0,6	27,9 ±0,8	29,6 ±0,4	37,4[c] ±1,4	36,1[c] ±0,5	32,9[b] ±0,3	29,7[a] ±0,6
Energia								
Ingestão (kJ/kg PM†/dia)	553,0[c] ±14,5	540,0[c] ±4,8	502,0[b] ±9,3	413,7[a] ±7,9	345,8 ±6,0	331,5 ±7,6	327,9 ±7,7	315,6 ±6,8
Retenção (kJ/kg PM†/dia)	181,2 ±3,3	182,5 ±2,3	186,3 ±2,3	188,2 ±3,5	119,1 ±7,5	121,7 ±1,4	121,8 ±9,7	122,1 ±0,3
Retenção (% energia ingerida)	32,8[a] ±1,2	33,8[a] ±0,7	37,1[b] ±1,1	45,5[c] ±0,8	34,4 ±1,9	36,7 ±0,6	37,1 ±2,8	38,7 ±0,9
P/E (%)[2]	44,4[a] ±0,4	55,8[b] ±0,9	66,3[c] ±1,0	94,6[d] ±1,7	40,6[a] ±0,6	50,7[b] ±0,7	61,0[c] ±3,4	80,0[d] ±1,0

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Retenção azotada (g/kg PM†/dia)	***	*	ns
Retenção azotada (% azoto ingerido)	***	***	***
Retenção energética (g/kg PM†/dia)	***	ns	ns
Retenção energética (% energia ingerida)	ns	***	*
P/E (%)[2]	***	***	*

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).
[2]Proporção da energia proteica despendida no metabolismo energético total, estimada com base na análise da composição da carcaça.
*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.
†Peso médio.

4.3.2. Ensaio de metabolismo

A excreção de amónia ao longo do dia apresentou sempre valores consideravelmente mais elevados a 25 do que a 18 °C. O perfil de excreção de amónia pós-prandial foi semelhante em todos grupos experimentais, independentemente da temperatura da água (figura 4.2). A excreção de amónia aumentou consideravelmente após a primeira refeição, atingindo um pico 2 a 3 horas após a ingestão do alimento; entre as 3 e as 6 horas diminuiu ligeiramente e aumentou de novo após a segunda refeição, atingido um segundo pico, de maior amplitude que o primeiro, 8 a 9 horas após a primeira refeição. Em seguida, a excreção de amónia diminuiu gradualmente, tendo estabilizado às 19-22 horas após a primeira refeição a 25 °C e às 16-17 horas após a primeira refeição a 18 °C. A excreção de amónia dos robalos em jejum não apresentou grandes oscilações ao longo do dia, a ambas as temperaturas.

Em valores absolutos, a excreção de amónia pós-prandial foi significativamente maior à temperatura mais elevada, porém, quando expressa em percentagem do azoto ingerido, não foram observadas diferenças significativas entre as duas temperaturas (tabela 4.6).

A 25 °C a excreção de amónia variou entre 469 e 734 mg/kg PM/dia nos diferentes grupos experimentais mas, devido à grande variabilidade intra-grupos, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A 18 °C a excreção azotada foi significativamente maior com a dieta 56P do que com as restantes dietas, entre as quais não foram registadas diferenças significativas (tabela 4.6). Expressa em percentagem do azoto ingerido, a excreção de amónia não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, nas duas temperaturas.

Nos robalos mantidos em jejum, a excreção de amónia foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C. Para ambas as temperaturas, a excreção endógena de amónia não variou de forma assinalável entre os grupos experimentais (tabela 4.6).

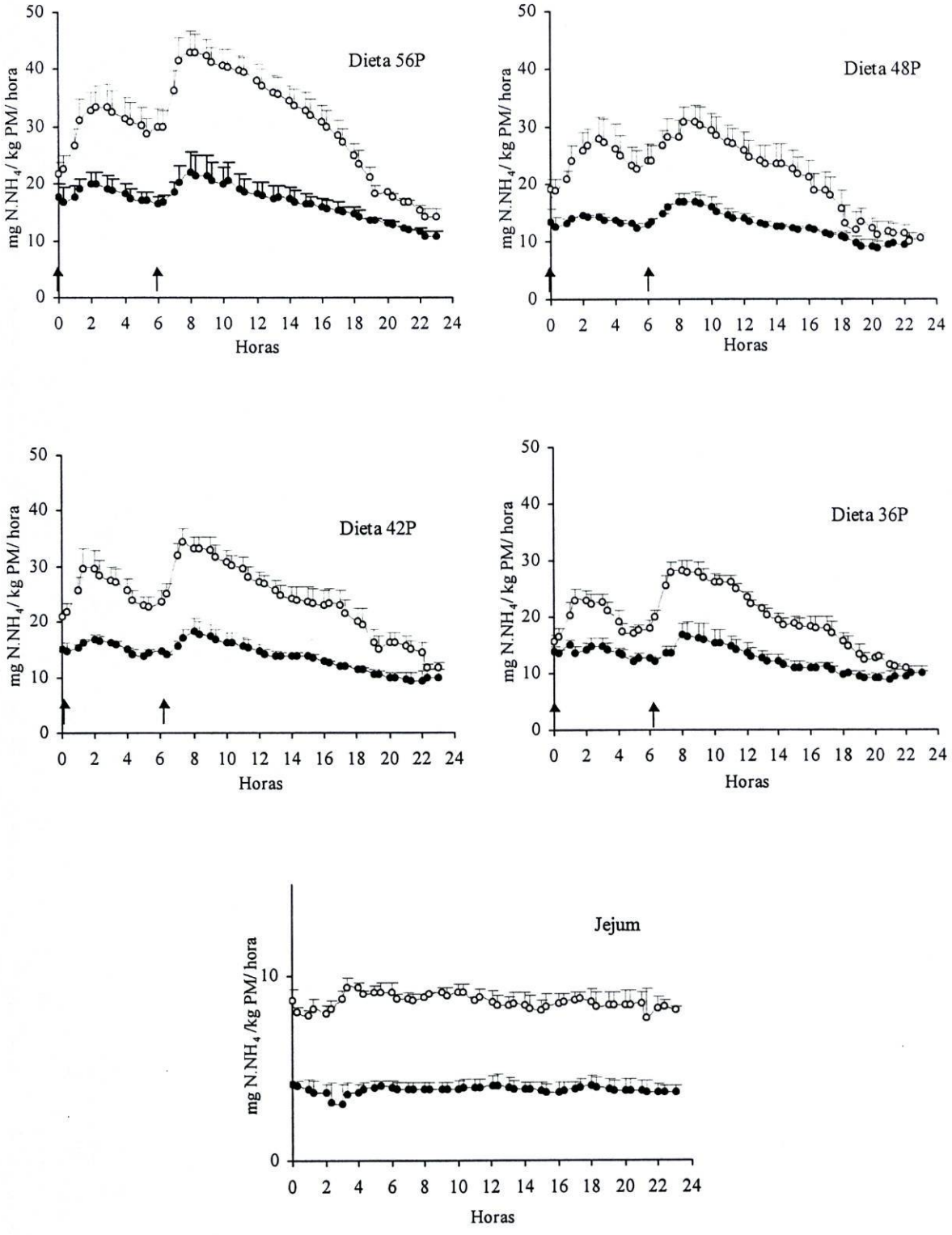


Figura 4.2. Evolução diária da excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum, a 25 °C (círculos vazios) e a 18 °C (círculos cheios). As setas indicam as horas das refeições. Valores médios ± erro padrão.

Tabela 4.6. Excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Pós-prandial								
(mg $N.NH_4$ / kg PM†/ dia)	468,9 ±34,1	584,4 ±59,5	527,8 ±87,8	733,8 ±77,0	297,5[a] ±21,0	332,8[a] ±8,6	310,8[a] ±9,1	408,7[b] ±38,5
(% azoto ingerido)	30,4 ±4,7	37,8 ±8,6	43,1 ±12,6	41,1 ±8,8	39,9 ±1,9	43,6 ±0,9	42,4 ±0,6	40,1 ±3,6
Jejum								
(mg $N.NH_4$ / kg PM†/ dia)	199,6	216,4	205,3	201,9	80,5	97,2	99,8	93,9

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Excreção de amónia pós-prandial (mg/kg PM/dia)	***	*	ns
Excreção de amónia pós-prandial (% azoto ingerido)	ns	ns	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.

†Peso médio.

Tal como a excreção de amónia, o perfil diário do consumo de oxigénio pós-prandial evoluiu de modo idêntico nos quatro grupos experimentais, às duas temperaturas (figura 4.3). O consumo de oxigénio atingiu um pico logo após a administração do alimento. Começou então a diminuir ligeiramente até à altura da segunda refeição, momento em que aumentou de novo para um segundo pico, de maior amplitude que o primeiro. De seguida, o consumo de oxigénio começou novamente a diminuir para os valores de base, 15 - 16 horas e 12 - 14 após a primeira refeição, respectivamente, a 25 e a 18 °C. Nos robalos mantidos a 18 °C, os picos de consumo de oxigénio são mais ténues do que a 25 °C. Nas duas temperaturas, o consumo de oxigénio dos robalos em jejum não variou de forma significativa ao longo do dia.

Em valores absolutos, o consumo de oxigénio pós-prandial (g/kg PM/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C (tabela 4.7). Nos robalos mantidos a 25 °C, o consumo de oxigénio dos robalos alimentados com a dieta 36P foi consideravelmente menor do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. Nos robalos mantidos a 18 °C, o consumo de oxigénio foi significativamente menor com a dieta 36P do que com as dietas 42P e 56P.

A ambas as temperaturas, o consumo de oxigénio dos robalos mantidos em jejum não variou grandemente entre os grupos experimentais, porém, foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C (tabela 4.7).

O incremento calórico, expresso em kJ/kg PM/dia, foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C (tabela 4.7). A 25 °C o incremento calórico, por unidade de azoto ingerido, não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, enquanto que a 18 °C foi significativamente menor com a dieta 56P do que com as restantes dietas.

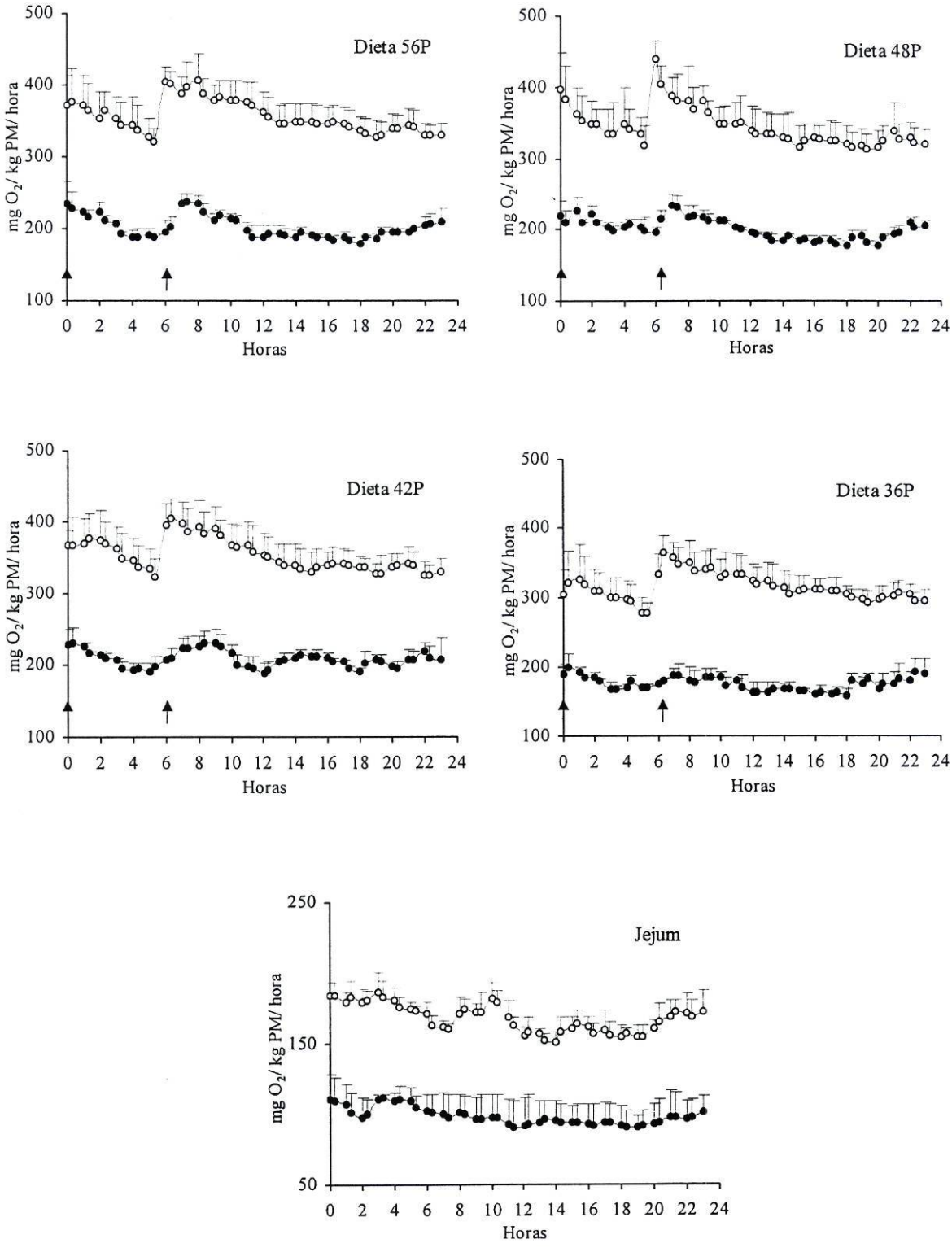


Figura 4.3. Evolução diária do consumo de oxigénio dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum, a 25 °C (círculos vazios) e a 18 °C (círculos cheios). As setas indicam as horas das refeições. Valores médios ± erro padrão.

Tabela 4.7. Consumo de oxigénio e incremento calórico dos robalos alimentados com as dieta experimentais[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Consumo de oxigénio (g O_2/kg PM†/dia)								
Pós-prandial	7,5 ±0,5	8,5 ±0,6	8,3 ±0,7	8,6 ±0,6	4,2^{a} ±0,1	5,0^{b} ±0,1	4,6^{ab} ±0,1	4,8^{b} ±0,1
Jejum	3,8	4,0	4,1	4,1	2,0	2,3	2,4	2,6
Incremento calórico								
(kJ/kg PM†/dia)	50,5 ±7,4	60,2 ±8,1	60,0 ±9,3	60,4 ±8,2	30,6 ±1,1	36,9 ±1,1	30,5 ±2,3	31,2 ±1,3
(kJ/g azoto ingerido)	32,9 ±5,8	38,4 ±7,1	45,7 ±9,4	32,1 ±6,5	47,5^{b} ±2,9	55,8^{b} ±2,0	49,2^{b} ±1,7	34,5^{a} ±0,9

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Consumo de oxigénio pós-prandial (g O_2/kg PM/dia)	***	ns	ns
Incremento calórico (kJ/kg PM†/dia)	***	ns	ns
Incremento calórico (kJ/g azoto ingerido)	*	ns	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.

†Peso médio.

Com base nos resultados do ensaio de metabolismo e na digestibilidade aparente das dietas estimaram-se os balanços azotado (tabela 4.8) e energético (tabela 4.9). A ingestão diária de azoto (g/kg PM/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C. A 25 °C a ingestão de azoto não foi influenciada pelo teor proteico das dietas, enquanto que a 18 °C a ingestão azotada foi significativamente maior com a dieta 56P do que com as restantes dietas. Independentemente da temperatura da água, tanto a excreção de azoto urinário e branquial (% azoto ingerido) como o azoto retido (% azoto ingerido) não foram significativamente afectados pelo teor proteico das dietas.

Tal como a ingestão azotada, a ingestão de energia (kJ/kg PM/dia) foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C (tabela 4.9). A ingestão de energia não foi significativamente influenciada pelo teor proteico das dietas a 25 °C, enquanto que a 18 °C foi menor com a dieta 48P do que com as restantes dietas. O efeito da temperatura da água na percentagem de energia ingerida disponível para ser retida não foi significativo. A 25 °C a excreção de energia urinária e branquial, a produção de calor e a energia retida, em percentagem da energia ingerida, não foram significativamente afectados pelo teor proteico das dietas. Contudo, a 18 °C as perdas de energia urinária e branquial e a produção total de calor, em percentagem da energia ingerida, foram significativamente menores com a dieta 36P do que as restantes dietas, pelo que a dieta 36P promoveu uma retenção energética (% energia ingerida) significativamente maior do que a das restantes dietas.

Tabela 4.8. Balanços azotados dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base nos dados do ensaio de metabolismo e na digestibilidade aparente das dietas experimentais)[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Azoto ingerido (g/kg PM†/dia)	1,8 ±0,2	1,9 ±0,3	1,5 ±0,3	2,1 ±0,4	0,9[a] ±0,0	0,9[a] ±0,0	0,8[a] ±0,0	1,2[b] ±0,0
Azoto fecal (% NI)	4,7 ±0,1	4,9 ±0,0	4,5 ±0,1	4,6 ±0,1	8,4[b] ±0,4	7,5[a] ±0,3	7,4[a] ±0,0	6,8[a] ±0,1
Azoto urinário e branquial (% NI)	30,4 ±4,7	37,8 ±8,6	43,1 ±12,6	41,1 ±8,8	39,9 ±1,9	43,6 ±0,9	42,4 ±0,6	40,1 ±3,6
Azoto retido (% NI)	64,9 ±4,7	57,3 ±8,6	52,4 ±12,5	54,3 ±8,9	51,7 ±1,7	48,9 ±1,1	50,2 ±0,5	53,2 ±3,7

Análise de variância dupla

Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Azoto ingerido (g/kg PM/dia)	***	ns	ns
Azoto fecal (% NI)	***	**	**
Azoto urinário e branquial (% NI)	ns	ns	ns
Azoto retido (% NI)	ns	ns	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).
*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.
†Peso médio.
NI: azoto ingerido.

Tabela 4.9. Balanços energéticos dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base nos dados do ensaio de metabolismo e na digestibilidade aparente das dietas)[1].

Temperatura	25 °C				18 °C			
Dietas	36P	42P	48P	56P	36P	42P	48P	56P
Energia ingerida (kJ/kg PM[†]/dia)	598,4 ±69,7	540,3 ±72,1	398,1 ±79,1	486,0 ±78,3	279,2^{c} ±9,4	250,6^{b} ±12,0	217,7^{a} ±8,8	259,5^{bc} ±7,8
Energia digestível (% EI)	91,0 ±0,3	90,1 ±0,9	91,0 ±0,3	90,9 ±0,4	88,9 ±±0,2	89,5 ±0,4	89,7 ±0,2	89,9 ±0,2
Energia metabolizável (% EI)	88,7 ±0,6	86,8 ±0,6	86,8 ±1,5	86,2 ±1,3	85,8 ±0,2	85,7 ±0,4	85,6 ±0,3	85,4 ±0,6
Energia líquida (% EI)	80,0 ±2,1	75,2 ±2,0	72,0 ±4,5	73,1 ±4,0	74,4 ±0,5	70,9 ±0,7	71,6 ±0,3	73,4 ±0,2
Energia retida (% EI)	71,0 ±3,0	64,6 ±3,5	56,6 ±7,4	60,8 ±6,1	64,5^{c} ±0,8	58,5^{ab} ±0,9	56,8^{a} ±0,5	60,0^{b} ±0,5
Perdas fecais e metabólicas								
Energia fecal (% EI)	9,0 ±0,3	9,9 ±0,9	9,0 ±0,3	9,1 ±0,4	11,1 ±0,2	10,5 ±0,4	10,3 ±0,2	10,1 ±0,2
Energia urinária e branquial (% EI)	2,3 ±0,4	3,3 ±0,7	4,2 ±1,2	4,6 ±1,0	3,0^{a} ±0,1	3,8^{b} ±0,1	4,1^{b} ±0,1	4,5^{b} ±0,4
Perdas de calor								
Produção total de calor (% EI)	17,6 ±2,4	22,2 ±3,5	30,3 ±6,0	25,5 ±4,9	20,6^{a} ±1,0	27,2^{bc} ±0,7	28,8^{c} ±1,2	25,4^{b} ±0,5
Incremento calórico (% EI)	8,7 ±1,5	11,6 ±2,2	14,9 ±3,1	13,2 ±2,7	11,0^{a} ±0,7	14,8^{b} ±0,5	14,0^{b} ±0,5	12,0^{a} ±0,3
Energia de manutenção (% EI)	8,9 ±1,1	10,6 ±1,5	15,4 ±3,0	12,3 2,2	9,6^{a} ±0,3	12,5^{b} ±0,2	14,8^{c} ±0,6	13,4^{b} ±0,4

Tabela 4.9. Continuação

Análise de variância dupla			
Fonte de variação	Temperatura	Dieta	Interacção
Energia ingerida (kJ/kg PM†/dia)	***	ns	ns
Energia digestível (% EI)	***	ns	ns
Energia metabolizável (% EI)	*	ns	ns
Energia líquida (% EI)	ns	ns	ns
Energia retida (% EI)	ns	ns	ns
Perdas fecais e metabólicas			
Energia fecal (% EI)	***	ns	ns
Energia urinária e branquial (% EI)	ns	ns	ns
Perdas de calor			
Produção total de calor (% EI)	ns	*	ns
Incremento calórico (% EI)	ns	ns	ns
Energia de manutenção (% EI)	ns	*	ns

[1] Média ± erro padrão. Para cada temperatura, valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).
*P<0,05, ** P<0,01, ***P<0,001, ns: não significativo.
†Peso médio.
EI: energia ingerida.

4.3.3. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais

A composição em aminoácidos das dietas experimentais é apresentada na tabela 4.10 e a composição corporal em aminoácidos dos robalos alimentados com as diferentes dietas experimentais é apresentada na tabela 4.11.

Tabela 4.10. Composição em aminoácidos das diferentes dietas experimentais (g/16g N)[1].

	Dieta			
	36P	42P	48P	56P
ARG	6,76	6,53	6,19	6,15
LYS	3,90	4,01	3,55	3,11
HIS	2,18	1,99	1,91	1,99
ILE	4,36	4,01	3,83	4,12
LEU	7,28	7,50	7,09	6,75
VAL	5,10	4,84	4,52	4,69
MET	2,12	1,68	1,66	2,18
PHE	3,93	3,77	3,63	3,66
THR	3,89	3,86	3,70	3,81
Tyr	3,54	3,47	3,24	3,36
Asp	9,29	8,86	8,48	9,00
Glu	19,15	16,25	15,60	16,59
Ser	4,74	4,52	4,44	4,44
Gly	5,68	5,31	4,94	5,23
Ala	6,32	6,05	5,73	5,92
Soma dos AAE	39,5	38,2	36,1	36,5

[1]ARG: arginina; LYS: lisina; HIS: histidina; ILE: isoleucina; LEU: leucina; VAL: valina; MET: metionina; PHE: fenilalanina; THR: treonina; Tyr: tirosina; Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutâmico; Ser: serina; Gly: glicina; Ala: alanina; AAE: aminoácidos essenciais.

Tabela 4.11. Teor de alguns aminoácidos corporais (g/16 g azoto) dos robalos no início e no final do ensaio de crescimento[1].

		Dietas			
	Inicial	36P	42P	48P	56P
ARG	6,45	6,48 ±0,11	6,10 ±0,16	6,11 ±0,19	6,68 ±0,10
LYS	3,41	4,12 ±0,69	3,05 ±0,28	2,96 ±0,14	4,04 ±0,49
HIS	2,14	$2,15^{b}$ ±0,01	$1,97^{a}$ ±0,05	$1,92^{a}$ ±0,06	$2,18^{b}$ ±0,05
ILE	3,86	4,14 ±0,04	3,83 ±0,07	3,98 ±0,11	4,18 ±0,15
LEU	6,68	$6,66^{b}$ ±0,11	$5,95^{a}$ ±0,16	$6,04^{a}$ ±0,20	$6,86^{b}$ ±0,21
VAL	4,36	$4,76^{b}$ ±0,01	$4,31^{a}$ ±0,07	$4,35^{a}$ ±0,10	$4,59^{ab}$ ±0,16
MET	2,37	2,40 ±0,03	2,29 ±0,04	2,18 ±0,10	2,47 ±0,10
PHE	3,86	$4,08^{b}$ ±0,05	$3,68^{a}$ ±0,04	$3,67^{a}$ ±0,92	$4,04^{b}$ ±0,10
THR	3,62	$3,83^{b}$ ±0,04	$3,54^{a}$ ±0,07	$3,47^{a}$ ±0,08	$3,83^{b}$ ±0,05
Tyr	3,24	3,39 ±0,01	3,15 ±0,04	3,10 ±0,09	3,39 ±0,07
Asp	9,43	10,05 ±0,01	9,20 ±0,12	9,19 ±0,20	9,89 ±0,20
Glu	16,68	17,79 ±0,07	16,29 ±0,23	16,16 ±0,38	17,60 ±0,31
Ser	4,25	4,51 ±0,02	4,12 ±0,04	4,05 ±0,10	4,38 ±0,08
Gly	6,00	6,76 ±0,35	6,15 ±0,00	6,24 ±0,14	5,86 ±0,97
Ala	6,40	6,75 ±0,02	6,18 ±0,11	6,19 ±0,12	6,82 ±0,08
Soma AAE	36,8	38,6 ±0,4	34,7 ±0,3	34,7 ±0,8	38,9 ±0,6

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Nome dos aminoácidos indicado na tabela 4.10.

No final do ensaio de crescimento, o teor em histidina, leucina, fenilalanina e treonina dos robalos alimentados com as dietas 36P e 56P foi significativamente maior do que nos robalos alimentados com as restantes dietas. O conteúdo em valina dos robalos alimentados com a dieta 36P foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com as dietas 42P e 48P. Para os restantes aminoácidos, o conteúdo corporal não foi afectado pelo teor proteico das dietas. A soma dos aminoácidos essenciais (AAE) variou entre 34,7 e 38,9 % da proteína corporal e não foi significativamente diferente entre os grupos experimentais.

O ganho diário em aminoácidos corporais (mg/100 g PM/dia) é apresentado na tabela 4.12. O ganho corporal em arginina, histidina, leucina, fenilalanina e treonina dos robalos alimentados com as dietas 42P e 48P foi significativamente menor do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas. O ganho diário em valina foi significativamente maior nos robalos alimentados com as dietas 36P e 56P do que com a dieta 42P. A soma dos AAE corporais foi significativamente menor nos robalos alimentados com as dietas 42P e 48P do que a dos robalos alimentados com as restantes dietas. O ganho diário dos aminoácidos não essenciais apresentou uma tendência similar, sendo significativamente menor nos robalos alimentados com as dietas 42P e 48P do que nos alimentados com as restantes dietas.

A estimativa das necessidades de AAE (% proteína da dieta), feita com base no acréscimo diário de AAE dos robalos alimentados com as dietas experimentais, é apresentada na tabela 4.13. Uma vez que as necessidades de AAE do robalo determinadas no presente trabalho não variaram com a composição das dietas experimentais apresenta-se, na tabela 4.14, o seu valor médio e indicam-se as necessidades de AAE desta e de outras espécies, estimadas por outros autores, segundo a mesma metodologia.

Tabela 4.12. Ganho diário em aminoácidos corporais (mg/ 100 g peso médio/ dia)[1].

	Dietas			
	36P	42P	48P	56P
Proteína	$274,5^{a}$ ±0,1	$274,8^{a}$ ±1,9	$281,8^{b}$ ±1,8	$288,2^{c}$ ±1,9
ARG	$17,8^{b}$ ±0,4	$16,5^{a}$ ±0,6	$17,0^{a}$ ±0,6	$19,4^{b}$ ±0,4
LYS	11,8 ±2,3	8,1 ±0,9	8,1 ±0,4	12,0 ±1,6
HIS	$5,9^{b}$ ±0,0	$5,3^{a}$ ±0,2	$5,3^{a}$ ±0,2	$6,3^{b}$ ±0,2
ILE	11,5 ±0,1	10,5 ±0,3	11,3 ±0,4	12,2 ±0,6
LEU	$18,3^{b}$ ±0,34	$15,1^{a}$ ±0,6	$16,6^{a}$ ±0,6	$19,9^{b}$ ±0,9
VAL	$13,3^{b}$ ±0,0	$11,8^{a}$ ±0,3	$12,3^{ab}$ ±0,3	$13,4^{b}$ ±0,6
MET	6,6 ±0,1	6,2 ±0,2	6,0 ±0,3	7,2 ±0,3
PHE	$11,3^{b}$ ±0,2	$10,0^{a}$ ±0,2	$10,2^{a}$ ±0,3	$11,7^{b}$ ±0,4
THR	$10,6^{b}$ ±0,12	$9,7^{a}$ ±0,29	$9,7^{a}$ ±0,23	$11,2^{b}$ ±0,22
Tyr	$9,4^{b}$ ±0,0	$8,6^{a}$ ±0,2	$8,7^{a}$ ±0,3	$9,9^{b}$ ±0,3
Asp	$28,0^{b}$ ±0,0	$25,1^{a}$ ±0,6	$25,8^{a}$ ±0,5	$28,8^{b}$ ±0,9
Glu	$49,5^{b}$ ±0,3	$44,5^{a}$ ±1,1	$45,2^{a}$ ±1,0	$51,3^{b}$ ±1,4
Ser	$12,5^{b}$ ±0,1	$11,2^{a}$ ±0,2	$11,3^{a}$ ±0,3	$12,7^{b}$ ±0,3
Gly	19,1 ±1,2	17,0 ±0,1	17,7 ±0,4	16,8 ±3,3
Ala	$18,8^{b}$ ±0,1	$16,8^{a}$ ±0,5	$17,3^{a}$ ±0,3	$19,9^{c}$ ±0,4
Soma AAE	$107,2^{b}$ ±3,7	$94,1^{a}$ ±3,6	$96,6^{a}$ ±3,3	$113,2^{b}$ ±5,4

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

Nome dos aminoácidos indicado na tabela 4.10.

Tabela 4.13. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais (g/ 16 g azoto)[1].

	Dieta			
	36P	42P	48P	56P
ARG	2,11	1,80	1,79	2,10
LYS	1,38	0,89	0,85	1,31
HIS	0,70	0,58	0,55	0,68
ILE	1,37	1,14	1,19	1,33
LEU	2,17	1,73	1,75	2,16
VAL	1,58	1,28	1,29	1,45
MET	0,78	0,68	0,63	0,78
PHE	1,34	1,09	1,07	1,27
THR	1,26	1,05	1,02	1,21

[1]Nome dos aminoácidos indicado na tabela 4.10.

Tabela 4.14. Estimativa das necessidades de aminoácidos essenciais (g/16 g azoto ou mg/100g peso médio) de diferentes espécies de peixes estimadas com base no ganho diário em aminoácidos essenciais corporais.

	Robalo[1]		Robalo[2]		Robalo[3]		Truta arco-íris[4]		Carpa[4]		Esturjão[5]	
	g/16gN	mg/100g PM	g/16gN	mg/100g PM	g/16gN	mg/100g PM	g/16gN	mg/100g PM	g/16gN	mg/100g PM	g/16gN	mg/100g PM
ARG	2,0	18	3,7	33	4,4	24	3,6	34	3,9	34	2,8	11
LYS	1,1	10	4,7	42	6,7	35	5,3	50	5,3	50	6,3	26
HIS	0,6	6	1,3	12	2,3	12	1,6	15	1,3	13	1,1	4
ILE	1,3	11	2,5	22	3,0	16	2,4	23	2,3	22	2,1	9
LEU	1,9	18	4,1	37	4,8	26	4,4	42	4,2	40	3,2	13
VAL	1,4	13	2,8	25	3,8	20	3,2	28	3,0	30	2,3	9
MET	0,7	7	2,2*	20*	—	—	1,8	17	1,6	—	—	—
PHE	1,2	11	4,1**	37**	2,5	13	3,2	30	3,0	28	1,5	6
THR	1,1	10	2,4	22	2,0	13	0,6	32	3,3	31	2,2	9

[1]Presente trabalho; [2]Tibaldi et al. (1996b); [3]Spyridakis (1989); [4]Oghino (1980); [5]Kaushik et al. (1991).

Nome dos aminoácidos indicado na tabela 4.10.

*metionina + cisteína; ** fenilalanina + tirosina

N: azoto; PM: peso médio

4.4. Discussão

Neste ensaio, o crescimento e a eficiência de utilização do alimento foram influenciados sobretudo pela temperatura da água e em menor extensão pela composição das dietas experimentais. O efeito determinante da temperatura da água no crescimento e na ingestão do alimento foi anteriormente descrito para o robalo (Alliot et al., 1983; Hidalgo et al., 1987a; Calderer e Castelló-Orvay, 1996; Russell et al., 1996) e para outras espécies (Elliott, 1978; Cho e Slinger, 1979; Hogendoorn et al., 1983; Jobling, 1983; Goolish e Adelman, 1984; Cho e Watanabe, 1985; Hasan e Macintosh, 1993; Alanärä, 1994; Iwata et al., 1994).

O aumento da temperatura da água melhorou significativamente a eficiência de conversão alimentar, o que está de acordo com resultados prévios em robalo (Alliot et al., 1983; Hidalgo et al., 1987a; Russel et al., 1996) e noutras espécies de peixes (Elliott, 1978; Brett e Groves, 1979; Cho e Slinger, 1979; Goolish e Adelman, 1984; Cho e Watanabe, 1985). Esta melhor eficiência de utilização do alimento à temperatura mais elevada pode ser explicada por uma maior proporção de alimento ingerido disponível para o crescimento, quando a temperatura da água se aproxima da temperatura óptima para a espécie. Estes resultados são consistentes com os obtidos, também em robalo, por Russel et al. (1996) em que o efeito da temperatura da água na taxa de ingestão para o crescimento foi mais pronunciado do que na taxa de ingestão para manutenção.

Os peixes, à semelhança dos mamíferos (Kissileff e Van Itallie, 1982), regulam a taxa de ingestão em função das suas necessidades em energia digestível (Kaushik et al., 1981; Kaushik e Luquet, 1984; Boujard e Médale, 1994). No presente trabalho, enquanto que a 18 °C a taxa de ingestão segue esta tendência, a 25 °C a ingestão voluntária parece ter sido melhor ajustada à taxa de ingestão proteica, tal como foi anteriormente descrito por Oliva-Teles e Cerqueira (1997) em robalos mantidos a 22 °C, e por Santinha et al. (1996) em douradas mantidas a 26 °C. Estes resultados parecem indicar que os robalos mantidos a 25 °C regularam a ingestão proteica de modo a satisfazer as necessidades para o crescimento máximo, as quais rondariam os 10 g de proteína/ kg peso vivo/dia. Com a realização de novos cálculos a partir dos dados experimentais de Hidalgo e Alliot (1988) e Pérez et al. (1997), em robalos de 30 – 40g mantidos a 20 °C e em robalos de 3g mantidos a 28 °C, obtêm-se valores na ordem dos 5-9 g e 12-15 g proteína/kg peso vivo/dia, valores próximos dos obtidos no

presente trabalho. No entanto, para os robalos com peso médio de 100g e mantidos a 18 °C, Dias (1999) estimou as necessidades proteicas em apenas 4,5g de proteína/kg peso vivo/dia. Com base nos dados experimentais dos trabalhos de diversos autores, Kaushik (1995a) estimou as necessidades proteicas para crescimento máximo de diferentes espécies de teleósteos entre 7 a 11g/ kg peso vivo/dia.

Os resultados deste trabalho mostram que, nas nossas condições experimentais, as necessidades proteicas dos juvenis de robalo, expressas em termos de ganho de peso, foram satisfeitas com as dietas 48P e 56P, independentemente da temperatura da água. Apesar do crescimento ter sido mais rápido à temperatura mais elevada, a variação térmica não induziu uma alteração do teor proteico óptimo das dietas, tal como foi anteriormente verificado para a mesma espécie em intervalos térmicos diferentes (Hidalgo e Alliot, 1988) e para a truta arco-íris (Cho e Slinger, 1979; Luquet e Fauconneau, 1979; NRC, 1981). Contudo, para o salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*) o teor proteico óptimo da dieta foi estimado em 40% a 7 °C e em 50% a 15 °C (DeLong et al., 1958). Millikin (1982, 1983) também observou no robalo-muge (*Morone saxatilis)* que o teor proteico óptimo das dietas aumentava de 47 para 55% quando a temperatura da água passou dos 20 para 24 °C.

Estes resultados confirmam as elevadas necessidades proteicas para o crescimento do robalo (Alliot et al., 1974; Métailler et al., 1981; Hidalgo e Alliot, 1988; Ballestrazzi et al., 1994; Pérez et al., 1997). No entanto, segundo Dias et al. (1998) o teor proteico das dietas pode ser diminuído para 43% (em base seca) se o teor energético da dieta for de pelo menos 21 kJ/g matéria seca, ou seja, uma razão entre a proteína digestível/energia digestível (PD/ED) de 19 a 20 mg/kJ. Na realidade, no presente trabalho e apesar do teor energético não ser muito diferente, este valor de PD/ED é mais baixo do que o intervalo testado (25 a 29 mg/kJ). O mesmo se verifica noutros trabalhos com robalo (25 a 30 mg/kJ; Métailler et al., 1981; Alliot, 1982; Hidalgo e Alliot, 1988; Spyridakis, 1989; Tibaldi et al., 1991).

Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e da energia foram bastante elevados, mas da mesma ordem de grandeza dos obtidos anteriormente em robalos alimentados com dietas que incluíam farinhas de peixe de boa qualidade (Alexis, 1997; Silva e Oliva-Teles, 1998). Neste estudo observou-se um aumento pequeno mas estatisticamente significativo dos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, da proteína e da energia com o aumento da temperatura da água. Os dados bibliográficos disponíveis sobre o

efeito da temperatura na digestibilidade das dietas são controversos. Alguns autores não observaram efeito da temperatura na digestibilidade (Windell et al., 1978; Cho e Slinger, 1979; Luquet e Fauconneau, 1979; Kaushik, 1981; Cho et al., 1982; Médale et al., 1991a; Iwata et al., 1994; Kim et al., 1998), enquanto que outros observaram um aumento da digestibilidade para temperaturas mais elevadas (Atherton e Aitken, 1970; Elliott, 1976 a, Choubert et al., 1982; Oliva-Teles e Rodrigues, 1993; Azevedo et al., 1998). Esta divergência de resultados pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao intervalo de temperaturas testado nos diferentes estudos. De facto, para a truta arco-íris, as digestibilidades da proteína e da energia não foram afectadas pelas variações térmicas, dentro do intervalo normal de temperaturas para a espécie, não se verificando o mesmo fora deste intervalo (Brauge, 1994).

O efeito da temperatura da água na composição corporal dos peixes deve ser interpretado cuidadosamente, visto que no final do ensaio de crescimento o tamanho dos peixes mantidos a 25 e 18 °C foi substancialmente diferente, o que torna difícil discriminar o efeito da temperatura do efeito do tamanho do peixe na composição corporal. A cada temperatura e no final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos peixes não foi significativamente influenciada pelo teor proteico das dietas. Estes resultados são idênticos aos obtidos por outros autores para a mesma espécie (Métailler et al., 1981; Hidalgo e Alliot, 1988). Pelo contrário, Ballestrazzi et al. (1994) observaram um aumento da humidade e da proteína corporal dos robalos, com o aumento do teor proteico das dietas.

Os valores do índice hepatossomático observados neste ensaio (2,5 a 3,3 %) são da mesma ordem de grandeza dos observados por outros autores nesta espécie (Ballestrazzi et al., 1994; Dias et al., 1998). A temperatura da água não afectou significativamente o índice hepatossomático, conforme já observado anteriormente no robalo (Hidalgo e Alliot, 1988). No entanto, de acordo com outros autores, temperaturas mais elevadas podem conduzir a um aumento da mobilização do glicogénio hepático e, consequentemente, a uma redução do índice hepatossomático, tanto nesta como noutras espécies (Hilton, 1982, Hidalgo et al., 1987a; Keembiyehetty e Wilson, 1998).

Apesar do conteúdo lipídico corporal não ter sido influenciado pela temperatura da água, o índice visceral foi significativamente maior a 18 do que a 25 °C. Também no robalo, Alliot et al. (1983) observaram um aumento da deposição lipídica, maioritariamente no tecido perivisceral e em menor quantidade no músculo, com a diminuição da temperatura da água.

Na truta arco-íris, Kaushik (1981) não observou qualquer efeito da temperatura na eficiência de retenção azotada (% azoto ingerido). Resultados similares foram observados no robalo mantido a 15 e 20 °C (Hidalgo et al.,1987a; Hidalgo e Alliot, 1988). Pelo contrário, no presente trabalho a retenção azotada (% azoto ingerido) foi significativamente maior a 18 do que a 25 °C, indicando que o metabolismo proteico foi afectado pela temperatura da água.

Nos robalos mantidos a 18 °C, a redução do teor proteico das dietas conduziu a um aumento significativo da retenção azotada (% azoto ingerido), o que está de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Lee e Putnam, 1973; Higuera et al., 1977; Reinitz e Hitzel, 1980; Millikin, 1982; Reinitz, 1987). Porém, a 25 °C não se observou esta tendência, provavelmente porque a ingestão proteica não foi afectada pela composição das dietas.

Neste estudo, a eficiência de retenção energética (% energia ingerida) não foi afectada pela variação térmica. Pelo contrário, também nesta espécie, Hidalgo e Alliot (1988) observaram que o aumento da temperatura de 15 para 20 °C afectou negativamente a retenção energética (% energia ingerida). Contudo, noutras espécies de teleósteos foi observado uma maior eficiência de retenção energética (% energia ingerida) a temperaturas mais elevadas (Cho e Slinger, 1979; Huisman et al., 1979; Cho e Watanabe, 1895; Oliva-Teles e Rodrigues, 1993).

A energia retida (% energia ingerida) aumentou com o teor proteico da dieta, no entanto, este aumento foi estatisticamente significativo apenas a 25 °C. Uma tendência similar foi anteriormente observada nesta espécie por Hidalgo e Alliot (1988), mas noutras espécies verificou-se que o teor proteico da dieta não afectou a utilização da energia (Medland e Beamish, 1985; Oliva-Teles e Rodrigues, 1993).

O perfil de excreção de amónia não foi afectado pela temperatura da água ou pela composição das dietas. Este perfil caracterizou-se por um aumento significativo da excreção de amónia duas a três horas após a ingestão do alimento e foi semelhante ao anteriormente observado no robalo (Spyridakis, 1989; Ballestrazzi et al., 1994; Dosdat et al., 1996) bem como noutras espécies carnívoras (Brett e Zala, 1975; Elliott, 1976b; Rychly e Marina, 1977; Kaushik, 1980; Lied e Braaten, 1984; Ming, 1985; Porter et al., 1987; Médale et al., 1995; Gélineau et al., 1998). No entanto, em espécies omnívoras como a carpa, o pico de excreção

de amónia pós-prandial ocorre mais tardiamente, cerca de 6 horas após a ingestão do alimento (Kaushik, 1980; Chakraborty et al., 1992a).

Nos animais poiquilotérmicos, como é o caso dos peixes, a taxa metabólica aumenta várias vezes com o aumento da temperatura da água (Kutty e Mohamed, 1975; Caulton, 1977; Cho e Slinger, 1979; Morris e North, 1984; Eccles, 1985; Guinea e Fernandez, 1991; Cai e Summerfelt, 1992; Brauge, 1994; Mwangangi e Mutungi, 1994) e a excreção azotada branquial e urinária também aumenta com o aumento da temperatura da água (Savitz, 1969; Elliott, 1976 a; Savitz et al., 1977; Kaushik, 1980; Tátai, 1986; Forsberg e Summerfelt, 1992; Beck e Gropp, 1995; Kikuchi et al., 1995; Watanabe e Ohta, 1995). O mesmo foi observado no presente trabalho. Em oposição a estes resultados, Guerin-Ancey (1976) refere que em robalos (peso médio de 11 a 102 g) mantidos entre 18 e 24 °C, a taxa de excreção azotada não foi influenciada pela variação térmica. Contudo, nesse trabalho os peixes estavam confinados a tanques muito pequenos (1 a 10 litro) o que limitava a actividade natatória voluntária, facto que pode ter influenciado os resultados.

Na tabela 4.15 e 4.16 são apresentados, respectivamente, valores da excreção azotada branquial e urinária endógena e da taxa metabólica de rotina em diversas espécies de peixes. Considerando que a taxa metabólica e a excreção azotada em jejum podem ser afectadas por diversos factores como a espécie, o tamanho do animal e a duração do jejum, os resultados do presente trabalho encontram-se dentro dos valores observados para outras espécies.

O cálculo do Q_{10} dá-nos a magnitude do aumento da taxa metabólica de jejum para um aumento da temperatura de 10 °C (Winberg, 1956) e permite uma estimativa da influência da temperatura na taxa metabólica de jejum. Os valores de Q_{10} variam consideravelmente com a espécie, o peso e o intervalo de temperatura considerado. Para as espécies de água doce, Brett e Groves (1979) estimaram um valor de 2,3 para o Q_{10}. No presente trabalho, o valor de Q_{10} foi de 2,26 ± 0,12 (média ± erro padrão), valor muito próximo daquele e do obtido anteriormente também em robalo (Dalla-Via et al., 1998).

A temperatura da água não afectou significativamente a excreção de azoto amoniacal (% azoto ingerido), tal como foi observado anteriormente na truta arco-íris (Kaushik, 1981; Médale et al., 1991a; 1995) e noutras espécies (Cui e Wootton, 1988).

Tabela 4.15. Excreção diária de amónia endógena de diferentes espécies de peixes utilizadas em aquacultura.

Espécie	Temperatura (° C)	Duração do jejum (dias)	Peso individual (g)	Excreção azotada (mg N.NH4/kg PM/dia)	Referência
Robalo	25	8	42	200–216	Presente estudo
Robalo	18	8	38	81–100	Presente estudo
Robalo	24–27	6	130	160	Ballestrazzi et al. (1994)
Robalo	1 –24	1	11–102	69–75	Guerin-Ancey (1976)
Robalo	18	1	30–40	275	Spyridakis (1989)
Dourada	24	1	3 – 40	240–384	Porter et al. (1987)
Bacalhau	14	7	200	157	Ramnarine et al. (1987)
Truta arco-íris	15–18	28	130	91	Kaushik (1980)
Truta arco-íris	18	8	70	75	Brauge (1994)
Truta arco-íris	8	8	70	70	Brauge (1994)
Truta comum	17	1	50	186	Elliott (1976 b)
Truta-do-lago-americana (*Salvelinus namaycush*)	10	12	204	140	Jayaram e Beamish (1992)
Esturjão	17–18	2	44	210	Gershanovich e Pototskij (1992)
Carpa	28	2	65	120–125	Chakraborty et al. (1992a)

Tabela 4.16. Taxa metabólica de rotina de diferentes espécies de peixes utilizadas em aquacultura.

Espécie	Temperatura (° C)	Duração do jejum (dias)	Peso individual (g)	Dispêndio de energia (kJ/kg PM/dia)	Referência
Robalo	25	8	42	54 – 58	Presente estudo
Robalo	18	8	38	28 – 36	Presente estudo
Robalo	18	1	30 – 40	65	Spyridakis, 1989
Robalo	20	5	4	53 – 65	Morales e Oliva-Teles (1995)
Robalo	20	11	25	55 – 49	Oliva –Teles e Cerqueira (1997)
Rodovalho	21	8	11	41 – 48	Oliva-Teles et al. (1995)
Truta arco-íris	7,5	7	50 – 140	30	Cho e Slinger (1979)
Truta arco-íris	10	7	50 – 140	53	Cho e Slinger (1979)
Truta arco-íris	15	7	50 – 140	89	Cho e Slinger (1979)
Truta arco-íris	20	7	50 – 140	100	Cho e Slinger (1979)
Truta arco-íris	15	3-5	19 – 66	45 – 73	Cho (1982)
Truta arco-íris	18	8	90	40	Brauge (1994)
Truta arco-íris	8	8	90	29	Brauge (1994)

A excreção de amónia também não foi significativamente influenciada pelo teor proteico da dieta, tendo variado entre 31 e 44 % do azoto ingerido, valores semelhantes aos usualmente obtidos nesta espécie (Ballestrazzi et al., 1994; Dosdat et al., 1996). No entanto, outros estudos com robalo referem excreções azotadas (% azoto ingerido) muito superiores (Spyridakis, 1989; Vitale-Lelong, 1989), possivelmente devido a diferenças na qualidade do alimento e no modo de alimentação (número de refeições diárias e taxa de ingestão).

Existem diversos estudos que demonstram que uma diminuição do teor proteico das dietas conduz a uma menor utilização das proteínas para fins energéticos, reduzindo consideravelmente a excreção não fecal de compostos azotados (Rychly e Marina, 1977; Paulson, 1980; Rychly, 1980; Beamish e Thomas, 1984; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Jayaram e Beamish, 1992; Lanari et al., 1995). Com efeito, verificou-se que existe uma relação directa entre a ingestão proteica e a excreção azotada (Caulton, 1978; Chakraborty et al., 1992a; Kaushik, 1980; Médale et al.,1995). No presente trabalho e a ambas as temperaturas observou-se uma tendência para a redução da excreção de azoto amoniacal com a diminuição da ingestão proteica.

O incremento calórico é afectado por diversos factores ambientais, dos quais a temperatura é o mais importante (Brett e Groves, 1979). Em valores absolutos, o incremento calórico aumentou significativamente com o aumento da temperatura da água de 18 para 25 °C. O incremento calórico inclui a energia despendida na síntese proteica, na desaminação dos aminoácidos (LeGrow e Beamish, 1986; Lyndon et al., 1992; Jobling, 1994) e no processamento mecânico e bioquímico do alimento ingerido (Tandler e Beamish, 1980). Todos estes parâmetros podem ser acelerados com o aumento da temperatura.

Continua a suscitar alguma discussão o efeito da temperatura da água no incremento calórico quando expresso em percentagem da energia ingerida. Diversos autores têm observado que o incremento calórico é influenciado pela temperatura da água (Cho e Slinger, 1979; Beamish e Trippel, 1990; Médale et al., 1991a; Guinea e Fernandez, 1997), enquanto que outros, incluindo o presente trabalho, não observaram esse efeito (Kaushik, 1989b; Brauge, 1994). Brauge (1994) refere que a temperatura da água não influenciou o incremento calórico quando as trutas arco-íris foram alimentadas com dietas pobres em hidratos de carbono digestíveis e ricas em lípidos, contudo, quando foram alimentadas com dietas ricas em hidratos de carbono digestíveis o incremento calórico aumentou com a temperatura. Deste

modo, o efeito da temperatura da água no incremento calórico dependeria da composição da dieta e da importância da lipogénese.

No presente estudo, a 25 °C o incremento calórico (% energia ingerida) não foi afectado pelo teor proteico das dietas, enquanto que a 18 °C foi significativamente menor com as dietas 36P e 56P do que com as restantes dietas. A síntese e a taxa de renovação proteica têm sido consideradas como o principal factor condicionante da magnitude do incremento calórico (Jobling, 1981; Kaushik e Médale, 1994). Segundo alguns autores, um aumento da ingestão proteica pode resultar num maior incremento calórico, devido à utilização das proteínas para fins energéticos (Cho et al., 1976; Jobling e Davis, 1980; LeGrow e Beamish, 1986). Em oposição a estes, outros autores observaram que o incremento calórico é independente do teor proteico das dietas (Medland e Beamish, 1985; Oliva-Teles e Rodrigues, 1993; Oliva-Teles et al., 1995). Esta aparente contradição poderá estar relacionada com o teor lipídico das dietas. Com efeito, segundo Cho (1982), em dietas de elevado teor lipídico o incremento calórico (% energia ingerida) está inversamente relacionado com o teor proteico das dietas, mas em dietas de baixo teor em energia não proteica o efeito do teor proteico da dieta no incremento calórico não é significativo.

No presente trabalho, os valores do incremento calórico variaram entre 8 e 15 % da energia ingerida, valores da mesma ordem de grandeza dos observados para a truta arco-íris mantida a 15 °C (5 a 15 % energia ingerida; Cho et al., 1982), mas substancialmente inferiores aos observados em animais homeotérmicos (cerca de 20 a 30 % energia ingerida; NRC, 1984). Esta diferença pode-se explicar pelo facto dos peixes gastarem menor quantidade de energia na excreção dos produtos azotados. Como consequência, a energia líquida de uma dieta é maior nos peixes do que nos animais homeotérmicos.

Neste trabalho, as estimativas das retenções azotadas e energéticas efectuadas com base nos dados da excreção azotada e da calorimetria indirecta foram superiores às determinadas com base nos resultados do ensaio zootécnico. Tal facto pode-se atribuir tanto às características próprias de cada um dos métodos, como às variáveis introduzidas em virtude de os dois tipos de estimativas não terem sido efectuadas em simultâneo. Assim, e no que se refere às condições experimentais, os dois tipos de aproximação diferiram no que diz respeito ao peso médio dos robalos, às condições de estabulação dos animais e à quantidade de alimento ingerido. Do ponto de vista metodológico, nos ensaios de crescimento as retenções

azotadas e energéticas são determinadas com base no crescimento e na análise da composição corporal. Porém, nos ensaios de calorimetria indirecta, a retenção energética é estimada a partir da produção de calor, que por sua vez é calculada através do consumo de oxigénio, pela aplicação de um coeficiente oxienergético que pode não ser o mais apropriado (Brett e Groves, 1979; Braaten, 1979; Cho et al., 1982; Brafield, 1985). A retenção azotada, nos ensaios de metabolismo, foi estimada através do doseamento do azoto amoniacal, assumindo-se que a excreção de azoto amoniacal correspondia a 85% da excreção azotada total, o que poderá não traduzir a real excreção doutros compostos azotada que não a amónia (Dosdat et al., 1996). Por outro lado, nos ensaios de metabolismo os balanços são "instantâneos" e, por isso, dão-nos uma ideia da resposta fisiológica dos animais num momento preciso, enquanto que os balanços obtidos através dos ensaios de crescimento são balanços "acumulados", que reflectem a resposta dos animais em períodos de tempo mais longos (Knights, 1985).

Neste trabalho, o comportamento alimentar dos robalos foi diferente no ensaio de crescimento e no de metabolismo. No ensaio de crescimento, nos robalos mantidos a 18 °C, a ingestão azotada aumentou significativamente com o aumento do teor proteico das dietas, contrariamente aos mantidos a 25 °C. No ensaio de metabolismo, a ingestão azotada não foi significativamente afectada pelo teor proteico da dieta em qualquer das duas temperaturas, com excepção da dieta 56P a 18 °C. Tal facto poderá ter influenciado a tendência da variação da retenção azotada entre os dois tipos de aproximação.

Para diversas espécies de peixe foi encontrada uma elevada correlação entre o perfil das necessidades de aminoácidos essenciais (AAE) e a composição aminoacidémica do peixe inteiro, tendo sido sugerido que esta fosse usada como uma primeira estimativa das necessidades de aminoácidos de uma espécie (Wilson e Cowey, 1985; Wilson e Poe, 1985; Gatlin, 1987). Para além disso, foi observada uma grande estabilidade da composição aminoacidémica das proteínas corporais entre diferentes espécies de peixes. Com efeito, os dados bibliográficos indicam que as diferenças na composição aminoacidémica entre espécies são menores do que as diferenças na composição aminoacidémica dos diferentes tecidos de uma dada espécie (Reeds, 1988).

No presente trabalho, com excepção da lisina, a composição média em animoácidos do robalo é comparável à descrita para outras espécies de peixes (Arai, 1981; Ogata et al., 1983; Wilson e Cowey, 1985; Wilson e Poe, 1985; Gatlin, 1987; Mohanty e Kaushik, 1991). No

entanto, Spyridakis (1989) indica uma composição aminoacidémica do robalo inteiro consideravelmente menor do que a do presente trabalho. Contudo, a composição aminoacidémica do músculo do robalo determinada por Alliot (1982) é comparável à determinada no peixe inteiro neste trabalho, excepto para a lisina. Isto está de acordo com Mambrini e Kaushik (1995), os quais se basearam nos valores de diversas espécies para afirmarem que a principal diferença entre a composição em AAE do músculo e do peixe inteiro diz respeito ao teor em lisina e em fenilalanina.

Neste trabalho, o conteúdo corporal do robalo em histidina, leucina, fenilalanina, treonina e valina foi afectado pelo teor proteico da dieta fornecida. Os dados disponíveis na literatura referentes ao efeito da dieta na composição aminoacidémica dos peixes inteiros são relativamente escassos. Nos poucos trabalhos existentes não foi observado um efeito significativo do teor em proteína/energia da dieta na composição aminoacidémica do peixe inteiro (Schawarz e Kirchgessner, 1988; Kaushik et al., 1991). Segundo Kaushik et al. (1991), as diferenças na composição aminoacidémica dos peixes alimentados com dietas de diferentes teores proteicos podem ser devidas a variações na proporção relativa dos aminoácidos livres dos diferentes tecidos após a ingestão do alimento.

As necessidades quantitativas de aminoácidos essenciais do robalo, estimadas no presente trabalho segundo a metodologia de Ogino (1980), não foram afectadas pelo teor proteico das dietas e são inferiores às estimadas para esta espécie por Spyridakis (1989) e Tibaldi et al. (1996b), com base na mesma metodologia. No trabalho do Spyridakis (1989) os robalos foram alimentados com uma ração diária de 1,4 % peso vivo, contra a ingestão voluntária diária do presente trabalho. Deste modo, as diferenças de resultados podem, pelo menos em parte, ser devidas a diferenças na ingestão azotada. Apesar de Cowey e Luquet (1983) terem demonstrado que as necessidades da truta arco-íris de determinados aminoácidos eram muito diferentes quando expressas em percentagem da proteína da dieta, mas similares quando expressas mg/100g peso vivo, no presente trabalho as necessidades de AAE assim expressas continuam a ser inferiores às determinadas por Spyridakis (1989) e Tibaldi et al. (1996b).

As necessidades de arginina, metionina, lisina, triptofano e treonina do robalo determinadas com base em estudos de dose-resposta são também superiores às estimadas no presente trabalho (Thebault et al., 1985; Hidalgo et al., 1987b; Tibaldi e Lanari, 1991; Tibaldi et al., 1993, 1994; Tibaldi e Tulli, 1999). Para outras espécies, como a truta arco-íris, a carpa e

a tilápia do Nilo, as estimativas das necessidades de AAE, com base no ganho diário de AAE corporais, também não coincidem muito bem com as determinações com base em estudos de dose-resposta (Santiago e Lovell, 1988; NRC, 1993). Estas diferenças não são porém de estranhar, uma vez que as necessidades de AAE estimadas com base no ganho diário de AAE podem apenas ser consideradas como uma aproximação das necessidades reais, visto que não consideram os gastos com a manutenção das funções vitais bem como com a utilização digestiva e metabólica da proteína da dieta (Wilson e Poe, 1985).

Em conclusão, os resultados deste trabalho sugerem que, independentemente da temperatura da água, as necessidades proteicas para o crescimento aproximam-se de 48% da dieta (em base seca). O aumento da temperatura da água de 18 para 25 °C foi acompanhado por um considerável aumento da taxa de crescimento, da ingestão voluntária e da eficiência de utilização do alimento. A utilização proteica foi mais eficiente a 18 do que a 25 °C, contudo observaram-se interacções significativas entre a temperatura e a composição das dietas experimentais. A taxa metabólica e a excreção azotada dos robalos variou de modo directo com a temperatura da água. No entanto, o perfil de excreção de amónia e do consumo de oxigénio não foram afectados pela temperatura.

5. Efeito do Nível de Inclusão Lipídica da Dieta

5.1. Introdução

Recentemente tem sido dado particular ênfase à problemática ambiental do desenvolvimento da aquacultura, nomeadamente no que diz respeito à legislação sobre as cargas poluentes dos efluentes, cada vez mais restritiva, e à dependência da produção aquícola de água de boa qualidade (Shehadeh e Pedini, 1997).

A qualidade dos efluentes piscícolas depende sobretudo das perdas relacionadas com o alimento. No último simpósio sobre "Nutritional Strategies and Management of Aquaculture Waste", realizado em 1997, ficou bem patente que a efectiva redução das descargas piscícolas passa pela aplicação de estratégias nutricionais adequadas, tais como o aumento da digestibilidade das dietas, a formulação de dietas nutricionalmente equilibradas e de elevada densidade de nutrientes e uma melhor gestão da alimentação.

A optimização da relação proteína digestível/energia digestível (PD/ED) das dietas mostrou ter um papel importante na utilização proteica e energética (Kaushik, 1994). Está bem estabelecido que dentro de certos limites, o aumento do teor em energia digestível das dietas para peixes, mediante suplementação lipídica, conduz a uma melhoria das performances zootécnicas e da eficiência de utilização do alimento (Cho e Kaushik, 1990). Por exemplo, na salmonicultura intensiva a utilização de dietas com elevado teor lipídico, que em alguns casos ultrapassa os 30%, conduziu a um aumento da eficiência de utilização do alimento e a uma redução significativa das descargas de azoto, de fósforo e de matéria orgânica (Cowey e Cho, 1991; Johnsen e Wandsvik, 1991; Robert et al., 1993).

O aumento do teor lipídico das dietas tem, porém, de ser cuidadosamente avaliado, uma vez que pode afectar significativamente a composição corporal dos animais, essencialmente devido ao aumento da deposição lipídica nas carcaças (Cowey, 1993; Hillestrad e Johnsen, 1994; Grisdale-Helland e Helland, 1997). A importância destes depósitos lipídicos, assim como a sua localização e composição, influenciam grandemente o valor nutricional, as características organolépticas, a capacidade de transformação e o tempo de armazenamento do pescado (Cowey, 1993).

Apesar dos efeitos benéficos do aporte suplementar de lípidos nas dietas para salmonídeos terem sido extensivamente estudados, os dados disponíveis para as espécies marinhas são escassos e contraditórios. Enquanto que uns autores observaram um aumento da eficiência de utilização da proteína com dietas de elevado teor em energia digestível (Vergara et al., 1996; Dias et al., 1998), outros não observaram qualquer influência do teor lipídico das dietas na utilização da proteína (Kissil e Gropp, 1984; Andersen e Alsted, 1993; Lanari et al., 1998).

Para o robalo, o teor lipídico das dietas tem de ser sempre considerado, uma vez que níveis lipídicos inferiores a 5% reduzem significativamente o crescimento (Alliot et al., 1974). Ainda para esta espécie, o nível óptimo de incorporação lipídica nas dietas foi estimado em 12% (Alliot et al., 1974). Níveis lipídicos superiores a 15% provaram não afectar significativamente o crescimento do robalo (Metailler et al., 1981) ou do robalo-muge (*Morone saxatilis*; Millikin, 1983; Berger e Halver, 1987; Nematipour et al., 1992b; Fair et al., 1993). Pérez et al. (1997) encontraram melhores resultados de crescimento com dietas com um teor lipídico entre 10 e 14%, tendo verificado que níveis mais elevados (18%) ou mais baixos (6%) conduziam a uma diminuição do crescimento.

Este ensaio teve como objectivo estudar o efeito do aumento do teor lipídico das dietas na performance de crescimento, eficiência de utilização da dieta, composição corporal e utilização metabólica das dietas.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Dietas experimentais

Foram formuladas quatro dietas experimentais isoproteicas (48% de proteína em base seca) e contendo diferentes teores lipídicos (12, 18, 24 e 30% em base seca), cujas composições e análises químicas são apresentadas na tabela 5.1. As dietas foram preparadas conforme descrito na metodologia geral.

Tabela 5.1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Ingredientes (% matéria seca)				
Farinha de peixe[1]	58,7	58,7	58,7	58,7
CPSP G[2]	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de fígado de bacalhau	4,5	10,5	16,5	22,5
Dextrina amarela	28,3	22,3	16,3	10,3
Complexo vitamínico[3]	0,5	0,5	0,5	0,5
Complexo mineral[4]	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de lenhina	1,0	1,0	1,0	1,0
Óxido de crómio	0,5	0,5	0,5	0,5
Composição química (% matéria seca)				
Matéria seca	88,0	90,8	90,5	91,7
Proteína	48,9	48,5	48,4	47,0
Lípidos	12,3	18,4	24,0	30,9
Cinzas	11,7	12,1	11,7	11,3
Óxido de crómio	0,41	0,41	0,40	0,40
Energia (kJ/g matéria seca)	21,1	22,1	23,2	24,5
PD/ED (mg/kJ)[5]	23,2	21,9	20,9	19,7

[1]Farinha de peixe da Noruega; Proteína: 75%; Lípidos: 11 %.

[2]Concentrado de proteína solúvel de peixe; Proteína: 75%; Lípidos: 24%; Sopropêche, França.

[3 e 4]Composição indicada na tabela 2.1 e 2.2.

[5]Razão entre proteína digestível/energia digestível, calculada de acordo com os coeficientes de digestibilidade da proteína e energia apresentados na tabela 5.3.

5.2.2. Ensaio de crescimento

O ensaio de crescimento decorreu a 25 ± 0,5 °C e teve a duração de 8 semanas. O sistema experimental consistiu em 12 tanques cilíndricos, de 100 litros de capacidade, montados em série, em circuito semi-fechado e termorregulado, conforme descrito na secção 2.2.1. Estabeleceu-se um fluxo contínuo de água filtrada (2 a 3 l/min.) em cada um dos tanques. Durante o ensaio, a salinidade média foi de 33,5 ± 1 ‰ e o fotoperíodo foi o natural para os meses de Junho e Julho.

Após um período de adaptação de 15 dias às condições experimentais, constituíram-se 12 grupos de 25 robalos com peso médio individual de 6,8 g, que foram aleatoriamente distribuídos por cada um dos tanques experimentais. Triplicados destes grupos foram alimentados manualmente, com uma das quatro dietas experimentais, até à saciedade visual, duas vezes por dia (9:00 e 17:00 h). A quantidade de alimento ingerido foi quantificada diariamente. O controlo do peso dos peixes foi realizado em grupo, cada duas semanas e no final do ensaio de crescimento, após um dia de privação de alimento.

Para a análise da composição corporal foram retirados aleatoriamente 10 peixes do lote de peixes inicial e 6 peixes de cada grupo experimental, no final do ensaio. Estes peixes foram pesados individualmente e o peso do fígado e das vísceras foi registado com vista à determinação dos índices hepatossomático e visceral. Os restantes animais, de cada um dos grupos experimentais, continuaram a ser alimentados de forma habitual por mais dois dias. No terceiro dia, 16 horas após a última refeição, procedeu-se à recolha do fígado e do músculo dorsal em 4 peixes de cada tanque, que foram congelados de imediato em azoto líquido para posterior análise.

5.2.3. Ensaio de digestibilidade

No final do ensaio de crescimento, os robalos foram transferidos para outro sistema experimental, onde decorreu o ensaio de digestibilidade. Este sistema era constituído por quatro tanques, montados em série, num circuito semi-fechado e termorregulado a 25 °C, conforme descrito na secção 2.3.1.

Após 15 dias de adaptação às novas condições experimentais, constituíram-se quatro grupos de 25 peixes com peso médio individual de 24,5 g, que foram distribuídos aleatoriamente por cada um dos tanques experimentais. Os robalos foram alimentados à mão, até à saciedade visual, duas vezes ao dia.

O ensaio de digestibilidade foi realizado em três séries. Em cada série, cada uma das dietas experimentais foi atribuída a um grupo experimental diferente. Os primeiros 7 dias foram destinados à adaptação às dietas e, de seguida, as fezes foram recolhidas diariamente durante 15 dias consecutivos. Posteriormente, as dietas eram redistribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais e dava-se início à série seguinte.

5.2.4. Ensaio de metabolismo

No final do ensaio de digestibilidade, os tanques foram cobertos com uma tampa flutuante em acrílico transparente, de modo a impedir a troca gasosa entre o ar e a água. Suprimiu-se a aerificação dos tanques e o fotoperíodo foi ajustado a 24 horas de luz.

Cada um dos grupos experimentais foi alimentado com uma das dietas experimentais, duas vezes ao dia (11:00 e 17:00 h), manualmente, até à saciedade visual, durante 7 dias. Posteriormente, os animais foram pesados em grupo (peso médio individual de 47 g) e, no dia seguinte, iniciou-se o doseamento em contínuo da excreção de amónia e do consumo de oxigénio pós-prandiais, durante três ciclos diários, conforme descrito na metodologia geral. De seguida, os peixes foram privados de alimento durante 8 dias e no nono dia procedeu-se às mesmas determinações metabólicas, durante um ciclo diário.

5.3. Resultados

5.3.1. Ensaios de crescimento e de digestibilidade

O peso médio final dos robalos alimentados com a dieta 24L foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com as dietas 12L e 30L (figura 5.1; tabela 5.2). Contudo, quer o ganho de peso quer a taxa de crescimento específico não diferiram significativamente entre os grupos experimentais (tabela 5.2).

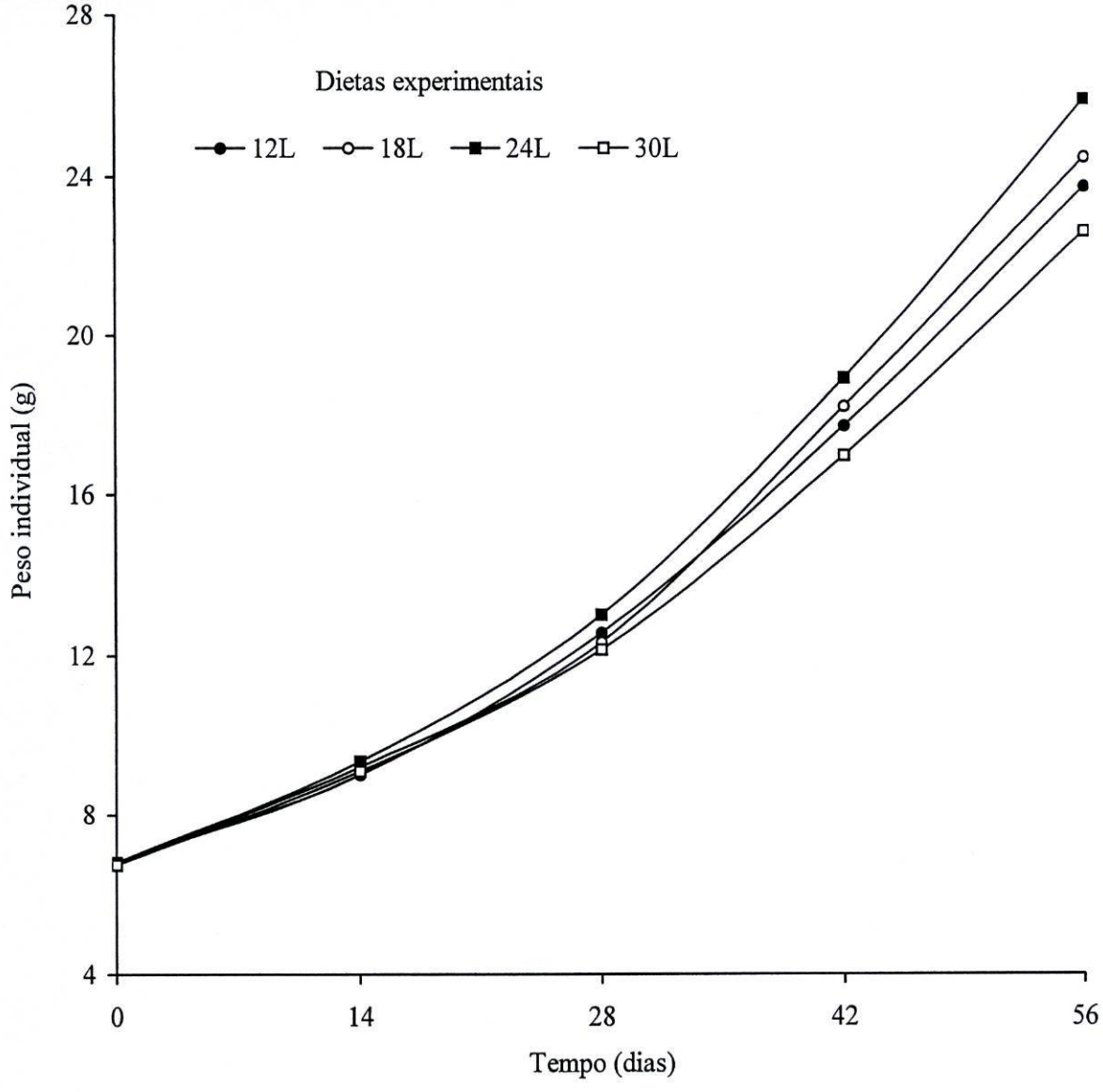


Figura 5.1. Crescimento médio dos robalos alimentados com as dietas experimentais.

A ingestão da dieta 30L (g/kg PM/dia) foi significativamente maior do que a das restantes dietas. A eficiência de conversão alimentar e o coeficiente de eficácia proteica da dieta 30L foram significativamente menores do que os das restantes dietas. Nestas últimas, a eficiência de conversão alimentar não foi estatisticamente diferente entre si e o coeficiente de eficácia proteica da dieta 18L foi significativamente maior do que o da dieta 12L (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Crescimento e eficiência de utilização do alimento nos robalos alimentados com as dietas experimentais[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Peso médio inicial (g)	6,8	6,8	6,8	6,7
Peso médio final (g)	$23,7^{a}$ ±0,9	$24,5^{ab}$ ±0,2	$25,9^{b}$ ±0,3	$22,6^{a}$ ±0,6
Ganho de peso (g/kg PM†/dia)	19,8 ±0,5	20,1 ±0,1	20,9 ±0,1	19,3 ±0,4
Taxa de crescimento específico	2,23 ± 0,07	2,29 ±0,01	2,39 ±0,01	2,16 ±0,04
Alimento ingerido (g/kg PM†/dia)	$24,3^{a}$ ± 0,5	$22,7^{a}$ ±0,1	$24,6^{a}$ ±0,3	$30,9^{b}$ ±1,3
Eficiência de conversão alimentar	$0,82^{b}$ ± 0,02	$0,89^{b}$ ±0,01	$0,85^{b}$ ±0,02	$0,62^{a}$ ±0,10
Coeficiente de eficácia proteica	$1,67^{b}$ ± 0,03	$1,83^{c}$ ±0,01	$1,75^{bc}$ ±0,03	$1,34^{a}$ ±0,08

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

†Peso médio.

Na tabela 5.3 apresentam-se os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas experimentais. Não foram observadas diferenças significativas entre as dietas na digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína. Os CDA dos lípidos foram significativamente maiores nas dietas 24L e 30L do que nas restantes dietas e o CDA da energia da dieta 30L foi significativamente maior do que o das dietas 12L e 18L.

Tabela 5.3. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Matéria seca	83,8 ±0,1	83,1 ±0,2	84,0 ±0,3	83,7 ±0,4
Proteína	95,3 ±0,1	95,1 ±0,1	95,5 ±0,1	95,4 ±0,1
Lípidos	$97,9^{a}$ ±0,1	$98,5^{b}$ ±0,1	$98,8^{c}$ ±0,1	$99,1^{c}$ ±0,1
Energia	$95,8^{a}$ ±0,2	$95,6^{a}$ ±0,1	$96,0^{ab}$ ±0,1	$96,2^{b}$ ±0,1

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

Comparativamente com a composição corporal inicial, no final do ensaio observou-se um aumento do teor em matéria seca, proteína, lípidos e energia dos robalos. No final do ensaio de crescimento, o conteúdo em proteína dos robalos alimentados com a dieta 12L foi significativamente maior do que nos outros grupos. O conteúdo em lípidos e energia foi significativamente menor nos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L do que nos outros grupos (tabela 5.4).

Os índices hepatossomático e visceral dos robalos foram mais elevados no final do que no início do ensaio (tabela 5.4). O índice hepatossomático dos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas. O índice visceral foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta 24L do que com as restantes dietas. O conteúdo em glicogénio hepático (% peso fresco do fígado ou g/100g de peixe) foi significativamente maior nos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L do que nos restantes grupos. O conteúdo lipídico do fígado (% peso fresco do fígado) foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta 24L do que com as restantes dietas, entre as quais não se verificaram diferenças significativas. Porém, quando expresso em g/100g peixe, o conteúdo em lípidos hepáticos não diferiu significativamente entre os grupos experimentais. Não se registaram diferenças significativas no teor lipídico do músculo dorsal entre os grupos experimentais (tabela 5.4).

A utilização do azoto, da energia e dos lípidos das dietas experimentais apresenta-se na tabela 5.5. A ingestão azotada (g/kg PM/dia) foi significativamente maior com a dieta 30L do que com as restantes dietas, entre as quais não se verificaram diferenças significativas. No entanto, a retenção azotada, em percentagem do azoto ingerido, foi significativamente menor com a dieta 30L do que com as restantes dietas.

A ingestão de energia (kJ/kg PM/dia) foi idêntica nos grupos alimentados com as dietas 12L e 18L e aumentou significativamente com o aumento do conteúdo lipídico, nas restantes dietas. A retenção energética (% energia ingerida) aumentou com o aumento do teor lipídico da dieta até 24%, mas na dieta com 30% de lípidos foi significativamente menor do que nas restantes dietas.

A ingestão lipídica (g/kg PM/dia) variou na razão directa do teor lipídico das dietas. A retenção lipídica (g/kg PM/dia) aumentou significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24%. Para a dieta 30L, a retenção diária de lípidos não diferiu das dietas 18L e 24L. A retenção lipídica (% lípidos ingeridos) variou de modo inverso ao do teor lipídico das dietas. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais na contribuição da energia proteica para o metabolismo energético total (tabela 5.5).

Tabela 5.4. Composição corporal dos robalos (% matéria fresca) no início e no final do ensaio de crescimento[1].

		Dietas			
	Inicial	12L	18L	24L	30L
Matéria seca	27,1	$32,2^{a}$ ±0,7	$32,6^{a}$ ±0,5	$34,9^{b}$ ±0,2	$33,9^{ab}$ ±0,5
Proteína	15,2	$17,2^{b}$ ±0,2	$16,6^{a}$ ±0,2	$16,3^{a}$ ±0,1	$16,4^{a}$ ±0,1
Lípidos	7,3	$11,7^{a}$ ±0,6	$12,7^{a}$ ±0,4	$14,9^{b}$ ±0,1	$14,2^{b}$ ±0,5
Cinzas	4,9	4,1 ±0,1	3,9 ±0,2	4,3 ±0,1	4,0 ±0,1
Energia (kJ/g)	6,0	$8,2^{a}$ ±0,2	$8,6^{a}$ ±0,2	$9,6^{b}$ ±0,1	$9,2^{b}$ ±0,2
Índice hepatossomático	1,6	$2,8^{b}$ ±0,1	$2,5^{b}$ ±0,1	$2,1^{a}$ ±0,1	$2,0^{a}$ ±0,1
Índice visceral	7,7	$10,3^{a}$ ±0,1	$10,8^{a}$ ±0,2	$12,7^{c}$ ±0,4	$11,7^{b}$ ±0,2
Glicogénio hepático					
(% peso fresco do fígado)	—	$6,2^{c}$ ±0,1	$6,3^{c}$ ±0,1	$4,1^{a}$ ±0,2	$5,0^{b}$ ±0,1
(g/100g peixe)	—	$0,16^{b}$ ±0,00	$0,16^{b}$ ±0,00	$0,09^{a}$ ±0,01	$0,10^{a}$ ±0,00
Lípidos hepáticos					
(% peso fresco do fígado)	—	$20,8^{a}$ ±0,1	$21,1^{a}$ ±0,9	$25,7^{b}$ ±0,8	$21,9^{a}$ ±0,5
(g/100g peixe)	—	0,55 ±0,01	0,53 ±0,02	0,58 ±0,04	0,46 ±0,02
Lípidos musculares					
(% peso fresco do músculo)	—	1,57 ±0,16	1,68 ±0,17	1,83 ±0,20	1,74 ±0,22

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Tabela 5.5. Eficiência de utilização do azoto, da energia e dos lípidos das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Azoto				
Ingestão (g/kg PM†/dia)	$1,9^{a}$ ±0,0	$1,8^{a}$ ±0,0	$1,9^{a}$ ±0,0	$2,3^{b}$ ±0,1
Retenção (g/kg PM†/dia)	0,57 ±0,02	0,55 ±0,01	0,56 ±0,01	0,53 ±0,01
Retenção (% ingerido)	$30,1^{b}$ ±0,4	$31,3^{b}$ ±0,5	$29,3^{b}$ ±0,7	$22,7^{a}$ ±1,2
Energia				
Ingestão (kJ/kg PM†/dia)	$512,1^{a}$ ±10,6	$503,1^{a}$ ±2,8	$571,1^{b}$ ±7,5	$757,6^{c}$ ±33,8
Retenção (kJ/kg PM†/dia)	$180,1^{a}$ ±1,1	$192,8^{ab}$ ±1,4	$227,5^{c}$ ±0,9	$204,8^{b}$ ±1,3
Retenção (% ingerido)	$35,1^{b}$ ±1,1	$38,3^{bc}$ ±1,4	$39,8^{c}$ ±0,9	$27,1^{a}$ ±1,3
Lípidos				
Ingestão (g/kg PM†/dia)	$2,9^{a}$ ±0,0	$3,8^{ab}$ ±0,4	$5,3^{b}$ ±0,5	$8,5^{c}$ ±1,2
Retenção (g/kg PM†/dia)	$2,7^{a}$ ±0,2	$3,0^{ab}$ ±0,1	$3,7^{c}$ ±0,1	$3,3^{bc}$ ±0,1
Retenção (% ingerido)	$89,1^{c}$ ±4,9	$71,3^{b}$ ±2,5	$62,2^{b}$ ±0,5	$34,8^{a}$ ±1,8
P/E (%)[2]	53,4 ±0,3	53,3 ±1,6	53,8 ±0,7	46,8 ±3,3

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[2]Proporção da energia proteica despendida no metabolismo energético total, estimada com base na análise da composição da carcaça.

†Peso médio.

5.3.2. Ensaio de metabolismo

A evolução pós-prandial da excreção de amónia foi idêntica para as diferentes dietas experimentais (figura 5.2). A excreção de amónia aumentou gradualmente após a primeira refeição, atingindo um pico passado 2 a 3 horas. De seguida, diminuiu até à altura em que os animais foram de novo alimentados. Em seguida, a excreção de amónia aumentou novamente, atingindo um segundo pico, de maior amplitude que o primeiro, 8 a 9 horas após a primeira refeição. Posteriormente diminuiu gradualmente, tendo estabilizado por volta das 20 horas após a primeira refeição. Apesar do perfil de excreção de amónia ser idêntico para todas as dietas experimentais, a amplitude dos picos de excreção foi menor nas dietas com maior teor lipídico.

Em valores absolutos, a excreção de amónia (g/kg PM/dia) diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas (tabela 5.6). Quando expressa em percentagem do azoto ingerido, a excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L foi semelhante e significativamente maior do que a dos robalos alimentados com as restantes dietas.

No nono dia de jejum, a excreção de amónia não apresentou grandes oscilações durante o dia, tendo variado entre 131 e 148 mg/ kg PM/dia (tabela 5.6).

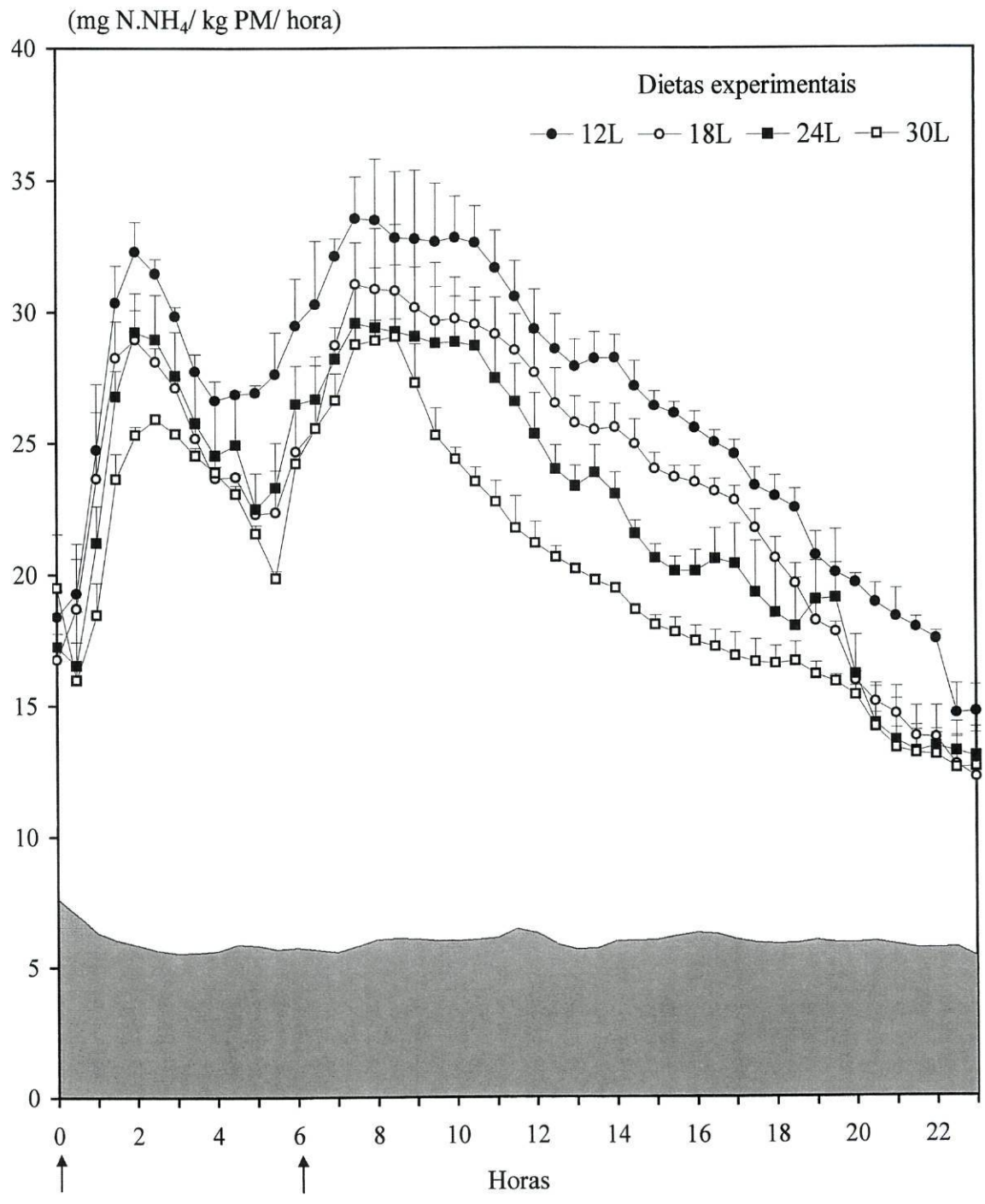


Figura 5.2. Perfil diário da excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum (área a sombreado). As setas indicam as refeições. Valores médios ± erro padrão.

Tabela 5.6. Excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Pós-prandial				
(mg $N.NH_4$/kg PM[†]/dia)	$636,2^{c}$ ±22,2	$570,4^{b}$ ±16,8	$541,7^{ab}$ ±25,0	$494,2^{a}$ ±3,7
(% azoto ingerido)	$46,2^{c}$ ±1,19	$44,0^{c}$ ±0,4	$36,7^{b}$ ±1,0	$28,5^{a}$ ±0,3
Jejum				
(mg $N.NH_4$/kg PM[†]/dia)	139,4	148,2	140,8	131,8

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[†]Peso médio.

O perfil diário do consumo de oxigénio dos robalos alimentados com as diferentes dietas experimentais ou em jejum é apresentado na figura 5.3. O consumo de oxigénio pós-prandial evoluiu de modo idêntico nos diferentes grupos experimentais. O consumo de oxigénio aumentou imediatamente após a primeira refeição, atingindo um pico passado 1 a 2 horas. De seguida, diminuiu até ao momento da segunda refeição, a partir da qual aumentou novamente para um novo pico, atingido 1 hora depois. Posteriormente diminuiu gradualmente até às 17 - 18 horas após a primeira refeição e estabilizou, de seguida, até ao momento da nova ingestão.

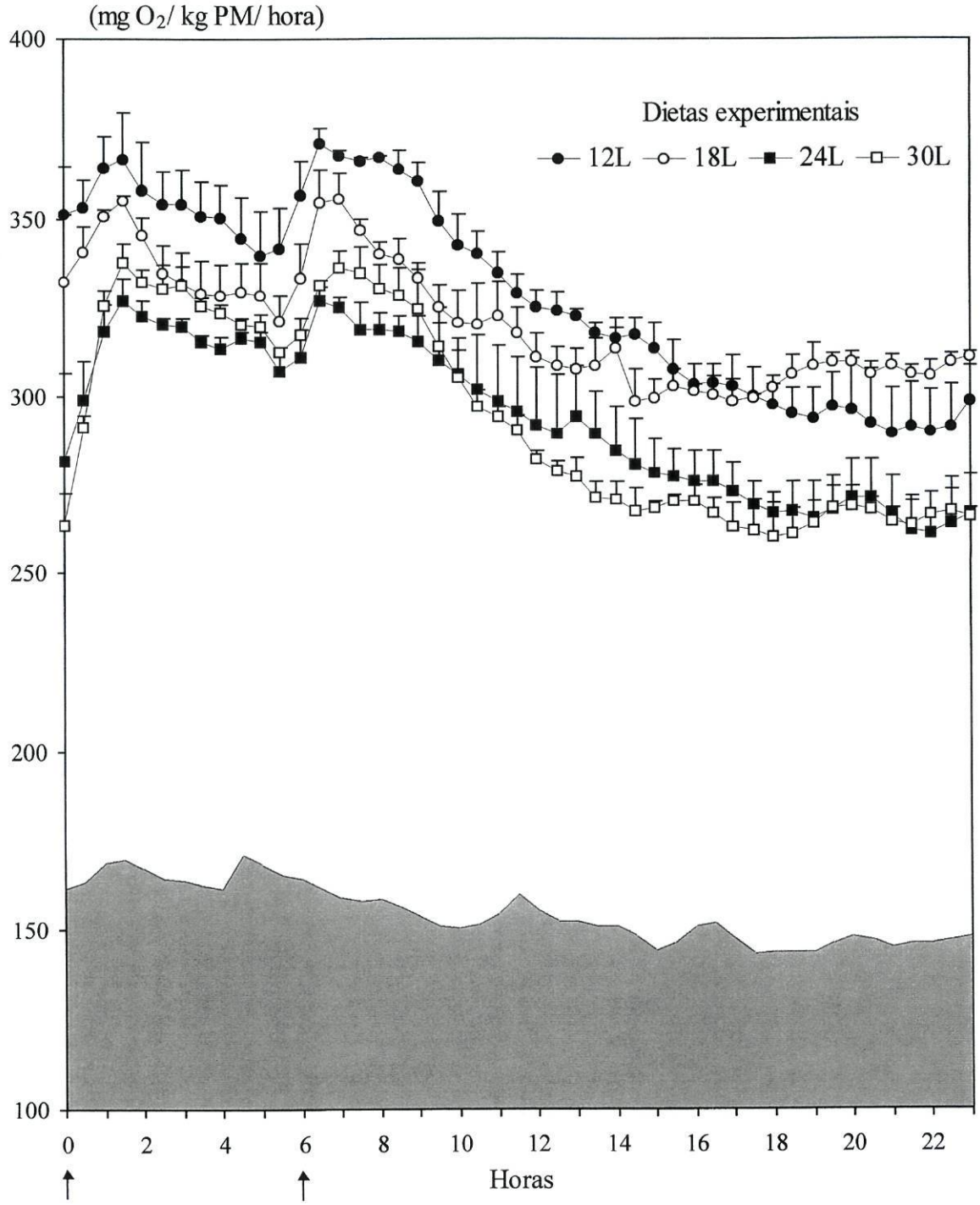


Figura 5.3. Perfil diário do consumo de oxigénio dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum (área a sombreado). As setas indicam as refeições. Valores médios ± erro padrão.

Em valores absolutos, o consumo de oxigénio (g/kg PM/dia) dos robalos alimentados com as dietas 12L e 18L foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com as dietas 24L e 30L (tabela 5.7). Nos robalos mantidos em jejum, o consumo de oxigénio variou entre 3,7 e 3,9 (g/kg PM/dia), tendo apresentado pequenas flutuações diárias.

O incremento calórico (kJ/kg PM/dia) diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24%. Quando expresso por grama de azoto ingerido, o incremento calórico diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 18 para 30% (tabela 5.7).

Tabela 5.7. Consumo de oxigénio e incremento calórico dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Consumo de oxigénio				
Pós-prandial				
(g O_2/kg PM[†]/dia)	$7,9^{b}$ ±0,1	$7,7^{b}$ ±0,1	$7,1^{a}$ ±0,1	$7,0^{a}$ ±0,1
Jejum				
(g O_2/kg PM[†]/dia)	3,7	3,9	3,7	3,8
Incremento calórico				
(kJ/kg PM[†]/dia)	$57,3^{c}$ ±2,0	$51,8^{b}$ ±1,0	$45,9^{a}$ ±2,0	$44,7^{a}$ ±1,0
(kJ/g azoto ingerido)	$41,6^{c}$ ±0,3	$40,1^{c}$ ±0,9	$31,1^{b}$ ±1,2	$25,8^{a}$ ±0,7

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[†]Peso médio.

Com base nos dados do ensaio de metabolismo e na digestibilidade aparente das dietas experimentais estimaram-se os balanços azotado e energético, que se apresentam nas tabelas 5.8 e 5.9, respectivamente.

A ingestão azotada (g/kg PM/dia) dos robalos alimentados com a dieta 18L foi significativamente menor do que a dos robalos alimentados com as dieta 24L e 30L. As perdas azotadas urinárias e branquiais diminuíram significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 18 para 30%. A retenção azotada (% azoto ingerido) promovida pelas dietas 12L e 18L foi idêntica, enquanto que para as restantes dietas aumentou com o aumento do teor lipídico das dietas (tabela 5.8).

Tabela 5.8. Balanços azotados dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base nos dados do ensaio de metabolismo)[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Azoto ingerido (g/kg PM[†]/dia)	$1,38^{ab}$ ±0,05	$1,29^{a}$ ±0,04	$1,48^{b}$ ±0,04	$1,73^{c}$ ±0,01
Azoto fecal (% NI)	4,7 ±0,1	4,9 ±0,0	4,5 ±0,1	4,6 ±0,1
Azoto urinário e branquial (% NI)	$53,2^{c}$ ±1,4	$50,7^{c}$ ±0,5	$42,2^{b}$ ±1,1	$32,8^{a}$ ±0,4
Azoto retido (% NI)	$42,1^{a}$ ±1,5	$44,4^{a}$ ±0,4	$53,3^{b}$ ±1,1	$62,6^{c}$ ±0,4

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[†]Peso médio.

NI: azoto ingerido.

Tabela 5.9. Balanços energéticos dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base nos dados do ensaio de metabolismo)[1].

	Dietas			
	12L	18L	24L	30L
Energia ingerida (kJ/kg PM[†]/dia)	371,6[a] ±14,7	369,4[a] ±11,8	442,2[b] ±13,8	565,7[c] ±3,1
Energia digestível (% EI)	95,8 ±0,2	95,7 ±0,1	96,1 ±0,0	96,0 ±0,2
Energia metabolizável (% EI)	90,9[a] ±0,3	91,2[a] ±0,1	92,6[b] ±0,1	93,5[c] ±0,2
Energia líquida (% EI)	75,5[a] ±0,2	77,2[a] ±0,4	82,2[b] ±0,5	85,6[c] ±0,4
Energia retida (% EI)	61,9[a] ±0,7	63,6[a] ±0,8	70,8[b] ±0,7	76,8[c] ±0,5
Perdas fecais e metabólicas				
Energia fecal (% EI)	4,2 ±0,2	4,3 ±0,1	3,9 ±0,0	4,0 ±0,2
Energia urinária e branquial (% EI)	4,9[d] ±0,1	4,4[c] ±0,0	3,5[b] ±0,1	2,5[a] ±0,0
Perdas de calor				
Produção de calor (% EI)	29,0[c] ±0,7	28,4[c] ±0,7	21,7[b] ±0,6	16,9[a] ±0,2
Incremento calórico (% EI)	15,4[d] ±0,1	14,0[c] ±0,3	10,4[b] ±0,4	7,9[a] ±0,2
Energia de manutenção (% EI)	13,5[d] ±0,6	13,6[c] ±0,4	11,4[b] ±0,4	8,9[a] ±0,0

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[†]Peso médio.

EI: energia ingerida.

A ingestão diária de energia (kJ/kg PM/dia) aumentou significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 28 para 30%. As dietas 12L e 18L promoveram menor energia metabolizável, líquida e disponível para ser retida do que as restantes dietas. Nestas últimas estes três parâmetros aumentam com o aumento do teor lipídico das dietas (tabela 5.9).

As perdas de energia urinária e branquial diminuíram significativamente com o aumento da incorporação lipídica das dietas e a produção de calor diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 18 para 30%. O incremento calórico e a energia de manutenção diminuíram significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas (tabela 5.9).

5.4. Discussão

Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas tecnologias de fabrico dos alimentos compostos, a comercialização de dietas para salmonídeos com elevado teor lipídico (superior a 26%) tornou-se uma realidade. Estas dietas de alta energia provaram melhorar a eficiência de utilização do alimento sem, contudo, afectar negativamente a performance de crescimento (Alsted e Jokumsen, 1990; Alsted, 1991; Johnsen e Wandsvik, 1991; Kiaerskou, 1991; Johnsen et al., 1993; Company et al., 1999). No presente estudo, o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24% não afectou significativamente o crescimento ou a utilização do alimento nos robalos, mas o aumento do teor lipídico até 30% diminuiu a eficiência de utilização do alimento, sem afectar significativamente o crescimento. Esta ausência de efeitos benéficos do aporte suplementar de lípidos nas dietas está em concordância com resultados anteriores para o robalo (Métailler et al., 1981; Tibaldi et al., 1991; Morales e Oliva-Teles, 1995; Lanari et al., 1998) e outras espécies marinhas (Kissil e Gropp, 1984; Marti-Palanca et al., 1996; Catacutan e Coloso, 1995; 1997). De acordo com Dias et al. (1998), no robalo o efeito benéfico do aumento do teor lipídico das dietas de 10 para 18%, só foi significativo nas dietas de baixo teor proteico (40%) e não em dietas com elevado teor proteico (50%).

O conteúdo em energia digestível da dieta é considerado um factor determinante na regulação da ingestão do alimento nos peixes, tal como nos animais homeotérmicos (Kaushik

e Luquet, 1984; Boujard e Médale, 1994; Kaushik e Médale, 1994; Paspais e Boujard, 1996). No entanto, no presente estudo a ingestão voluntária de alimento não foi estatisticamente afectada pelo aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24%, ou seja, a ingestão de alimento parece ter sido melhor regulada pela quantidade de proteína ingerida do que pela quantidade de energia ingerida. No trabalho descrito no capítulo anterior foi observada uma tendência similar. Estes resultados parecem indicar que, dentro de certos limites, os robalos regulam a ingestão de proteína de modo a satisfazer as necessidades para o crescimento máximo, as quais rondariam as 10 - 11 g de proteína digestível/kg peso vivo/dia, valor da mesma ordem de grandeza do estimado no capítulo anterior.

A taxa de ingestão dos robalos alimentados com a dieta 30L foi, porém, significativamente maior do que a das restantes dietas. Este resultado parece reflectir uma situação de hiperfagia em animais alimentados com dietas de elevado conteúdo em energia digestível, um fenómeno ainda não claramente demonstrado nos peixes (Kaushik, 1996 b).

Diversos estudos têm demonstrado que as dietas ricas em lípidos induzem modificações na composição corporal, tanto no robalo (Alliot et al., 1979 a, Ballestrazzi et al., 1998; Dias, 1999) como noutras espécies de peixes (Takeuchi et al., 1978b; 1981; Watanabe, 1982; Greene e Selivonchick, 1987; Ellis e Reigh, 1991; Arzel et al., 1994; Weatherup et al., 1997). No presente trabalho, também se observou um aumento significativo do conteúdo lipídico do peixe inteiro com o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24%. No entanto, o aumento do teor lipídico da dieta para 30% não aumentou mais o conteúdo lipídico do peixe. Resultados idênticos foram observados na truta arco-íris por Cho e Watanabe (1985). Ainda neste estudo, o nível lipídico das dietas mais elevado não era o que promovia a retenção lipídica mais elevada.

O aumento da deposição lipídica no peixe inteiro reflecte-se num aumento do teor lipídico de diferentes tecidos, nomeadamente do fígado, do músculo e das vísceras, cuja magnitude varia de espécie para espécie (Sheridan, 1988, 1994). No presente estudo, os lípidos foram depositados principalmente nas vísceras, como se pode deduzir pelo aumento do índice visceral e dos lípidos hepáticos quando o teor lipídico da dieta aumentou de 12 para 24% e pelo facto de os lípidos musculares não terem sido afectados pelo teor lipídico das dietas. Resultados semelhantes foram descritos por McClelland et al. (1995), que verificaram que o robalo armazenava os lípidos essencialmente fora do tecido muscular, particularmente no

fígado e no tecido adiposo. No caso da truta arco-íris, por exemplo, o perfil de distribuição dos depósitos lipídicos é bastante diferente do observado neste estudo. Um aumento do teor lipídico da dieta de 8 para 18% induziu um aumento significativo do teor lipídico das vísceras, um aumento moderado dos lípidos musculares e não afectou o teor dos lípidos hepáticos (Takeuchi et al., 1978b).

O conteúdo lipídico hepático variou entre 21 - 25% do peso fresco do fígado e, extrapolando para um peixe de 100g, os lípidos hepáticos representavam em média 0,5% do peso vivo. Este elevado teor de lípidos hepáticos já foi anteriormente referido em robalos de aquacultura (McClelland et al., 1995; Dias et al., 1998). Os valores do índice hepatossomático observados neste estudo (2-3%) são idênticos aos encontrados no trabalho apresentado no capítulo anterior e aos referidos por outros autores nesta espécie (Ballestrazzi et al., 1994; Dias, 1999), estando, também, positivamente correlacionados com o teor em glicogénio hepático ($r = 0,87$). O conteúdo em glicogénio hepático parece estar correlacionado com o nível de hidratos de carbono da dieta. Esta correlação positiva entre os hidratos de carbono da dieta e o glicogénio hepático foi também observada em salmonídeos (Hilton et al., 1982; Kim e Kaushik, 1992).

O aumento do teor de energia digestível das dietas, devido a um maior aporte lipídico, relevou ser de singular importância no aumento da eficiência de utilização da proteína, na truta arco-íris (Atherton e Aikten, 1970; Watanabe, 1977; Reinitz et al., 1978; Takeuchi et al., 1978b; Watanabe et al., 1979; Reinitz e Hitzel, 1980; Garcia-Gallego et al., 1981; Beamish e Medland, 1986; Robert et al., 1993), no salmão prateado (Clarke et al., 1982), no salvelino-árctico (*Salvelinus alpinus*; Tabachek, 1986), na enguia (Garcia-Gallego et al., 1993) e na dourada (Vergara et al., 1996). Contudo, no presente estudo não se observou um efeito significativo do aporte suplementar em lípidos na utilização da proteína. A contribuição da energia proteica para o metabolismo energético também não foi significativamente afectada pelo aumento do teor de energia digestível das dietas. Isto indica que, pelo menos no intervalo testado, o robalo não utilizou o aumento de energia proporcionada pelos lípidos para economizar a proteína da dieta para fins de crescimento. Resultados semelhantes foram anteriormente descritos para o robalo (Lanari et al., 1998) e para o robalo asiático (Catacutan e Coloso, 1995; 1997).

O aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24% melhorou significativamente a utilização da energia, o que está de acordo com resultados obtidos anteriormente para o robalo (Morales e Oliva-Teles, 1995; Dias et al., 1998; Lanari et al., 1998). A retenção lipídica (% lípidos ingeridos) diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas, sugerindo que uma proporção maior de lípidos foi usada como fonte de energia ou que poderá ter ocorrido a conversão dos hidratos de carbono da dieta em lípidos nas dietas de menor teor lipídico.

Neste estudo, o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das proteínas foi elevado e similar ao descrito no capítulo anterior. O CDA das proteínas não foi afectado pelo teor lipídico das dietas, conforme também observado na truta arco-íris (Watanabe, 1977; Corraze, 1994). A digestibilidade aparente dos lípidos foi bastante elevada e da mesma ordem de grandeza da indicada anteriormente para o robalo (Dias, 1999). O CDA dos lípidos aumentou significativamente com o aumento da incorporação lipídica nas dietas. Na truta arco-íris, o CDA dos lípidos mostrou ser independente do nível lipídico das dietas (Takeuchi et al., 1978b) porém, no esturjão o CDA dos lípidos diminuiu significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas (Médale et al., 1991b).

De um modo geral, os melhores resultados foram obtidos com a dieta que incluiu 18% de lípidos, o que corresponde a um quociente entre proteína digestível / energia digestível (PD/ED) de 21-22 mg/kJ. Este valor é mais baixo do que o proposto anteriormente para esta espécie (25 a 30 mg/kJ; Alliot et al., 1979 a; Métailler et al., 1981; Spyridakis, 1989; Tibaldi et al., 1991) mas só ligeiramente mais elevado do que o sugerido por Dias et al. (1998) (19-20 mg/kJ).

O perfil diário de excreção de amónia foi muito semelhante ao observado no trabalho descrito no capítulo anterior, não tendo sido afectado pela composição das dietas experimentais, conforme o observado para a truta arco-íris (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Médale et al., 1995). Pelo contrário, Jayaram e Beamish (1992) verificaram que quando a truta-de-lago-americana (*Salvelinus namaycush*) era alimentada com uma dieta rica em lípidos, o aumento da excreção de amónia era mais lento e o pico de excreção era atingido mais tardiamente do que quando era alimentada com uma dieta de baixo teor lipídico.

No presente trabalho, foi observada uma redução significativa da excreção de amónia e do consumo de oxigénio quando o teor lipídico das dietas aumentou de 12 para 30%. A informação disponível sobre o efeito do teor lipídico das dietas na excreção de amónia e no consumo de oxigénio está limitada praticamente às espécies dulciaquícolas. Estes estudos também mostraram que o aumento do teor lipídico das dietas conduz a uma diminuição significativa das perdas azotadas metabólicas (Watanabe et al., 1987b; Kaushik, 1990c; Alsted, 1991; Johnsen e Wandsvik, 1991; Jayaram e Beamish, 1992; Johnsen et al., 1993) e do consumo de oxigénio (Tandler e Beamiah, 1980, 1981; Cho, 1982; LeGrow e Beamish, 1986; Ross et al., 1992; Brauge, 1994). Tais resultados são, possivelmente, consequência da diminuição da utilização da proteína da dieta para fins energéticos, resultando numa menor desaminação dos aminoácidos e, portanto, numa menor excreção de amónia e num menor consumo de oxigénio, uma vez que o custo metabólico da utilização proteica é superior ao dos lípidos ou dos hidratos de carbono (Tandler e Beamish, 1981). Com efeito, para o mesmo teor proteico, o aumento do teor lipídico da dieta induz a diminuição do consumo de oxigénio por unidade de azoto ingerido (Cho et al., 1976; Cho, 1982).

A diminuição do incremento calórico (% energia ingerida) com o aumento do teor lipídico das dietas está de acordo com o observado por outros autores (Tandler e Beamish, 1980, Cho, 1982; Medland e Beamish, 1985). Contrariamente a estes resultados, em espécies omnívoras verificou-se que o incremento calórico (% energia ingerida) era independente do nível de energia ingerida (Chakraborty et al., 1992 b; Ross et al., 1992). Esta variação de resultados pode ser atribuída a diferenças na estrutura e fisiologia digestiva, assim como à composição da dieta, nomeadamente ao seu teor proteico. Conforme demonstrado por Cho (1982) na truta arco-íris, o incremento calórico (% energia ingerida) é fortemente influenciado pelo nível lipídico das dietas quando o teor proteico da dieta é baixo (36 % proteína digestível), mas não quando é alto (47 % proteína digestível).

Tal como no trabalho anterior, as retenções azotada e energética, estimadas com base nos dados do ensaio de crescimento, são consideravelmente mais baixas do que quando estimadas com base nos dados do ensaio de metabolismo. Para além disso, com base nos dados do metabolismo, a percentagem do azoto ingerido disponível para ser retido aumentou significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas de 18 para 24%. No entanto, no ensaio de crescimento não foram observadas diferenças significativas na retenção azotada (% azoto ingerido) nos robalos alimentados com estas dietas. Estas diferenças podem estar

relacionadas, pelo menos em parte, com a menor ingestão de alimento no ensaio de metabolismo, que poderá ter resultado numa melhor utilização da proteína, potenciando as diferenças entre as dietas.

Com excepção da dieta 30L, a influência do teor lipídico da dieta na retenção energética (% energia ingerida) apresentou a mesma tendência no ensaio de crescimento e no de metabolismo. O aumento da retenção energética com o aumento do teor lipídico das dietas deve-se essencialmente à diminuição da perda de calor e, em menor extensão, à redução das perdas de energia urinária e branquial.

Os resultados deste estudo indicam que o aumento do teor lipídico das dietas de 12 para 24% não melhorou as performances de crescimento ou a eficiência de utilização das dietas. O aporte suplementar de lípidos não afectou a eficiência de utilização da proteína das dietas, tendo, no entanto, aumentado significativamente a retenção energética. A inclusão de 30% de lípidos, apesar de não ter afectado o crescimento, reduziu significativamente a eficiência de retenção da proteína e da energia.

6. Efeito da Disponibilidade dos Hidratos de Carbono da Dieta

6.1. Introdução

Os hidratos de carbono são, na generalidade, a fonte energética de maior importância na alimentação dos animais domésticos. Para os peixes, nomeadamente os marinhos, o valor nutritivo dos hidratos de carbono ainda é questionável, apesar de ser de todo o interesse a sua incorporação nas dietas uma vez que as fontes destes nutrientes são abundantes e economicamente atractivas (Wilson, 1994; Pfeffer, 1995).

No seu habitat natural, os peixes têm acesso limitado aos hidratos de carbono pelo que não estão bem adaptados, em termos digestivos e metabólicos, a dietas com altos teores de hidratos de carbono (Guillaume, 1995). A utilização digestiva dos hidratos de carbono está associada à sua natureza e complexidade da molécula (Furuichi e Yone, 1971; Bergot, 1979a; Spannhof e Plantikow, 1983; Lin et al., 1997; Hutchins et al., 1998), ao nível de inclusão nas dietas (Pieper e Pfeffer, 1979; Rychly e Spannhof, 1979; Bergot e Brèque, 1983; Spannhof e Plantikow, 1983; Hofer e Sturmbauer, 1985; Hemre et al., 1989), bem como aos tratamentos tecnológicos aplicados, tais como a gelatinização e a extrusão (Bergot e Brèque, 1983). Em termos metabólicos, os peixes têm uma incapacidade relativa de metabolizar a glucose. As dietas com altos níveis de hidratos de carbono digestíveis provocam hiperglicémia pós-prandial que persiste por várias horas (Bergot, 1979b; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Brauge et al., 1994).

A eficiência de utilização dos hidratos de carbono difere entre as diversas espécies de peixe. Existem dados demonstrativos de que a carpa (Shimeno et al., 1977, 1981; Takeuchi et al., 1979b; Furuichi e Yone, 1980, 1982a), o peixe gato (Garling e Wilson, 1977) e a tilápia (Anderson et al., 1984; El-Sayed e Garling, 1988; Shiau e Peng, 1993) utilizam melhor os hidratos de carbono do que os salmonídeos (Atkinson e Hilton, 1981) ou os peixes marinhos (Alliot et al., 1979a; Furuichi e Yone, 1980, 1982a, 1986; Métailler et al., 1981). Na truta arco-íris, o amido gelatinizado é uma fonte energética tão eficaz quanto os lípidos (Pieper e Pfeffer, 1979). Em geral, níveis inferiores a 25% de amido gelatinizado ou dextrina parecem ser eficientemente utilizados pela truta arco-íris (Lee e Putnam, 1973). Para o robalo, foi demonstrado que a incorporação de 11 a 18 % da dieta em amido gelatinizado contribuiu para economizar as proteína da dieta para fins de crescimento

(Métailler et al., 1981; Spyridakis et al., 1986; Hidalgo e Alliot, 1988). Mais recentemente, Gouveia et al. (1995) referem que a incorporação de 25% de amido gelatinizado não afecta negativamente o crescimento ou a utilização do alimento no robalo, enquanto que Lanari et al. (1999) sugerem que os níveis de hidratos de carbono digestíveis não devem ultrapassar os 20% da dieta.

Um outro aspecto a considerar relativamente à eficiência de utilização dos hidratos de carbono diz respeito ao grau de gelatinização do amido da dieta. Com efeito, segundo alguns autores a utilização efectiva dos hidratos de carbono é condicionada pela razão entre o amido gelatinizado e o amido cru da dieta. A título de exemplo, para a truta arco-íris alimentada com uma dieta com 30% de amido, os melhores resultados de crescimento e utilização do alimento foram encontrados quando a razão entre o amido gelatinizado/amido cru da dieta atingiu os 40% (Jeong et al., 1992a). Para a carpa alimentada com uma dieta com 40% de amido, o crescimento máximo foi atingido quando a razão entre o amido gelatinizado / amido cru da dieta rondou os 20% (Jeong et al., 1992b).

O presente trabalho tem como objectivo estudar a utilização dos hidratos de carbono sob a forma de amido cru e gelatinizado como fonte energética pelo robalo.

6.2. Material e métodos

6.2.1. Dietas experimentais

Foram formuladas três dietas isoproteicas (48 % em base seca) e isolipídicas (12 % em base seca), contendo 25 % de amido cru, 25 % de amido gelatinizado ou 12,5 % de amido cru + 12,5 % de amido gelatinizado. Foi também formulada uma dieta isenta de hidratos de carbono, com 64% proteína e 18% lípidos (em base seca). As dietas foram preparadas conforme descrito na metodologia geral e as suas composições e análises químicas são apresentadas na tabela 6.1.

Tabela 6.1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Ingredientes (% matéria seca)				
Farinha de peixe[1]	60,6	60,6	60,6	81,4
CPSP G[2]	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de fígado de bacalhau	5,9	5,9	5,9	10,1
Amido cru	25,0	12,5	—	—
Amido gelatinizado	—	12,5	25,0	—
Complexo vitamínico[3]	0,5	0,5	0,5	0,5
Complexo mineral[4]	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de lenhina	1,0	1,0	1,0	1,0
Óxido de crómio	0,5	0,5	0,5	0,5
Composição química (% matéria seca)				
Matéria seca	91,1	88,9	89,4	89,5
Proteína	51,4	49,6	49,3	62,7
Lípidos	11,1	11,7	12,2	17,5
Cinzas	14,1	13,6	13,6	17,2
Amido	26,8	28,3	26,9	—
Óxido de crómio	0,40	0,42	0,41	0,41
Energia (kJ/g matéria seca)	20,3	20,9	20,7	22,6
PD/ED (mg/kJ)[5]	26,4	24,1	23,9	28,1

[1]Farinha de peixe da Noruega; Proteína: 74,7%; Lípidos: 8,4%.

[2]Concentrado de proteína solúvel de peixe; Proteína: 75,1%; Lípidos: 21,4% ; Sopropêche, França.

[3 e 4]Composição indicada na tabela 2.1 e 2.2.

[5]Razão entre proteína digestível/energia digestível, calculada de acordo com os coeficientes de digestibilidade da proteína e energia apresentados na tabela 6.3.

6.2.2. Ensaio de crescimento

O ensaio de crescimento teve uma duração de 10 semanas e decorreu num sistema experimental constituído por 12 tanques cilíndricos de 100 litros de capacidade, montados em série, num circuito semi-fechado e termorregulado a 25 ± 0,5 °C, conforme descrito na metodologia geral (secção 2.2.1). Durante o ensaio, a salinidade média foi de 32 ± 1 ‰ e o fotoperíodo foi o natural para os meses de Fevereiro a Abril.

Depois de duas semana de adaptação às condições experimentais, constituíram-se 12 grupos de 25 robalos com peso médio inicial de 5,9 g, que foram distribuídos aleatoriamente por cada um dos tanques. A triplicados destes grupos foi atribuída uma das dietas experimentais. Os robalos foram alimentados manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia (9:00 e 17:00 h). Os robalos foram pesados em grupo e contados todas as duas semanas e no final do período experimental, após um dia jejum. O alimento ingerido foi quantificado diariamente.

No início do ensaio foram retirados aleatoriamente 10 peixes do lote de peixes inicial e no final foram retirados 6 peixes de cada grupo experimental, para posterior análise da composição corporal. O peso destes peixes e das respectivas vísceras e fígado foi quantificado com vista à determinação dos índices visceral e hepatossomático.

Os restantes animais de cada grupo experimental continuaram a ser alimentados da forma habitual por mais três dias, de modo a recuperarem do maneio da pesagem. Dezasseis horas após a última refeição, foram efectuadas colheitas de sangue, músculo e fígado em 4 robalos de cada grupo experimental. A colheita de sangue foi efectuada por punção venosa caudal, com seringas heparinizadas, seguida de centrifugação imediata e congelação do plasma a –20 °C para posterior análise. O fígado foi recolhido, pesado e congelado a –70 °C para análise posterior. As amostras de músculo foram colhidas da área dorso-lateral do corpo, posterior à barbatana dorsal e congelado a –70 °C para análise.

6.2.3. Ensaio de digestibilidade

No final do ensaio de crescimento os peixes foram transferidos para o sistema de digestibilidade, descrito na metodologia geral (secção 2.3.1). A adaptação às novas condições experimentais durou 15 dias, findo os quais constituíram-se quatro grupos de 30 robalos de peso médio inicial de 28 g.

O ensaio desenrolou-se a 25 °C, em três séries de três semanas. Em cada série, cada uma das dietas experimentais foi atribuída a um grupo diferente. A alimentação dos animais foi efectuada manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia. Os primeiros 7 dias de cada série destinaram-se à adaptação às dietas experimentais. De seguida, as fezes foram recolhidas diariamente durante 15 dias consecutivos. Imediatamente após a sua recolha, as fezes foram centrifugadas e armazenadas a –20 °C para posterior análise.

6.2.4. Ensaio de metabolismo

Terminado o ensaio de digestibilidade, os tanques foram cobertos à superfície da água, com uma tampa em acrílico transparente e a aerificação foi suprimida. O fotoperíodo foi ajustado a 24 horas de luz.

Os animais foram adaptados às novas condições experimentais durante 7 dias. Durante este período, cada grupo experimental foi alimentado, manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia (11:00 e 17:00 h), com uma das dietas experimentais. De seguida, os animais foram pesados em grupo (peso médio inicial de 50 g) e, no dia seguinte, iniciou-se o doseamento em contínuo da excreção de amónia e do consumo de oxigénio pós-prandiais durante três ciclos diários consecutivos, conforme descrito na metodologia geral. Posteriormente os animais foram mantidos em jejum e no nono dia de jejum procedeu-se às mesmas determinações metabólicas, durante um ciclo diário.

6.3. Resultados

6.3.1. Ensaio de crescimento e de digestibilidade

O peso médio final e a taxa de crescimento específico dos robalos alimentados com as dietas AC e AC/AG foram significativamente maiores do que os dos robalos alimentados com a dieta AG. O peso final do grupo HP não foi estatisticamente diferente dos outros grupos experimentais (figura 6.1; tabela 6.2).

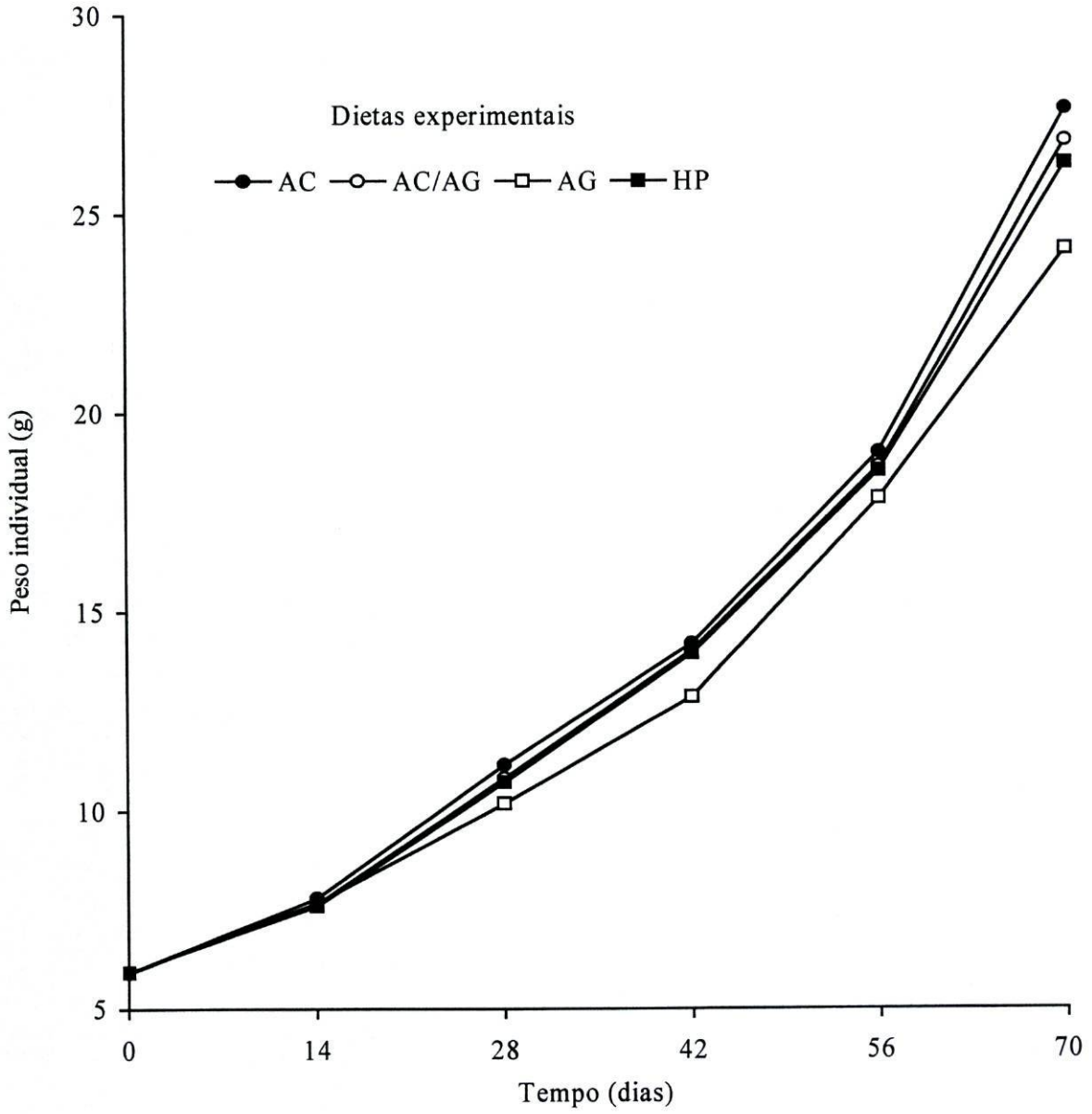


Figura 6.1. Crescimento médio dos robalos alimentados com as dietas experimentais.

A ingestão de alimento diminuiu significativamente com o aumento da incorporação do amido gelatinizado nas dietas. Para os robalos alimentados com a dieta HP, a ingestão de alimento foi significativamente menor e a eficiência de conversão alimentar significativamente maior do que para os robalos alimentados com as restantes dietas (tabela 6.2).

Tabela 6.2. Crescimento e eficiência de utilização do alimento nos robalos alimentados com as dietas experimentais[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Peso médio inicial (g)	5,9	5,9	5,9	5,9
Peso médio final (g)	$27,6^{b}$ ±0,9	$26,8^{b}$ ±0,9	$24,1^{a}$ ±0,5	$26,3^{ab}$ ±0,3
Ganho de peso (g/kg PM†/dia)	$18,5^{b}$ ±0,3	$18,3^{b}$ ±0,3	$17,3^{a}$ ±0,2	$18,1^{b}$ ±0,1
Taxa de crescimento específico	$2,20^{b}$ ±0,05	$2,16^{b}$ ±0,05	$2,01^{a}$ ±0,03	$2,13^{ab}$ ±0,02
Alimento ingerido (g/kg PM†/dia)	$29,2^{d}$ ±0,5	$23,2^{c}$ ±0,4	$20,4^{b}$ ±0,4	$17,6^{a}$ ±1,3
Eficiência de conversão alimentar	$0,64^{a}$ ±0,03	$0,79^{b}$ ±0,01	$0,85^{b}$ ±0,02	$1,03^{c}$ ±0,03
Coeficiente de eficácia proteica	$1,24^{a}$ ±0,06	$1,59^{b}$ ±0,02	$1,72^{c}$ ±0,01	$1,64^{bc}$ ±0,04

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

†Peso médio.

A eficiência de conversão alimentar foi significativamente menor nos robalos alimentados com a dieta AC do que nos robalos alimentados com as restantes dietas. Nestas, a eficiência de conversão alimentar foi significativamente maior com a dieta HP do que com as dietas AC/AG e AG. O coeficiente de eficácia proteica aumentou significativamente com o aumento do teor de amido gelatinizado das dietas. O coeficiente de eficácia proteica da dieta HP foi significativamente maior do que o da dieta AC e não foi estatisticamente diferente das restantes dietas experimentais (tabela 6.2).

Na tabela 6.3 apresentam-se os coeficientes de digestibilidade parente das diferentes dietas experimentais. O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca da dieta AG foi significativamente maior do que o das restantes dietas seguido, por ordem decrescente, pelas dietas AC e AC/AG e pela dieta HP. O CDA da proteína foi elevado e não variou significativamente entre as dietas experimentais.

Tabela 6.3. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Matéria seca	$77,8^{b}$ ±0,2	$77,9^{b}$ ±0,1	$80,2^{c}$ ±0,6	$75,6^{a}$ ±0,2
Proteína	93,6 ±0,3	94,0 ±0,2	93,5 ±0,2	94,4 ±0,0
Amido	$66,4^{a}$ ±0,4	$85,2^{b}$ ±0,2	$98,2^{c}$ ±0,3	—
Energia	$90,0^{a}$ ±0,4	$92,1^{b}$ ±0,1	$93,4^{bc}$ ±0,4	$93,6^{c}$ ±0,1

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

O CDA do amido cru foi significativamente menor do que o do amido gelatinizado. O CDA da energia aumentou significativamente com a substituição do amido cru por amido gelatinizado na dieta. O CDA da energia da dieta HP foi significativamente maior do que o das dietas AC e AC/AG, mas não diferiu do da dieta AG (tabela 6.3).

Relativamente aos valores iniciais, os robalos apresentaram, no final do ensaio, um menor teor em humidade e um conteúdo lipídico e energético maior. No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos alimentados com as dietas experimentais não diferiu significativamente entre si (tabela 6.4). O conteúdo lipídico dos robalos alimentados com as dietas AG e HP foi maior, embora não significativamente, do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas. Os índices hepatossomático e visceral dos robalos alimentados com as dietas AC e HP foram significativamente menores do que os dos robalos alimentados com as restantes dietas.

O conteúdo em glicogénio hepático (% peso fresco do fígado ou g/100g peixe) dos robalos alimentados com a dieta HP foi significativamente menor do que o dos robalos alimentados com as dietas AC/AG e AG, mas não diferiu significativamente do dos robalos alimentados com a dieta AC. O conteúdo em lípidos hepáticos (% peso fresco do fígado ou g/100g peixe) dos robalos aumentou com o aumento do nível de incorporação de amido gelatinizado nas dietas. O teor lipídico muscular (% peso fresco do músculo) dos robalos alimentados com as dietas experimentais não foi estatisticamente diferente. Os níveis de glucose plasmática, ao fim de 16 horas de jejum, foram idênticos nos vários tratamentos (tabela 6.4).

Tabela 6.4. Composição corporal dos robalos (% peso fresco) no início e no final do ensaio de crescimento[1].

		Dietas			
	Inicial	AC	AC/AG	AG	HP
Matéria seca	27,4	29,7 ±4,1	26,3 ±2,2	30,5 ±2,9	30,6 ±3,7
Proteína	16,1	17,3 ±2,4	14,6 ±1,0	16,7 ±1,8	17,1 ±1,9
Lípidos	6,4	8,0 ±0,9	8,1 ±0,8	9,8 ±0,7	9,1 ±1,0
Cinzas	4,9	4,4 ±0,7	3,7 ±0,3	4,4 ±0,5	4,4 ±0,5
Energia (kJ/g)	6,0	7,1 ±0,9	6,5 ±0,5	7,4 ±0,6	7,5 ±0,9
Índice hepatossomático	2,4	$2,0^{a}$ ±0,2	$2,9^{b}$ ±0,1	$3,3^{b}$ ±0,1	$1,5^{a}$ ±0,1
Índice visceral	8,9	$8,1^{a}$ ±0,2	$10,0^{b}$ ±0,4	$11,2^{c}$ ±0,2	$8,6^{a}$ ±0,2
Glicogénio hepático (% peso fresco do fígado)	—	$5,5^{ab}$ ±1,3	$8,8^{b}$ ±1,0	$9,2^{b}$ ±1,1	$3,2^{a}$ ±0,9
(g/100g peixe)	—	$0,11^{a}$ ±0,02	$0,25^{b}$ ±0,02	$0,31^{b}$ ±0,05	$0,05^{a}$ ±0,01
Lípidos hepáticos (% peso fresco do fígado)	—	$22,6^{a}$ ±2,5	$26,3^{ab}$ ±2,7	$42,1^{c}$ ±2,9	$32,9^{b}$ ±1,8
(g/100g peixe)	—	$0,47^{a}$ ±0,07	$0,76^{a}$ ±0,11	$1,39^{b}$ ±0,12	$0,51^{a}$ ±0,05
Lípidos musculares (% peso fresco do músculo)	—	1,41 ±0,18	1,62 ±0,18	1,79 ±0,21	1,65 ±0,23
Glucose plasmática (mg/100 ml)	—	65,2 ±4,2	63,6 ±5,3	65,1 ±4,1	59,9 ±3,5

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p<0,05$).

Com base nos dados relativos à digestibilidade aparente das dietas, ao crescimento e à composição corporal dos robalos foi estimada a eficiência de utilização do azoto, da energia e dos lípidos das dietas experimentais (tabela 6.5).

Tabela 6.5. Eficiência de utilização do azoto, da energia e dos lípidos das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Azoto				
Ingestão (g/kg PM†/dia)	2,4^{c} ±0,1	1,8^{b} ±0,0	1,6^{a} ±0,0	1,8^{b} ±0,1
Retenção (g/kg PM†/dia)	0,52 ±0,08	0,41 ±0,03	0,47 ±0,06	0,50 ±0,07
Retenção (% ingerido)	21,8 ±3,6	22,6 ±2,1	29,3 ±4,4	28,7 ±4,3
Energia				
Ingestão (kJ/kg PM†/dia)	591,8^{c} ±20,0	486,2^{b} ±8,1	421,8^{a} ±7,8	395,8^{a} ±10,3
Retenção (kJ/kg PM†/dia)	136,1 ±21,1	120,2 ±10,6	137,1 ±15,0	142,4 ±21,3
Retenção (% ingerido)	23,1 ±3,7	24,8 ±2,4	32,6 ±3,8	36,1 ±5,9
Lípidos				
Ingestão (g/kg PM†/dia)	0,5 ±0,02	0,4 ±0,01	0,4 ±0,01	0,5 ±0,01
Retenção (g/kg PM†/dia)	0,25 ±0,04	0,25 ±0,03	0,30 ±0,03	0,29 ±0,04
Retenção (% ingerido)	48,2 ±7,6	57,2 ±6,7	75,5 ±6,9	58,6 ±10,0
P/E (%)[2]	60,0^{a} ±0,1	54,7^{a} ±0,7	54,9^{a} ±0,5	72,3^{b} ±3,6

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[2]Proporção da energia proteica despendida no metabolismo energético total, estimada com base na análise da composição da carcaça.

†Peso médio.

A ingestão diária de azoto e de energia variou de modo inverso ao do nível de inclusão de amido gelatinizado na dieta. Os robalos alimentados com a dieta HP ingeriram uma quantidade de azoto similar à dos robalos alimentados com a dieta AC/AG e de energia similar à dos robalos alimentados com a dieta AG. A retenção azotada, bem como a retenção energética (g ou kJ/kg/dia), não diferiram significativamente entre os diferentes tratamentos. Contudo, quando expressas em percentagem do azoto ou da energia ingerida, verifica-se uma tendência para aumentar a retenção azotada ou energética com o aumento do teor em amido gelatinizado das dietas.

A ingestão lipídica não foi significativamente afectada pela composição das dietas experimentais. Nos robalos alimentados com a dieta AG, a retenção lipídica (% lípidos ingeridos) foi bastante mais elevada do que nos restantes grupos, embora as diferenças não fossem estatisticamente significativas (tabela 6.5).

A proporção de energia proteica despendida no metabolismo energético total (P/E) foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta HP do que nos robalos alimentados com as restantes dietas, para as quais não foram observadas diferenças significativas (tabela 6.5).

6.3.2. Ensaio de metabolismo

O padrão de excreção de amónia pós-prandial foi similar nos diferentes grupos experimentais (figura 6.2). A excreção de amónia aumentou acentuadamente após a primeira refeição, atingindo um pico 2 a 3 horas após a ingestão do alimento. De seguida, diminuiu até ao momento da segunda refeição, altura em que aumentou de novo para um segundo pico 2 a 3 horas depois. Em seguida, a excreção de amónia diminuiu gradualmente, atingindo os valores basais cerca de 20 a 21 horas após a primeira refeição.

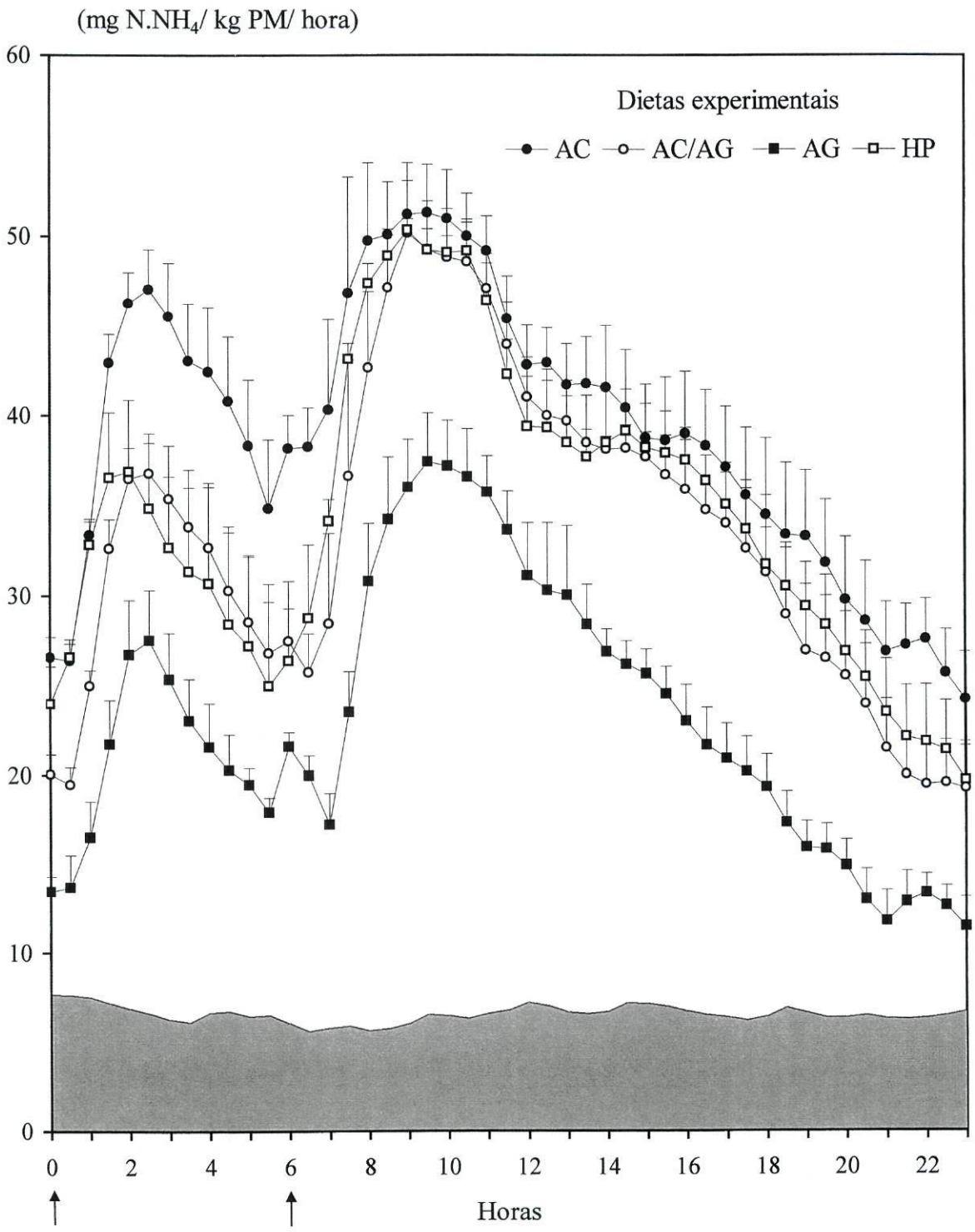


Figura 6.2. Perfil diário da excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum (área a sombreado). As setas indicam as refeições. Valores médios ± erro padrão.

Em valores absolutos, a excreção diária de amónia foi significativamente menor nos robalos alimentados com a dieta AG do que nos robalos alimentados com as restantes dietas (tabela 6.6). A excreção de amónia, em percentagem do azoto ingerido, dos robalos alimentados com a dieta HP foi significativamente maior do que a dos robalos alimentados com as restantes dietas. Nos robalos mantidos em jejum a excreção de azoto foi, em média, 150 mg/kg PM/dia, não tendo apresentado grandes oscilações durante o dia (tabela 6.6).

Tabela 6.6. Excreção de amónia dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Pós-prandial				
(mg $N.NH_4$/kg PM[†]/dia)	$941,3^{b}$ ±73,6	$805,4^{b}$ ±57,3	$555,8^{a}$ ±24,2	$831,2^{b}$ ±44,3
(% azoto ingerido)	$35,7^{a}$ ±0,4	$37,9^{a}$ ±3,6	$31,9^{a}$ ±0,7	$45,9^{b}$ ±1,3
Jejum				
(mg $N.NH_4$/kg PM[†]/dia)	158,1	143,8	149,7	147,1

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[†]Peso médio.

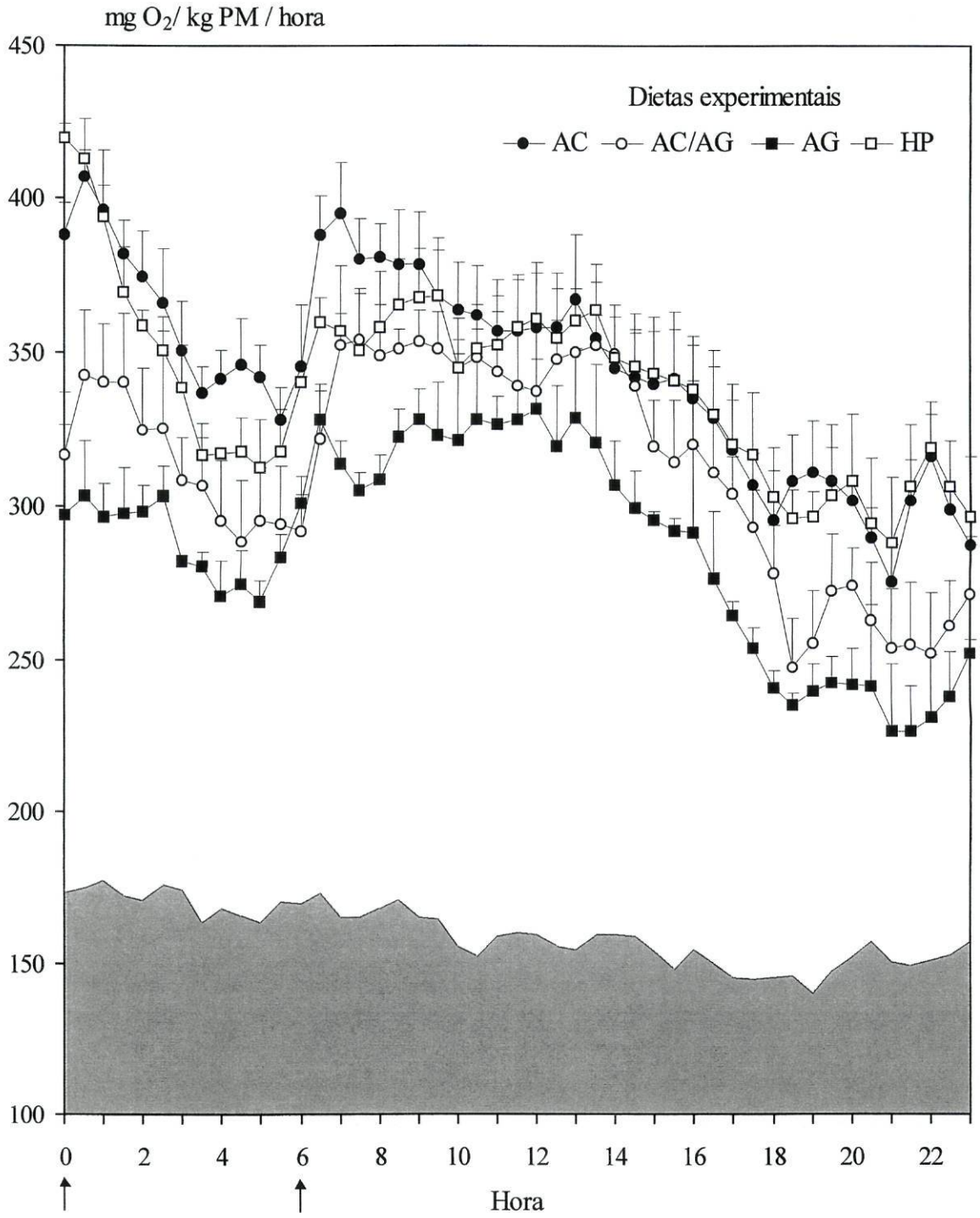


Figura 6.3. Perfil diário do consumo de oxigénio dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum (área a sombreado). As setas indicam as refeições. Valores médios ± erro padrão.

A variação diária do consumo de oxigénio pós-prandial foi idêntica nos robalos alimentados com as diferentes dietas experimentais. O consumo de oxigénio aumentou aquando da ingestão do alimento e, em seguida, começou a diminuir, atingindo um novo pico aquando da segunda refeição e manteve-se elevado durante cerca de 7 horas. Posteriormente, começou a diminuir gradualmente até às 18 – 19 horas após a primeira refeição estabilizando, de seguida, até ao momento da nova ingestão de alimento (figura 6.3).

Tabela 6.7. Consumo de oxigénio e incremento calórico dos robalos alimentados com as dietas experimentais e em jejum[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Consumo de oxigénio				
Pós-prandial				
(g O_2/kg PM[†]/dia)	8,4 ±0,4	7,6 ±0,5	7,0 ±0,1	8,2 ±0,4
Jejum				
(g O_2/kg PM[†]/dia)	4,2	3,9	4,5	3,9
Incremento calórico				
(kJ/kg PM[†]/dia)	$56,2^{b}$ ±4,9	$50,4^{b}$ ±6,5	$33,7^{a}$ ±1,8	$59,7^{b}$ ±4,9
(kJ/g azoto ingerido)	$21,3^{a}$ ±0,5	$23,2^{a}$ ±0,6	$19,6^{a}$ ±0,8	$33,2^{b}$ ±3,4

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[†]Peso médio.

Em valores absolutos, o consumo de oxigénio não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, apesar de mostrar tendência para diminuir com a substituição do amido cru por amido gelatinizado nas dietas. Nos robalos em jejum, o consumo de oxigénio foi, em média, 4,1 g/kg PM/dia (tabela 6.7).

O incremento calórico (kJ/kg PM/dia) dos robalos alimentados com a dieta AG foi significativamente menor do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas (tabela 6.7). Quando expresso por grama de azoto ingerido, o incremento calórico foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta HP do que nos robalos alimentados com as restantes dietas. Nestas últimas o incremento calórico não diferiu significativamente entre si (tabela 6.7).

Com base nos resultados do ensaio de metabolismo e na digestibilidade aparente das dietas estabeleceram-se os balanços azotados e energéticos dos robalos alimentados com as dietas experimentais (tabela 6.8 e 6.9, respectivamente).

A retenção azotada (% azoto ingerido) não variou de modo significativo entre as dietas que incluíam amido, apesar de se verificar uma tendência para aumentar com a substituição do amido cru por amido gelatinizado. A retenção azotada (% azoto ingerido) foi significativamente menor nos robalos alimentados com a dieta HP do que com as restantes dietas devido, essencialmente, a um aumento significativo das perdas azotadas urinárias e branquiais (tabela 6.8).

Tabela 6.8. Balanços azotados dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base nos dados do ensaio de metabolismo)[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Azoto ingerido (g/kg PM[†]/dia)	2,6 ±0,2	2,2 ±0,3	1,7 ±0,1	1,8 ±0,1
Azoto fecal (% NI)	6,4 ±0,3	6,0 ±0,2	6,5 ±0,2	5,6 ±0,0
Azoto urinário e branquial (% NI)	$41,0^{a}$ ±0,5	$43,6^{a}$ ±4,1	$37,2^{a}$ ±1,0	$52,8^{b}$ ±1,5
Azoto retido (% NI)	$52,6^{b}$ ±0,7	$50,4^{b}$ ±4,0	$56,4^{b}$ ±0,8	$41,6^{a}$ ±1,5

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[†]Peso médio.

NI: azoto ingerido.

Os balanços energéticos mostram que a energia metabolizável (% energia ingerida) aumentou significativamente com o aumento do nível de incorporação do amido gelatinizado nas dietas. A energia retida (% energia ingerida) foi significativamente menor nos robalos alimentados com a dieta HP do que nos alimentados com as restantes dietas, as quais não diferiram significativamente entre si (tabela 6.9).

As perdas de energia fecal diminuíram significativamente com a substituição do amido cru por amido gelatinizado. As perdas de energia urinária e branquial, a produção de calor e o incremento calórico (% energia ingerida) foram significativamente maiores nos robalos alimentados com a dieta HP do que com as restantes dietas, para as quais não se observaram diferenças significativas. A energia de manutenção dos robalos alimentados com as dietas AG e HP foi significativamente maior do que com as dietas AC e AC/AG (tabela 6.9).

Tabela 6.9. Balanços energéticos dos robalos alimentados com as dietas experimentais (valores estimados com base no dados do ensaio de metabolismo)[1].

	Dietas			
	AC	AC/AG	AG	HP
Energia ingerida (kJ/kg PM[†]/dia)	649,0 ±43,7	576,2 ±81,2	456,7 ±11,9	407,4 ±23,9
Energia digestível (% EI)	90,0 ±0,4	92,1 ±0,1	93,4 ±0,4	93,6 ±0,1
Energia metabolizável (% EI)	85,8^{a} ±0,5	88,0^{b} ±0,3	89,9^{c} ±0,1	87,7^{b} ±0,3
Energia líquida (% EI)	77,2^{b} ±0,7	79,2^{b} ±0,5	82,5^{c} ±0,1	73,0^{a} ±1,34
Energia retida (% EI)	68,3^{b} ±0,4	69,2^{b} ±2,2	69,1^{b} ±0,2	60,0^{a} ±2,1
Perdas fecais e metabólicas				
Energia fecal (% EI)	10,0^{c} ±0,4	7,9^{b} ±0,1	6,6^{a} ±0,4	6,4^{a} ±0,1
Energia urinária e branquial (% EI)	4,1^{a} ±0,0	4,1^{a} ±0,4	3,5^{a} ±0,1	5,9^{b} ±0,2
Perdas de calor				
Produção de calor (% EI)	17,6^{a} ±0,4	18,4^{a} ±1,7	20,9^{a} ±0,3	27,7^{b} ±2,1
Incremento calórico (% EI)	8,6^{a} ±0,2	8,8^{a} ±0,2	7,4^{a} ±0,3	14,8^{b} ±1,5
Energia de manutenção (% EI)	8,9^{a} ±0,6	9,7^{a} ±1,6	13,5^{b} ±0,3	12,9^{b} ±0,8

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

[†]Peso médio.

EI: energia ingerida.

6.4. Discussão

Apesar de não se verificarem sintomas de carência quando os hidratos de carbono estão ausentes na dieta, foi demonstrado que a sua incorporação em quantidades controladas pode melhorar o crescimento do robalo (Alliot et al., 1979a), da truta arco-íris (Peragón et al., 1999), do salmão do Atlântico (Hemre et al., 1995b), do bacalhau (Hemre et al., 1993) e da dourada japonesa (Furuichi, 1983). Os resultados do presente trabalho mostram que comparativamente com a dieta isenta de hidratos de carbono, a incorporação do amido não afectou o crescimento mas diminuiu significativamente a eficiência de conversão alimentar e o coeficiente de eficácia proteica.

O tratamento térmico do amido merece particular atenção. Com efeito, foi demonstrado que comparativamente ao amido cru, a incorporação de amido gelatinizado nas dietas tem efeitos benéficos no crescimento e na eficiência de utilização do alimento nos teleósteos (Furuichi et al., 1987; Takeuchi et al., 1992; Kaushik e Médale, 1994), nomeadamente no robalo (Dias et al., 1998). No presente trabalho, a substituição de 12,5% do amido cru por amido gelatinizado aumentou significativamente a eficiência de utilização do alimento, embora o crescimento não tenha sido afectado. Contudo, a substituição total do amido cru por gelatinizado levou a uma diminuição significativa do crescimento, apesar de ter melhorado a eficiência de utilização do alimento. A redução do crescimento deve-se, possivelmente, à redução da ingestão de alimento, que pode ter comprometido a ingestão dos nutrientes essenciais, nomeadamente da proteína, de forma a não serem satisfeitas as necessidades de crescimento. Resultados similares foram também referidos para a truta arco-íris quando alimentada com dietas que incluíam amido expandido, comparativamente com as que continham amido cru (Pfeffer, 1995). Ainda na truta arco-íris foi observado que em dietas com 30% de amido, o crescimento e a eficiência de utilização do alimento aumentaram com o aumento da razão entre o amido gelatinizado /amido cru da dieta, atingindo um "plateau" por volta dos 40% (20% amido cru + 10% de amido gelatinizado; Jeong et al., 1992a).

A incorporação de amido gelatinizado nas dietas diminuiu significativamente a ingestão de alimento, tal como foi anteriormente observado nesta espécie (Gouveia et al., 1995) e

noutras espécies de teleósteos (Lee e Putman, 1973; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Alexis e Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1986; Hemre et al., 1989).

Para a truta arco-íris, foi demonstrado que a incorporação de 30% de hidratos de carbono digestíveis na dieta não afectou negativamente as performances de crescimento (Bergot, 1979a; Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Beamish et al., 1986; Kaushik et al., 1989a; Takeuchi et al., 1990). No entanto, outros trabalhos apontam para uma redução no crescimento da truta arco-íris quando o nível de hidratos de carbono digestíveis da dieta ultrapassa os 14% (Hilton e Atkinson, 1982; Hilton et al., 1982). Em dietas para o salmão do Atlântico, considera-se que os hidratos de carbono não devem ultrapassar os 20% (Helland et al., 1991; Hemre et al., 1995b). Para o robalo, foi demonstrado que o amido cru é uma fonte energética relativamente mal utilizada (Alliot et al., 1979a, Métailler et al., 1981), enquanto que o amido gelatinizado, quando incorporado na dieta em níveis inferiores a 25%, não afecta negativamente o crescimento ou a eficiência de conversão alimentar (Gouveia et al., 1995). Contudo, no presente trabalho, a inclusão de 25% de amido gelatinizado diminuiu as performance de crescimento, mas melhorou a utilização do alimento.

A importância do tratamento térmico no aumento da utilização digestiva do amido, observada neste estudo, está bem estabelecida tanto para as espécies de água doce (Bergot e Brèque, 1983; Hemre et al., 1989; Médale et al., 1991a; Kim e Kaushik, 1992; Bergot, 1993) como para as espécies de água salgada (Jeong et al., 1991; Dias et al., 1998). A magnitude da utilização digestiva do amido cru e do amido gelatinizado observada neste estudo foi relativamente elevada, conforme anteriormente observado para esta espécie (Spyridakis, 1989; Dias, 1999). A digestibilidade da matéria seca e da energia aumentou com a substituição do amido cru por gelatinizado, tal como foi anteriormente observado (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Kaushik et al., 1989a; Storebakken et al., 1998). No presente trabalho, a digestibilidade da proteína provou ser independente do estado físico do amido, conforme anteriormente observado para o robalo (Gouveia et al., 1995) e outras espécies de teleósteos (Kaushik et al., 1989a; Médale et al., 1991a; Jeong et al., 1992 a, b; Kim e Kaushik, 1992; Brauge et al., 1994; Hernández et al., 1994; Storebakken et al., 1998).

No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos alimentados com a dieta isenta de hidratos de carbono era semelhante à dos robalos alimentados com as restantes dietas, sugerindo uma elevada síntese lipídica nos robalos alimentados com as

dietas que incorporavam amido. Com efeito, o ganho corporal em lípidos (% lípidos ingeridos) foi significativamente mais elevado nos robalos alimentados com a dieta AG do que com a dieta HP, de maior teor lipídico. Para a truta arco-íris, Brauge et al. (1994) também observaram que a razão entre o teor de hidratos de carbono digestíveis e o teor lipídico da dieta não influenciou significativamente a composição da carcaça.

A natureza do amido incorporado nas dietas não afectou a composição corporal dos robalos, tal como observado para outras espécies de peixes (Bergot, 1979a; Pieper e Pfeffer, 1980; Kim e Kaushik, 1992). No entanto, alguns autores referem que o aumento dos hidratos de carbono digestíveis da dieta aumenta o conteúdo lipídico dos peixes (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Rawles e Gatlin, 1998; Lanari et al., 1999), enquanto outros observaram um efeito contrário (Refstie e Austreng, 1981; Hilton e Atkinson, 1982).

O aumento da inclusão de hidratos de carbono digestíveis nas dietas induziu o aumento do índice hepatossomático e do teor em glicogénio hepático. Estas constatações estão de acordo com o observado no capítulo anterior e o descrito por outros autores, na mesma espécie (Alliot et al., 1984; Pérez et al., 1997; Dias et al., 1998), na truta arco-íris (Phillips et al., 1948; Lee e Putnam, 1973; Bergot, 1979a; Pieper e Pfeffer, 1979; Hilton e Atkinson, 1982; Kim e Kaushik, 1992; Hung e Storebakken, 1994), no salmão do Atlântico (Hemre et al., 1995 a; c), no esturjão (Kaushik et al., 1989b) e na carpa (Furuichi et al., 1987).

O aumento da deposição lipídica no fígado dos robalos alimentados com as dietas de maior teor em hidratos de carbono digestíveis poderá, pelo menos em parte, ter origem na síntese *de novo* de lípidos a partir dos hidratos de carbono. Para a truta arco-íris, Brauge et al. (1995) observaram *in vivo* que a incorporação de glucose marcada com ^{14}C nos lípidos hepáticos aumentou quando os animais eram alimentados com uma dieta rica em hidratos de carbono digestíveis, o que indica um aumento da lipogénese a partir dos hidratos de carbono. No robalo, sabe-se que o fígado é o principal órgão onde ocorre a lipogénese e que a ingestão de amido digestível tem um efeito positivo na actividade das enzimas lipogénicas (Dias et al., 1998).

É interessante verificar que o conteúdo lipídico hepático dos robalos alimentados com a dieta AG é significativamente mais elevado do que o dos robalos alimentados com a dieta HP ou do que os valores apresentados no capítulo anterior para as dietas de elevado teor

lipídico. Tais resultados parecem indicar que uma parte importante dos lípidos sintetizados a partir dos hidratos de carbono são armazenados no fígado, enquanto que os lípidos ingeridos são depositados maioritariamente fora do fígado, provavelmente no tecido adiposo. Com efeito, no robalo, Lanari et al. (1999) observaram que o aumento do teor lipídico das dietas de 11 para 19% não afectou o conteúdo lipídico do fígado, mas o aumento do teor em hidratos de carbono digestíveis da dieta de 22 para 29% induziu um aumento significativo do conteúdo em lípidos hepáticos.

O teor lipídico do músculo não foi alterado pelo aumento do teor em energia digestível das dietas, resultados consistentes com o estudo anterior no qual se observou que o tecido hepático e perivisceral constituem os principais locais de deposição lipídica e que o teor lipídico muscular foi pouco afectado pelo teor lipídico das dietas.

Nos peixes, a capacidade de regulação dos níveis plasmáticos de glucose é reduzida e a ingestão de dietas com elevado teor em hidratos de carbono digestíveis resultam em hiperglicémia que se prolonga por várias horas (Wilson, 1994). No presente trabalho, 16 horas após a ingestão de alimento os níveis de glucose plasmática eram idênticos em todos os grupos experimentais, o que indica que os níveis basais de glucose plasmática já tinham sido atingidos. Também para outras espécies de teleósteos foi observado que, após 24 horas de jejum, os valores de glicémia eram semelhantes, independentemente do teor em hidratos de carbono da dieta com que os animais tinham sido alimentados (Bergot, 1979a; Kaushik et al., 1989a; Hutchins et al., 1998).

Os níveis de glucose plasmática dos robalos alimentados com a dieta isenta de hidratos de carbono são comparáveis aos dos robalos alimentados com as restantes dietas, o que está de acordo com a elevada capacidade de gluconeogénese a partir dos aminoácidos observada nos peixes de água doce (Walton e Cowey, 1982; Malinovskaya, 1989).

Para os peixes, a eficiência de utilização dos hidratos de carbono como fonte energética continua a suscitar alguma discussão, nomeadamente no que diz respeito ao seu papel na poupança da utilização das proteínas da dieta para fins energéticos. Alguns autores referem que a incorporação de hidratos de carbono digestíveis na dieta aumenta a eficiência de utilização das proteínas das dietas (Cowey et al., 1975; Shimeno et al., 1978; Kim e Kaushik, 1992; Shiau e Peng, 1993; Seenappa e Devaraj, 1995; Grisdale-Hellan e Helland,

1997), enquanto que outros não observaram uma melhoria da utilização das proteínas (Bergot, 1979a; Alexis e Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1986; Degani e Viola, 1987; Hemre et al., 1989; Fynn-Aikins et al., 1992; Shiau e Peng, 1993; Shimeno et al., 1996; Lanari et al., 1999). No presente trabalho, a redução do teor proteico, mediante a incorporação de amido na dieta, não afectou negativamente a retenção azotada, pelo que se pode inferir que, para o robalo, os hidratos de carbono digestíveis também têm um papel importante na economia da proteína da dieta para fins de crescimento.

Para o robalo, Dias et al. (1998) observaram que a substituição do amido cru por gelatinizado na dieta melhorou a retenção azotada e energética, sendo este efeito significativo apenas quando o teor proteico da dieta diminuiu de 52 para 42%. No presente trabalho, verificou-se uma tendência para aumentar a retenção azotada e energética e para diminuir a proporção de energia proteica despendida no metabolismo energético total com a substituição do amido cru por gelatinizado na dieta, embora este efeito não tenha sido significativo. Contudo, a substituição do amido cru por gelatinizado diminuiu significativamente a quantidade de proteína e energia digestíveis necessária para a produção de 1 kg de robalo (figura 6.4).

Relativamente à dieta HP, verificou-se que a redução do teor proteico da dieta, mediante a incorporação de amido gelatinizado, não afectou a quantidade de proteína mas aumentou a quantidade de energia necessária por kg de robalo produzido. Tais resultados sugerem que a energia proveniente dos lípidos é mais eficientemente utilizada do que a dos hidratos de carbono digestíveis, o que poderá estar relacionado com o custo energético da lipogénese a partir dos hidratos de carbono.

Existem estudos que demonstram que o aumento do nível de incorporação dos hidratos de carbono digestíveis nas dietas conduz a uma redução da excreção de azoto amoniacal (Kaushik e Oliva-Teles, 1985; Kaushik et al., 1989a; Médale et al., 1991a; Aguirre et al., 1995) e do incremento calórico (Médale et al., 1991a; Kaushik et al., 1989a). No presente trabalho, a excreção de amónia e o incremento calórico também diminuíram com o aumento do teor em amido gelatinizado das dietas. Tais resultados sugerem uma diminuição da utilização das proteínas para fins energéticos, tal como anteriormente referido para outras espécies de teleósteos (Cho et al., 1976; Jobling e Davis, 1980; LeGrow e Beamish, 1986).

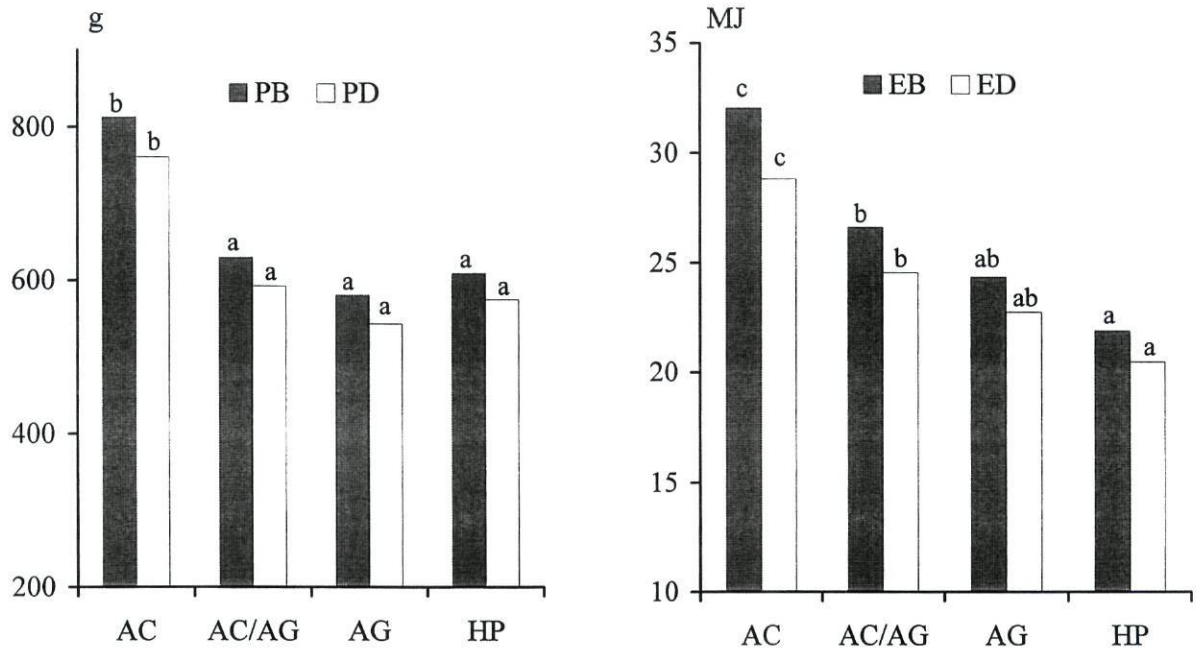


Figura 6.4. Quantidade de proteína bruta (PB) ou digestível (PD) e de energia bruta (EB) ou digestível (ED) necessária para a produção de 1 kg de robalo com as diferentes dietas experimentais (barras da mesma cor, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Com base nos resultados deste estudo podemos concluir que, dentro do intervalo testado, a redução do nível proteico, mediante a incorporação de amido, não afecta negativamente o crescimento dos robalos ou a eficiência de utilização da proteína e energia. Deste modo, a incorporação dos hidratos de carbono contribuiu para economizar as proteínas da dieta para fins de crescimento. Relativamente à natureza do amido, verificou-se que a substituição total do amido cru por gelatinizado na dieta resultou numa diminuição significativa do crescimento e da ingestão de alimento, sem contudo afectar a retenção proteica e energética. No entanto, a substituição de parte ou todo o amido cru por gelatinizado na dieta aumentou significativamente a eficiência de conversão alimentar, aumentou a utilização digestiva das dietas e diminuiu as perdas metabólicas azotadas, pelo que contribuiu para uma redução significativa da carga poluente dos efluentes em matéria orgânica fecal e em compostos azotados solúveis.

7. Ensaio de Tolerância à Glucose na Dourada e no Robalo

7.1. Introdução

Já foram efectuados testes de tolerância à glucose em diversas espécies de peixes, com o intuito de estudar a utilização metabólica da glucose (Furuichi e Yone, 1981; Harmon et al., 1991; Garcia-Riera e Hemre, 1996). Uma hiperglicémia prolongada devida à administração da glucose observou-se nas diferentes espécies estudadas, contudo existem diferenças importantes nessa resposta metabólica: os peixes carnívoros são menos tolerantes à glucose do que os peixes omnívoros. Assim, segundo Furuichi e Yone (1981), a tolerância à glucose é mais baixa na seriola, seguida pela dourada japonesa e pela carpa. Apesar de tudo, mesmo as espécies mais tolerantes apresentam níveis plasmáticos de glucose muito mais altos do que os mamíferos omnívoros, bem como um retorno mais lento aos níveis basais (Cowey, 1988).

Inicialmente julgava-se que a baixa tolerância à glucose dos peixes era devida a uma secreção insulínica insuficiente (Palmer e Ryman, 1972; Furuichi e Yone, 1982 b; Wilson e Poe, 1987). Estudos recentes vieram todavia demonstrar que os peixes não são diabéticos e que os níveis insulínicos plasmáticos são similares aos observados nos mamíferos (Plisetskaya, 1990; Mommsen e Plisetskaya, 1991). Contudo, a resposta insulínica à glucose não é tão rápida nos peixes como nos mamíferos, demorando várias horas a desenvolver-se (Furuichi e Yone, 1981; Harmon et al., 1991). Existem estudos que sugerem que o atraso na secreção insulínica poderá ser devido à secreção de somatostatina – que parece ser mais sensível à glucose do que a insulina – e que por sua vez parece inibir a secreção insulínica (Sheridan et al., 1987; Harmon et al., 1991; Sheridan et al., 1991).

A causa para a prolongada hiperglicémia poderá, também, resultar de interferências com a função dos receptores insulínicos (Gutiérrez et al., 1991). Para além disso, comparativamente com o rato, o número de receptores insulínicos do músculo esquelético da truta arco-íris é substancialmente inferior, contando apenas com 3 a 10% (Gutiérrez et al., 1991). Outro aspecto a considerar é a baixa capacidade de fosforilação hepática da glucose nos peixes, apontada como um dos passos limitante do metabolismo glucídico. Relativamente à actividade das enzimas chave da regulação da glicémia – hesoquinase e glucoquinase - a actividade da enzima hesoquinase foi detectada em diversas espécies de peixes (Nagayama et al., 1973; Cowey et al., 1977; Furuichi e Yone, 1982c), enquanto que inicialmente não tinha

sido detectada qualquer actividade da enzima glucoquinase (Nagayama e Ohshima, 1974; Cowey et al., 1977). Contudo, num estudo recente realizado na truta arco-íris e na carpa, esta última enzima foi identificada tendo-se inclusivamente verificado que a sua actividade era induzida pelo nível de hidratos de carbono digestíveis da dieta ingerida (Médale et al., 1998).

O objectivo deste trabalho é contribuir para o conhecimento do metabolismo glucídico dos peixes marinhos, através da realização de um teste comparativo de tolerância à glucose em robalo e dourada.

7.2. Material e métodos

A experiência foi realizada num sistema de recirculação de água constituído por 16 tanques cilíndricos de fibra de vidro de 300 litros de capacidade. Durante o ensaio a temperatura da água foi de 22 ± 1 °C e a salinidade de 32 ± 2 ‰. Nestes tanques colocaram-se 8 grupos de 8 douradas (peso médio de 194 g) e 8 grupos de 8 robalos (peso médio de 133 g). Foi concedido um período de adaptação ao sistema experimental de 3 semanas, durante o qual os peixes foram alimentados manualmente, uma vez por dia, até à saciedade visual, com uma dieta experimental. Esta dieta apresentava um conteúdo proteico e lipídico de 50 e 12% (em base seca), respectivamente.

Findo o período de adaptação, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, após o qual foram anestesiados (éter etilenoglicolmonofenílico; 0,3 ml/l), imediatamente pesados e submetidos a injecção intraperitoneal de 1 g de glucose por kg de peso corporal. Dada as diferenças de peso entre os peixes das duas espécies em estudo, foram utilizadas duas soluções de glucose: uma solução com 200 mg/ml para a dourada, outra com 100 mg/ml para o robalo. De seguida, os peixes foram colocados novamente nos tanques. Para se evitar o *stress* durante a amostragem, foi utilizado um tanque diferente em cada tempo de amostragem.

Foram efectuadas colheitas de sangue, músculo e fígado antes (tempo 0) e após 1, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas da administração intraperitoneal de glucose. Em cada tempo de amostragem, foram utilizados todos os peixes de um tanque. Após pesagem individual, foi efectuada a colheita de sangue por punção venosa caudal, com seringas heparinizadas, seguida de centrifugação imediata e congelação do plasma para posterior análise dos níveis de glucose, triglicerídeos e aminoácidos totais. O fígado for recolhido, pesado e congelado, em azoto líquido, para análise posterior. As amostras de músculo foram colhidas da área dorso-lateral do corpo, na região posterior à barbatana dorsal e congeladas, em azoto líquido, para análise.

7.3. Resultados

Metabolitos plasmáticos

No tempo zero, o nível plasmático de glucose foi similar em ambas as espécies estudadas. Imediatamente após a injecção, a glucose plasmática começou a aumentar até um valor máximo que foi atingido em 1 – 3 horas na dourada e em 3 – 6 horas após no robalo. O valor máximo de glucose plasmática foi significativamente mais elevado na dourada do que no robalo. Após atingir o valor máximo, os níveis plasmáticos de glucose começaram a diminuir até aos valores basais, que foram atingidos cerca de 12 horas após a injecção (figura 7.1; tabela 7.1). Em ambas as espécies, não foram verificadas diferenças significativas nos valores de glucose plasmática a partir das 12 horas e até ao final do ensaio.

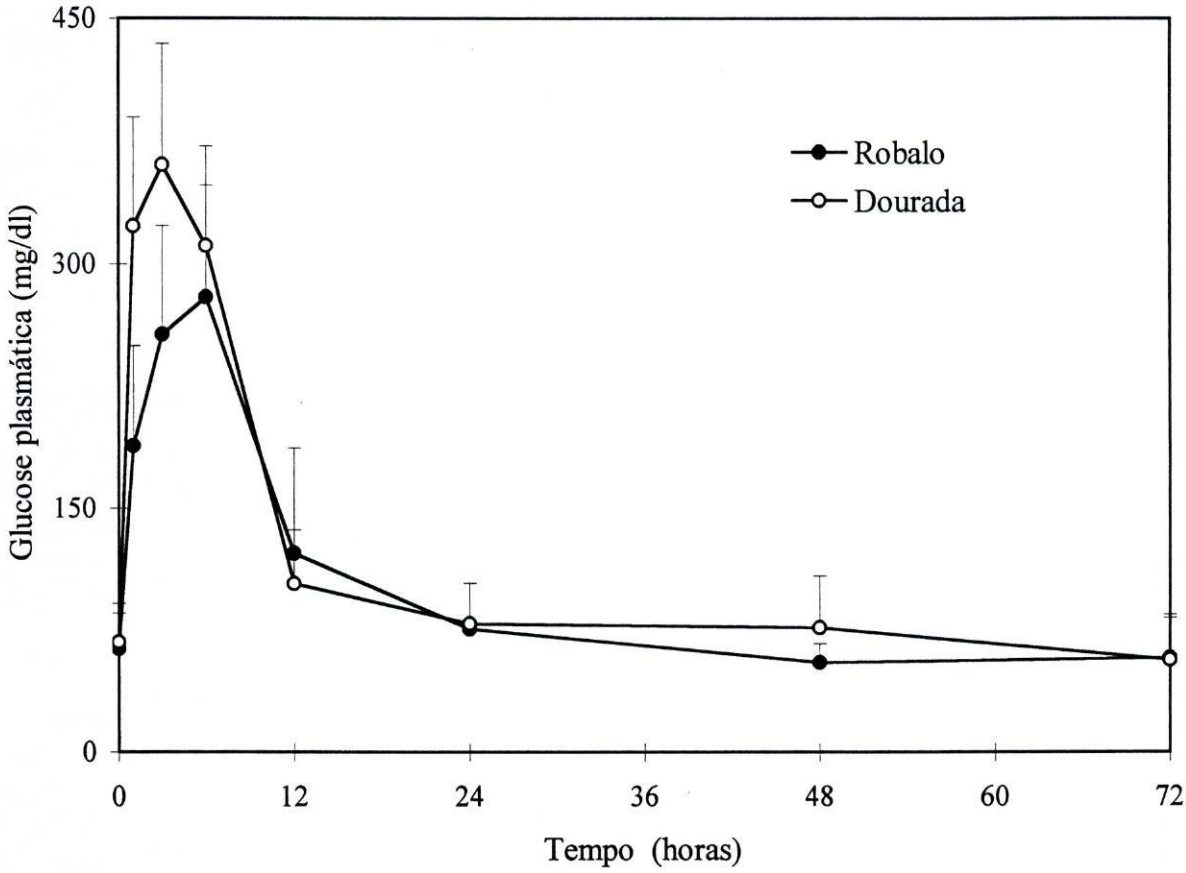


Figura 7.1. Perfil de glucose plasmática da dourada e do robalo após injecção de glucose (1g/kg peso corporal).

Os níveis basais de triglicerídeos plasmáticos foram significativamente mais altos no robalo do que na dourada. Na dourada, os triglicerídeos plasmáticos atingiram um valor máximo uma hora após a injecção de glucose, depois do que começaram a diminuir até atingir os valores basais, 6 horas após a injecção (figura 7.2; tabela 7.1). A partir dessa altura não se registaram diferenças significativas dos valores de triglicerídeos plasmáticos. No robalo, os triglicerídeos plasmáticos diminuíram após a injecção de glucose, começando então a aumentar, a partir das 3 horas, até atingirem um valor máximo 12 horas após a injecção. No período compreendido entre as 24 horas após injecção e o final do ensaio, os triglicerídeos plasmáticos não diferiram significativamente dos níveis basais (figura 7.2; tabela 7.1).

Os valores plasmáticos de aminoácidos totais não variaram de modo significativo durante todo o período experimental e não foram significativamente diferentes em ambas as espécies (tabela 7.1).

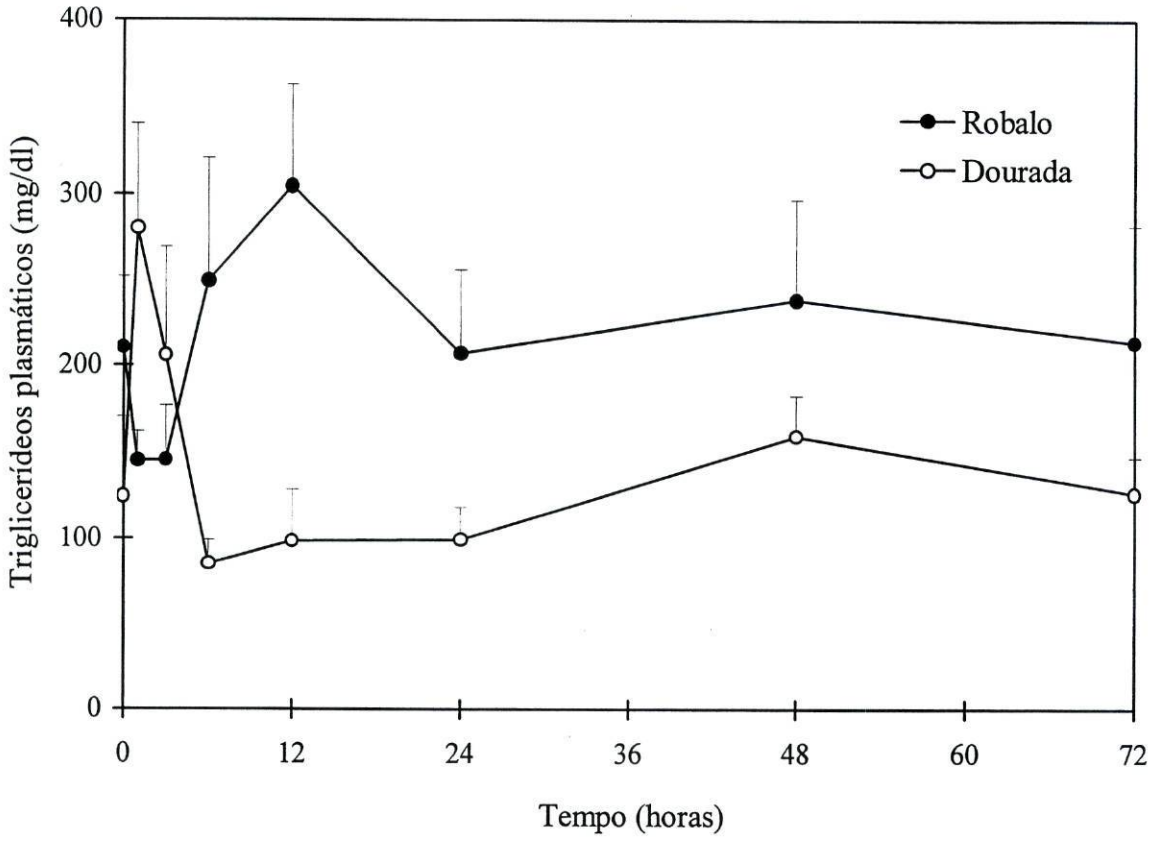


Figura 7.2. Perfil de triglicerídeos plasmáticos do robalo e da dourada após injecção de glucose (1g/kg peso corporal).

Tabela 7.1. Evolução dos níveis plasmáticos de glucose, de triglicerídeos e de aminoácidos totais (mg/dl plasma) na dourada e no robalo durante o ensaio[1].

	Hora							
	0	1	3	6	12	24	48	72
Glucose								
Dourada	$67,9^{a}$ ±8,4	$323,3^{bc}$ ±23,5	$360,7^{c}$ ±26,2	$311,0^{b}$ ±13,2	$103,7^{a}$ ±11,8	$79,0^{a}$ ±8,9	$76,5^{a}$ ±11,3	$57,0^{a}$ ±9,1
Robalo	$63,9^{ab}$ ±10,8	$188,3^{c}$ ±21,8	$256,7^{d}$ ±23,6	$279,6^{d}$ ±32,7	$122,1^{b}$ ±23,0	$75,9^{ab}$ ±90,0	$55,2^{a}$ ±4,2	$58,3^{ab}$ ±9,4
Triglicerídeos								
Dourada	$124,5^{ab}$ ±16,2	$279,9^{d}$ ±21,3	$205,6^{c}$ ±22,5	$84,7^{a}$ ±5,0	$98,3^{a}$ ±10,6	$99,0^{a}$ ±6,8	$159,0^{b}$ ±8,4	$126,1^{ab}$ ±7,3
Robalo	$210,2^{b}$ ±20,8	$145,1^{a}$ ±6,0	$145,2^{a}$ ±11,2	$249,6^{bc}$ ±25,1	$304,8^{c}$ ±20,6	$206,7^{b}$ ±17,5	$238,1^{b}$ ±20,9	$213,2^{b}$ ±24,2
Aminoácidos								
Dourada	23,8 ±2,1	21,1 ±2,0	21,9 ±0,8	21,3 ±0,1	20,1 ±0,1	23,1 ±1,5	22,1 ±0,7	23,8 ±1,3
Robalo	21,6 ±0,8	20,7 ±1,2	24,3 ±1,0	21,9 ±0,8	21,8 ±1,8	24,8 ±1,1	23,0 ±3,1	21,2 ±3,3

[1]Média ± desvio padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Fígado e Músculo

Os índices hepatossomáticos foram significativamente maiores no robalo do que na dourada e não se alteraram de forma significativa durante o ensaio (tabela 7.2).

O teor em glicogénio hepático foi significativamente maior na dourada do que no robalo. Na dourada, o glicogénio hepático persistiu com valores inferiores aos basais entre a 1 e as 6 horas após a injecção, depois do que começou a aumentar, apresentando valores idênticos aos basais entre as 12 e as 48 horas após a injecção. Setenta e duas horas após a injecção, o glicogénio hepático da dourada apresentou novamente valores significativamente inferiores aos basais. Pelo contrário, no robalo o glicogénio hepático apresentou valores significativamente maiores do que os basais, 1 hora após a injecção. De seguida diminuiu para os valores basais e 6 horas após a injecção começou a aumentar até um máximo, 24 horas após a injecção. Posteriormente diminuiu e 72 horas após a injecção tinha atingido os valores basais (tabela 7.2).

O conteúdo proteico médio do fígado da dourada foi significativamente menor do que o do robalo. Na dourada, o conteúdo proteico hepático apresentou valores significativamente maiores do que os basais às 6, 12 e 72 horas após a injecção (tabela 7.2). Já no robalo, o conteúdo proteico hepático foi significativamente menor do que os valores basais 1 e 3 horas após a injecção, enquanto que às 6 e 12 horas foi significativamente maior (tabela 7.2).

Os valores de lípidos hepáticos foram mais elevados no robalo do que na dourada e mantiveram-se inalterados durante o ensaio em ambas as espécies (tabela 7.2).

O teor em glicogénio muscular foi significativamente maior na dourada do que no robalo e não sofreu alterações significativas ao longo de todo o período experimental (tabela 7.2).

Tabela 7.2. Evolução dos níveis hepáticos de glicogénio, proteína e lípidos (% peso fresco) e do glicogénio muscular (% peso fresco) na dourada e no robalo durante o ensaio[1].

	Hora							
	0	1	3	6	12	24	48	72
Fígado								
Índice hepatossomático								
Dourada	1,59 ±0,1	1,42 ±0,1	1,52 ±0,1	1,47 ±0,0	1,58 ±0,1	1,46 ±0,0	1,41 ±0,1	1,29 ±0,1
Robalo	0,91 ±0,1	1,04 ±0,1	1,19 ±0,1	1,08 ±0,1	0,97 ±0,0	1,19 ±0,1	1,08 ±0,1	0,94 ±0,1
Glicogénio								
Dourada	$12,8^{bc}$ ±1,0	$8,4^{a}$ ±0,5	$10,0^{ab}$ ±08	$8,8^{a}$ ±1,2	$14,2^{c}$ ±1,0	$13,4^{c}$ ±0,9	$11,5^{abc}$ ±1,0	$8,1^{a}$ ±1,8
Robalo	$6,4^{a}$ ±0,1	$11,7^{b}$ ±0,6	$6,1^{a}$ ±0,2	$6,0^{a}$ ±0,3	$11,0^{b}$ ±1,3	$16,3^{c}$ ±0,8	$11,5^{b}$ ±0,6	$4,6^{a}$ ±0,5
Proteína								
Dourada	$7,6^{ab}$ ±0,4	$7,2^{a}$ ±0,2	$7,8^{ab}$ ±0,1	$8,9^{d}$ ±0,3	$8,5^{cd}$ ±0,1	$8,0^{bc}$ ±0,1	$8,2^{bc}$ ±0,1	$8,9^{d}$ ±0,1
Robalo	$9,6^{d}$ ±0,1	$9,0^{bc}$ ±0,1	$8,6^{a}$ ±0,1	$10,2^{e}$ ±0,1	$10,1^{e}$ ±0,1	$8,6^{ab}$ ±0,1	$9,1^{c}$ ±0,1	$9,3^{c}$ ±0,2
Lípidos								
Dourada	9,5 ±0,7	9,5 ±0,1	9,2 ±0,2	9,7 ±0,3	8,6 ±0,5	8,7 ±0,2	9,7 ±0,8	8,6 ±0,1
Robalo	32,3 ±1,0	30,6 ±5,0	35,3 ±0,9	31,0 ±1,9	33,7 ±1,0	33,5 ±1,6	35,3 ±1,0	32,6 ±0,8
Músculo								
Glicogénio								
Dourada	0,74 ±0,27	0,97 ±0,04	0,72 ±0,12	0,94 ±0,13	0,76 ±0,16	0,83 ±0,14	0,73 ±0,12	0,66 ±0,13
Robalo	0,24 ±0,03	0,29 ±0,05	0,43 ±0,18	0,30 ±0,03	0,29 ±0,03	0,51 ±0,14	0,55 ±0,21	0,61 ±0,23

[1]Média ± desvio padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

7.4. Discussão

Nas duas espécies verificou-se um aumento acentuado (4 - 5 vezes) da glucose plasmática após a injecção de glucose e um retorno aos níveis de base 12 horas depois. Um padrão idêntico de resposta da glucose plasmática à sobrecarga de glucose, administrada por via parentérica ou oral, está descrita noutros peixes carnívoros (Bergot, 1979b; Furuichi e Yone, 1981; Harmon et al., 1991; Hemre et al., 1991; Brauge et al., 1994; Garcia-Riera e Hemre, 1996). Contudo, comparativamente com os testes orais de tolerância à glucose, no caso de injecção intaperitoneal de glucose é necessário um período de tempo mais curto, para o restabelecimento dos níveis plasmáticos iniciais após a carga de glucose.

Na carpa, um peixe omnívoro, a capacidade de regulação da glucose é consideravelmente maior do que os peixes carnívoros, dado que necessita apenas de 5 horas para restabelecer os níveis plasmáticos de glucose (Furuichi e Yone, 1981; Shikata et al., 1994).

Os peixes, à semelhança dos mamíferos, apresentam uma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de glucose e as hormonas pancreáticas (Pereira, 1996). Está demonstrado que a insulina estimula a remoção de glucose e de ácidos gordos do plasma e aumenta a síntese lipídica e a síntese hepática de glicogénio (Harmon e Sheridan, 1992; Harmon et al., 1993). Por outro lado, o glucagon estimula a hiperglicémia e a lipólise (Plisetskaya et al., 1989; Harmon e Sheridan, 1992; Harmon et al., 1993). A somatostatina parece provocar efeitos hiperglicémicos e glucogenolíticos (Eilertson e Sheridan, 1993).

Neste estudo, a resposta metabólica inicial à sobrecarga de glucose foi diferente nas duas espécies. Na dourada constatou-se um desvio do fluxo metabólico no sentido de um aumento do catabolismo das reservas corporais, enquanto que no robalo verificou-se um desvio metabólico em sentido contrário, isto é, um aumento do anabolismo.

Na dourada, uma hora após a injecção de glucose os triglicerídeos plasmáticos aumentaram e o glicogénio hepático diminuiu significativamente. Estas observações estão de acordo com o descrito por Harmon et al. (1991) na truta arco-íris cuja resposta metabólica, após uma injecção de glucose, caracterizou-se por um aumento inicial dos ácidos gordos plasmáticos,

diminuição do glicogénio hepático, aumento da somatostatina e do glucagon e supressão da insulina plasmática.

No robalo, o aumento da glucose plasmática foi mais gradual e atingiu um valor máximo significativamente menor do que na dourada. Para além disso, uma hora após a injecção os triglicerídeos plasmáticos diminuíram de forma significativa, enquanto o glicogénio hepático aumentou significativamente. Estas diferenças entre as duas espécies podem ser resultantes de uma resposta hormonal diferente. Segundo Chaves et al. (1982) e Gutiérrez et al. (1984, 1986), os níveis insulínicos plasmáticos no robalo estão entre os mais altos dos observados nos teleósteos. Este facto poderá, pelo menos em parte, contribuir para explicar não só os níveis mais baixos de glucose plasmática mas também a diminuição dos triglicerídeos plasmáticos e da elevação do conteúdo hepático em glicogénio.

Nos peixes, a secreção de insulina atinge normalmente valores máximos 2 a 3 horas após uma carga de glucose (Furuichi e Yone, 1981; Harmon et al., 1991; Sheridan et al., 1991). Neste estudo, o regresso aos níveis basais de glucose plasmática coincidiram com um aumento significativo do conteúdo hepático em glicogénio e proteína. Este facto está provavelmente relacionado com um aumento dos níveis insulínicos plasmáticos, uma vez que esta hormona é um potente agente anabólico.

Tal como neste estudo, já foi descrito no robalo um aumento quantitativamente maior do glicogénio hepático em relação ao aumento do teor lipídico hepático, após uma sobrecarga de glucose (Rombaut, 1982). Este autor verificou que a radioactividade incorporada no glicogénio hepático, 12 horas após uma injecção de glucose marcada com ^{14}C, representou 25 a 52% da radioactividade total do fígado, enquanto que a radioactividade em lípidos hepáticos representava apenas 2 a 8%.

O conteúdo lipídico hepático do robalo foi significativamente maior do que o da dourada, o que está de acordo com o descrito por McClelland et al. (1995) que verificou que o robalo armazena 33% do peso fresco do fígado em lípidos, enquanto a dourada armazena apenas 5% em peso fresco.

Com base nos resultados deste ensaio, pode-se concluir que o robalo e a dourada são capazes de restabelecer os níveis plasmáticos de glucose 12 horas após a injecção

intraperitoneal de 1 g de glucose por kg de peso corporal. Apesar das diferenças entre as duas espécies na variação de alguns parâmetros analisados, excluindo a glucose plasmática, os valores basais foram restabelecidos 24 horas após a injecção de glucose. Em ambas as espécies, a variação dos triglicerídeos plasmáticos e do glicogénio hepático sugere que estes parâmetros poderão ter um papel muito importante na regulação da glucose plasmática. Justifica-se a realização de estudos complementares para um melhor entendimento do metabolismo glucídico nestas espécies, nomeadamente o estudo da resposta hormonal a uma carga de glucose.

8. Efeito da Substituição Parcial do Azoto Proteico da Dieta por Azoto Não Proteico

8.1. Introdução

Em face da actual dependência das dietas piscícolas relativamente a um único ingrediente, a farinha de peixe, investigadores e produtores de alimentos compostos têm dado especial atenção à sua substituição, parcial ou total, por outras fontes proteicas, nomeadamente as vegetais (Kaushik, 1990a). No entanto, a maioria das espécies aquícolas requer níveis proteicos nas dietas mais elevados do que os animais monogástricos domésticos, pelo que apenas as matéria primas de elevado teor proteico têm sido utilizadas (Kaushik e Mambrini, 1994).

O recurso a concentrados proteicos unicelulares obtidos a partir de algas, fungos e bactérias tem sido foco de alguma atenção (Tacon e Cooke, 1980). Quando comparadas com as fontes proteicas convencionais, as proteínas unicelulares apresentam vantagens, nomeadamente o elevado teor azotado (entre 64 a 83 % peso seco) e a duplicação da biomassa, que ocorre no espaço de poucas horas mesmo na fermentação industrial (Tacon e Jackson, 1985; Davis e Wareham, 1988). Estas fontes proteicas crescem com substratos de baixo custo e são frequentemente subprodutos de outras actividades industriais (Túse, 1984; Tacon, 1994). O aumento da inclusão destes ingredientes na alimentação dos peixes está dependente da caracterização sistemática do seu valor nutritivo para as diferentes espécies de interesse comercial.

Das fontes proteicas unicelulares, as leveduras são as que têm despertado maior interesse. Com o objectivo geral de substituir a farinha de peixe por leveduras foram realizados diversos trabalhos. Alguns destes trabalhos enfatizam a importância do tratamento tecnológico das leveduras, por forma a romper a parede celular, de baixa digestibilidade, aumentando assim a disponibilidade das nucleoproteínas (Rumsey et al., 1990; 1991b). Outros trabalhos concentraram-se no valor nutricional da proteína (Alliot et al., 1979 b; Appelbaum, 1979; Atack e Marty, 1979; Gropp et al., 1979; Sanchez-Muniz et al., 1979; Kaushik e Luquet, 1980; Mahnken et al., 1980; De La Higuera et al., 1981; Murray e Marchant, 1986). Apesar deste esforço científico, a inclusão de leveduras nas dietas para peixes conduz frequentemente a resultados de crescimento e de utilização do alimento pouco satisfatórios. Tais resultados podem ser imputados ao valor nutritivo das leveduras, nomeadamente à presença de elevados

teores de azoto não proteico (Murray e Marchant, 1986), cujos efeitos são bem conhecidos para os animais domésticos, mas pouco investigados nos peixes.

Quando comparado com outras fontes azotadas de origem animal ou vegetal, o conteúdo em azoto não proteico das leveduras é significativamente mais elevado. Este provém maioritariamente dos ácidos nucleicos, particularmente do ácido ribonucleico (ARN), e de nucleósidos (Shetty e Kinsella, 1979). A título de exemplo, 12 a 20 % do azoto total da levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) pode ser proveniente do ARN (Sarwar et al., 1985; Sosulshi e Imafidon, 1990).

De um modo geral, nos animais monogástricos a presença de elevadas concentrações de ARN nas dietas é um potente depressor da ingestão de alimento e aumenta significativamente os níveis plasmáticos de ácido úrico (Kihlberg, 1972; Sosulski e Imafidon, 1990). A ingestão crónica de dietas com mais de 5% de levedura também produz diversos distúrbios metabólicos, que podem ser evitados se o conteúdo de ácidos nucleicos da levedura for reduzido (Karasawa e Kubota, 1990). Os peixes parecem ser mais tolerantes à ingestão de ácidos nucleicos, possivelmente devido a uma maior actividade da enzima uricase. Esta é responsável pela oxidação do ácido úrico em alantoína, que é posteriormente degradado em ureia e ácido glioxílico (Kinsella et al., 1985; Rumsey et al., 1991a). Na truta arco-íris, a incorporação de ARN em dietas purificadas aumentou significativamente o crescimento e a eficiência de utilização do alimento (Rumsey et al., 1992). Contudo, para a maioria das espécies de teleósteos muito pouco trabalho foi realizado neste domínio.

Este trabalho foi realizado no sentido de avaliar a possibilidade de utilizar o extracto de ARN como fonte azotada em dietas para o robalo. Neste contexto, estudou-se o efeito da suplementação de uma dieta marginalmente deficiente em azoto proteico com extracto de ARN de levedura, no crescimento, ingestão, utilização do alimento e composição corporal dos robalos.

8.2. Material e métodos

8.2.1. Dietas experimentais

Foram formuladas 4 dietas isoenergéticas, duas das quais contendo farinha de peixe como única fonte azotada (dietas HP e LP, respectivamente com 50 e 39% proteína, em base seca). O extracto de ARN foi adicionado à dieta LP, marginalmente deficiente em azoto proteico, em duas concentrações: 6,2 e 12,4% (dietas LP6 e LP12, respectivamente). Deste modo, o teor em azoto total da dieta LP6 é superior ao da dieta LP, mas inferior ao da dieta HP e o teor em azoto total da dieta LP12 é equivalente ao teor em azoto total da dieta HP. As composições e análises químicas das dietas são apresentadas na tabela 8.1. As dietas foram preparadas conforme descrito na metodologia geral.

8.2.2. Ensaio de crescimento

O ensaio de crescimento decorreu a 22 ± 0,5 °C, durante 10 semanas. O sistema experimental consistia em 12 tanques cilíndricos de 100 litros de capacidade, montados em série, em circuito semi-fechado e termorregulado, conforme descrito na secção 2.2.1. Estabeleceu-se um fluxo contínuo de água filtrada (3 l/min.) em cada um dos tanques. Durante o ensaio, a salinidade média foi de 32 ± 1 ‰ e o fotoperíodo foi o natural para os meses de Março a Junho.

Após um período de adaptação de 15 dias às condições experimentais, constituíram-se 12 grupos de 25 robalos (peso médio inicial de 13 g) de peso equivalentes, que foram aleatoriamente distribuídos pelos tanques. Triplicados destes grupos foram alimentados com uma das quatro dietas experimentais, manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia (9:00 e 17:00 h). A quantidade de alimento ingerido foi quantificada diariamente. O controlo do peso dos peixes foi realizado em grupo, cada duas semanas e no final do ensaio de crescimento, após um dia jejum.

Tabela 8.1. Composição e análise química das dietas experimentais.

	Dietas			
	HP	LP	LP6	LP12
Ingredientes (% matéria seca)				
Farinha de peixe[1]	62,1	46,6	46,6	46,6
Extracto de ARN[2]	—	—	6,2	12,4
Óleo de fígado de bacalhau	10,2	12,1	12,1	12,1
Dextrina amarela	24,2	37,8	31,5	25,3
Complexo vitamínico[3]	0,5	0,5	0,5	0,5
Complexo mineral[4]	1,0	1,0	1,0	1,0
Cloreto de colina (50%)	0,5	0,5	0,5	0,5
Sulfato de lenhina	1,0	1,0	1,0	1,0
Óxido de crómio	0,5	0,5	0,5	0,5
Composição química (% matéria seca)				
Matéria seca	90,0	88,8	90,5	91,7
Azoto total	8,0	6,2	7,1	7,9
Proteína bruta verdadeira	50,2	38,9	38,7	38,4
Lípidos	17,8	18,0	18,3	18,3
Cinzas	11,4	8,9	11,5	14,3
Óxido de crómio	0,48	0,43	0,42	0,36
Energia (kJ/g matéria seca)	22,7	22,6	21,8	21,5
PD/ED (mg/kJ)[5]	22,1	17,2	—	—

[1]Farinha de peixe da Noruega; Proteína: 80,5%; Lípidos: 12,6%.

[2]Extracto de ácido ribonucleico da levedura Torula tipo VI (Sigma, Ref. 6625); Azoto total: 16,1% (em base seca).

[3 e 4]Composição indicada na tabela 2.1 e 2.2.

[5]Razão entre proteína digestível/energia digestível, calculada de acordo com os coeficientes de digestibilidade da proteína e energia apresentados na tabela 8.3.

No início do ensaio de crescimento foram retirados aleatoriamente 8 peixes do lote de peixes inicial e 6 peixes de cada grupo experimental no final do ensaio, para posterior análise da composição corporal. O peso destes peixes, das vísceras e do fígado foi quantificado com vista à determinação dos índices visceral e hepatossomático.

8.2.3. Ensaio de digestibilidade

No final do ensaio de crescimento, os robalos foram transferidos para o sistema experimental constituído por 8 tanques de digestibilidade, montados em série, num circuito semi-fechado e termorregulado (temperatura da água 22 °C), conforme o descrito na secção 2.3.1.

Os peixes foram adaptados às novas condições experimentais durante 15 dias. Posteriormente, constituíram-se oito grupos de 25 peixes (peso médio inicial de 55 g), que foram distribuídos aleatoriamente pelos tanques. Duplicados destes grupos foram alimentados com uma das dietas experimentais, manualmente, até à saciedade visual, duas vezes por dia. Os primeiros 7 dias de alimentação foram destinados à adaptação às dietas experimentais e, de seguida, as fezes foram recolhidas diariamente durante 20 dias consecutivos. Imediatamente após a recolha, as fezes foram centrifugadas e armazenadas a -20 °C, para posterior análise.

8.3. Resultados

O peso médio final dos robalos alimentados com as dietas HP e LP foi significativamente maior do que o dos robalos alimentados com a dieta LP12 (figura 8.1). O mesmo aconteceu relativamente ao ganho de peso (g/kg PM/dia) e à taxa de crescimento específico (tabela 8.2).

Os robalos alimentados com a dieta HP ingeriram uma quantidade de alimento significativamente menor do que a dos robalos alimentados com as restantes dietas.

A eficiência de conversão alimentar foi significativamente melhor nos robalos alimentados com a dieta HP do que com as restantes dietas, para as quais não foram observadas diferenças significativas (tabela 8.2).

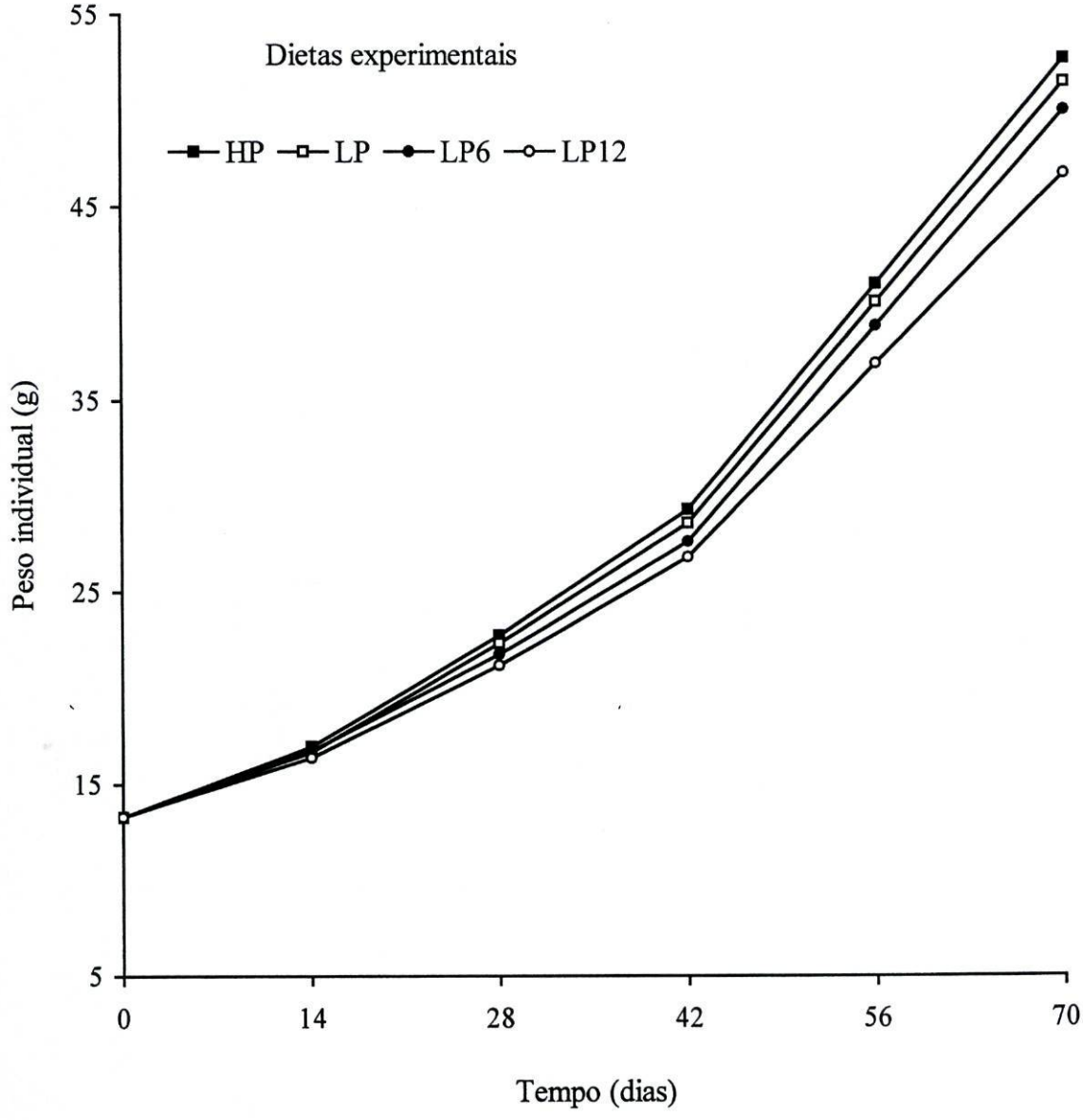


Figura 8.1. Crescimento médio dos robalos alimentados com as dietas experimentais.

Tabela 8.2. Crescimento e eficiência de utilização do alimento nos robalos alimentados com as dietas experimentais[1].

	Dietas			
	HP	LP	LP6	LP12
Peso médio inicial (g)	13,3	13,3	13,3	13,3
Peso médio final (g)	$52,7^{b}$ ±1,8	$51,5^{b}$ ±0,7	$50,1^{ab}$ ±0,7	$46,8^{a}$ ±1,0
Ganho de peso (g/kg PM†/dia)	$17,0^{b}$ ±0,3	$16,9^{b}$ ±0,1	$16,6^{ab}$ ±0,1	$15,9^{a}$ ±0,2
Taxa de crescimento específico	$1,97^{b}$ ±0,05	$1,94^{b}$ ±0,02	$1,89^{ab}$ ±0,02	$1,80^{a}$ ±0,03
Alimento ingerido (g/kg PM†/dia)	$18,6^{a}$ ±0,3	$20,8^{b}$ ±0,8	$21,4^{b}$ ±0,2	$21,0^{b}$ ±0,6
Eficiência de conversão alimentar	$0,92^{b}$ ±0,02	$0,81^{a}$ ±0,03	$0,78^{a}$ ±0,01	$0,76^{a}$ ±0,03

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

†Peso médio.

Os coeficientes de digestibilidade aparente das dietas experimentais são apresentados na tabela 8.3. Não foram observadas diferenças significativas na digestibilidade aparente da matéria seca, do azoto e da energia entre as dietas experimentais.

A tabela 8.4 reúne os valores da composição corporal dos robalos e índices hepatossomático e visceral, no início e no final do ensaio de crescimento. Relativamente à composição inicial, os robalos apresentaram no final do ensaio uma menor percentagem de humidade e de proteína corporal e um conteúdo lipídico e energético maior. No final do ensaio de crescimento, a composição corporal dos robalos não diferiu significativamente entre

os grupos experimentais, com excepção do teor em cinzas que foi significativamente maior nos robalos alimentados com a dieta LP12.

O índice hepatossomático dos robalos alimentados com a dieta HP foi significativamente menor do que o dos robalos alimentados com as restantes dietas. Nestas, o índice hepatossomático foi significativamente maior nos robalos alimentados com as dietas LP6 e LP12 do que com a dieta LP (tabela 8.4).

O índice visceral dos robalos foi mais elevado no final do que no início do ensaio de crescimento (tabela 8.4). Nos robalos alimentados com a dieta HP o índice visceral foi significativamente menor do que nos robalos alimentados com as dietas LP6 e LP12 (tabela 8.4).

Tabela 8.3. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	HP	LP	LP6	LP12
Matéria seca	84,2 ±0,2	88,6 ±0,1	86,4 ±0,4	87,4 ±1,2
Azoto	92,1 ±0,1	92,1 ±0,1	92,0 ±0,2	92,7 ±0,8
Energia	95,3 ±0,0	95,3 ±0,2	95,7 ±0,5	95,4 ±0,8

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Tabela 8.4. Composição corporal dos robalos (% matéria fresca) no início e no final do ensaio de crescimento[1].

	Inicial	Dietas			
		HP	LP	LP6	LP12
Matéria seca	29,2	31,8 ±0,2	32,1 ±0,2	32,6 ±0,1	31,4 ±0,5
Proteína	18,0	16,5 ±0,2	16,6 ±0,1	16,6 ±0,3	16,6 ±0,3
Lípidos	7,0	10,4 ±0,2	10,8 ±0,3	11,0 ±0,4	10,0 ±0,5
Cinzas	5,5	$4,4^{a}$ ±0,1	$4,4^{a}$ ±0,1	$4,4^{a}$ ±0,1	$4,7^{b}$ ±0,2
Energia (kJ/g)	6,6	8,0 ±0,1	8,1 ±0,1	8,3 ±0,1	7,8 ±0,2
Índice hepatossomático	1,7	$1,7^{a}$ ±0,0	$2,1^{b}$ ±0,0	$2,6^{c}$ ±0,1	$2,6^{c}$ ±0,1
Índice visceral	7,1	$9,2^{a}$ ±0,2	$9,9^{ab}$ ±0,2	$10,8^{b}$ ±0,2	$10,4^{b}$ ±0,5

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p< 0,05$).

A eficiência de utilização do azoto das dietas experimentais é apresentada na figura 8.2 e na tabela 8.5. A ingestão azotada (g/kg PM/dia) foi significativamente menor para a dieta LP do que para as restantes dietas (tabela 8.5). A excreção de azoto fecal (g/kg peso ganho) não diferiu significativamente entre os tratamentos (figura 8.2). A excreção de azoto urinário e branquial (% azoto ingerido) foi significativamente menor para a dieta LP do que para a dieta HP. Para esta última, a excreção de azoto urinário e branquial foi menor do que para a dieta LP12 (tabela 8.5). Relativamente à dieta LP, as dietas LP6 e LP12 promoveram um aumento de ingestão de azoto (g/kg PM/dia) equivalente ao aumento da excreção de azoto urinário e

branquial (g/kg PM/dia) verificado com estas dietas. A retenção de azoto (g/kg peso ganho ou g/kg PM/dia) foi similar nos diferentes grupos experimentais (figura 8.2; tabela 8.5). Quando expressa em percentagem do azoto ingerido, a retenção azotada foi significativamente maior para a dieta LP do que para as restantes dietas. Nestas, a retenção azotada (% azoto ingerido) diminuiu com o aumento da incorporação do ARN (tabela 8.5).

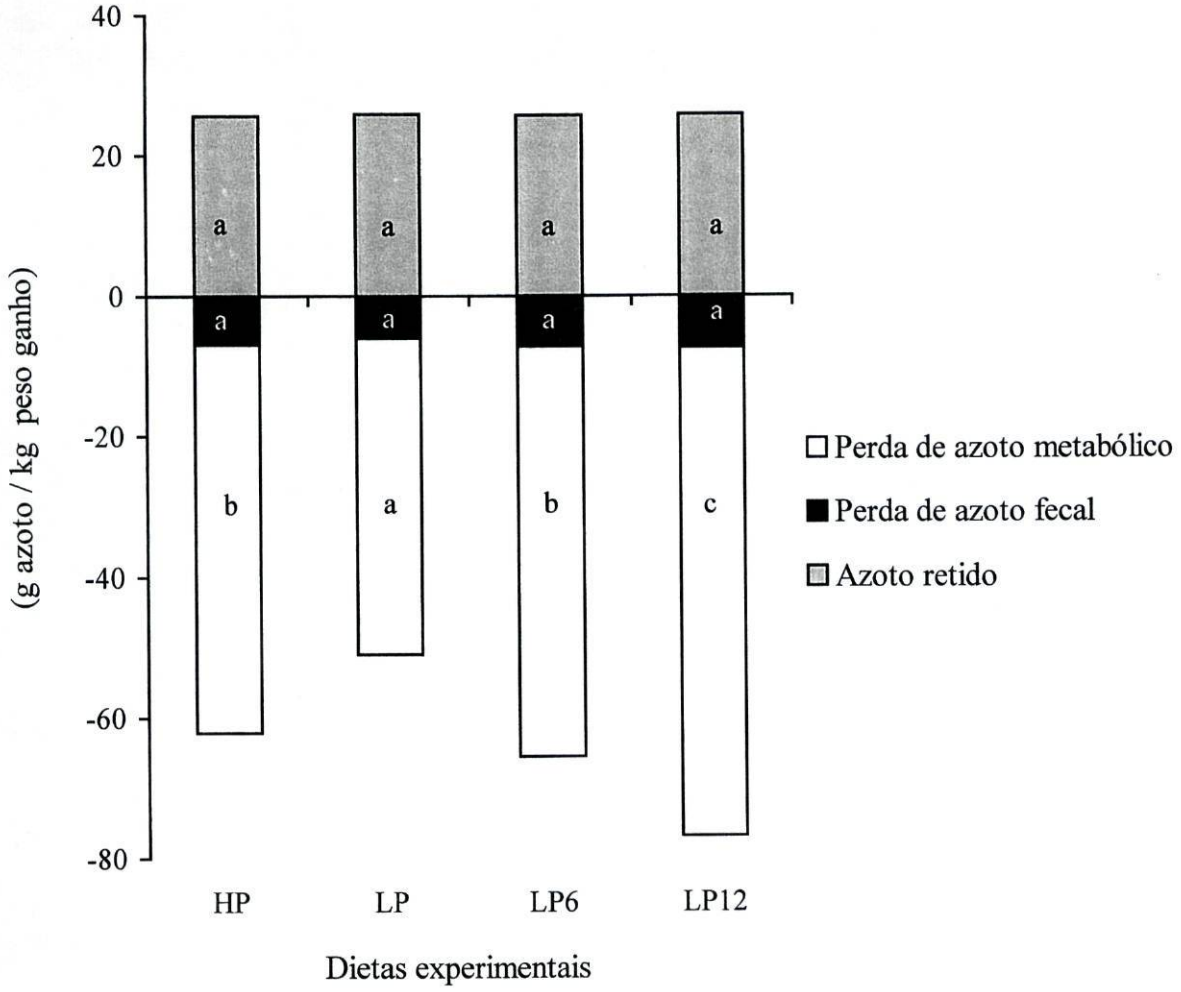


Figura 8.2 Balanço azotado dos robalos alimentados com as dietas experimentais (colunas da mesma cor e com letras diferentes são significativamente diferentes entre si; $p< 0,05$).

Tabela 8.5. Eficiência de utilização do azoto, da energia e dos lípidos das dietas experimentais[1].

	Dietas			
	HP	LP	LP6	LP12
Azoto				
Ingestão (g/kg PM[†]/dia)	$1,49^{b}$ ±0,03	$1,29^{a}$ ±0,05	$1,51^{bc}$ ±0,02	$1,63^{c}$ ±0,05
Urinário e branquial (g/kg PM[†]/dia)	$0,94^{b}$ ±0,02	$0,76^{a}$ ±0,04	$0,97^{b}$ ±0,02	$1,10^{c}$ ±0,06
Urinário e branquial (% ingerido)	$62,9^{b}$ ±0,6	$58,3^{a}$ ±1,1	$63,8^{bc}$ ±0,9	$67,5^{c}$ ±1,9
Retenção (g/kg PM[†]/dia)	0,45 ±0,01	0,44 ±0,00	0,43 ±0,01	0,41 ±0,01
Retenção (% ingerido)	$29,2^{b}$ ±0,9	$33,8^{c}$ ±1,1	$28,2^{ab}$ ±0,9	$25,2^{a}$ ±1,6
Energia				
Ingestão (kJ/kg PM[†]/dia)	422,3 ±7,1	470,9 ±18,8	466,7 ±5,4	451,6 ±13,2
Retenção (kJ/kg PM[†]/dia)	$145,1^{b}$ ±4,6	$146,4^{b}$ ±2,0	$147,9^{b}$ ±2,0	$132,6^{a}$ ±3,5
Retenção (% ingerido)	$34,4^{b}$ ±1,1	$31,2^{ab}$ ±1,0	$31,7^{ab}$ ±0,5	$29,4^{a}$ ±0,8
Lípidos				
Ingestão (g/kg PM[†]/dia)	$3,3^{a}$ ±0,1	$3,7^{b}$ ±0,2	$3,9^{b}$ ±0,1	$3,8^{b}$ ±0,1
Retenção (g/kg PM[†]/dia)	1,96 ±0,03	2,05 ±0,06	2,07 ±0,08	1,77 ±0,10
Retenção (% ingerido)	$59,2^{c}$ ±0,3	$54,9^{bc}$ ±2,0	$52,8^{b}$ ±1,8	$46,2^{a}$ ±2,5

[1]Média ± erro padrão. Valores situados na mesma linha, com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

[†]Peso médio.

A ingestão de energia (kJ/kg PM/dia) não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (tabela 8.5). A retenção energética (kJ/kg PM/dia) foi significativamente menor para a dieta LP12 do que para as restantes dietas, para as quais não foram observadas diferenças significativas. Em percentagem da energia ingerida, a retenção energética foi significativamente menor para a dieta LP12 do que para a dieta HP (tabela 8.5).

A ingestão lipídica (g/kg PM/dia) foi significativamente menor para a dieta HP do que para as restantes dietas (tabela 8.5). A retenção diária lipídica (g/kg PM/dia) não variou de modo significativo entre os grupos experimentais embora, quando expressa em percentagem do ingerido, tenha sido significativamente menor com a dieta LP12 do que com as restantes dietas (tabela 8.5).

8.4. Discussão

No trabalho apresentado no capítulo 4 observou-se que, em dietas com 12% de lípidos (19,1 a 19,7 kJ/g matéria seca), o crescimento máximo só foi conseguido com dietas com níveis proteicos elevados, da ordem dos 48 a 56% (em base seca). Contudo, no presente trabalho verificou-se que, em dietas com 18% de lípidos (22,6 kJ/g matéria seca), o teor proteico da dieta pode ser reduzido até 40% sem afectar negativamente o crescimento. Estes resultados estão em conformidade com o observado por Dias (1999) para a mesma espécie, a 18 °C. Segundo este autor, em dietas com pelo menos 21 kJ/g matéria seca, o teor proteico da dieta pode ser reduzido até 43% sem afectar o crescimento.

No presente trabalho, apesar da redução do teor proteico da dieta para 40% (17,2 mg proteína digestível/kJ energia digestível) não ter comprometido o crescimento, diminuiu significativamente a eficiência de utilização do alimento. Isto pode ser devido ao facto da redução do teor proteico das dietas ter sido acompanhada por um aumento do nível de incorporação de dextrina até 38% da dieta. De facto, no trabalho apresentado no capítulo 6 foi também observado que a incorporação de 25% de amido gelatinizado na dieta, embora não tenha afectado negativamente o crescimento, diminuiu significativamente a eficiência de utilização do alimento.

Os dados referentes à utilização da proteína confirmam que a redução do teor proteico das dietas conduziu a uma economia das proteínas para fins de crescimento, resultante de uma diminuição significativa das perdas de azoto metabólico. Pelo contrário, nos trabalhos apresentados nos capítulos 4 e 5, verificou-se que a eficiência de utilização da proteína não foi afectada pelo aumento do teor proteico ou lipídico das dietas. Deste modo, com base nestes resultados, pode-se inferir que a redução do teor proteico aumenta a eficiência de utilização da proteína em dietas com 18% de lípidos.

Na avaliação do valor nutritivo das fontes proteicas unicelulares, a componente azotada merece especial atenção, uma vez que para além da proteína encontra-se um elevado teor de ácidos nucleicos. Segundo alguns autores, o valor nutritivo das leveduras está condicionado, em grande parte, pelo o seu elevado conteúdo em azoto não proteico proveniente dos ácidos nucleicos (Tacon e Cooke, 1980; Tacon e Jackson, 1985). Contudo, Rumsey et al. (1992) referem que o extracto de ARN da levedura *Saccharomyces cerevisiae* incorporado na dieta foi eficientemente utilizado pela truta arco-íris, tendo aumentado a eficiência de utilização do azoto.

No presente trabalho, a incorporação de 12,4% de extracto de ARN na dieta LP diminuiu o crescimento. Para os ratos e galinhas, também foi observado que a incorporação nas dietas de bases nucleicas, nomeadamente ARN, afectou negativamente as performances de crescimento (Baker e Molitoris, 1974; Clifford e Story, 1976). Para a truta arco-íris, Rumsey et al. (1992) observaram que a incorporação do extracto de ARN, nas proporções de 0,6 a 4,1 % da dieta, aumentou significativamente a taxa de ingestão e o ganho de peso. De referir que neste último trabalho a dieta controlo era uma dieta purificada. Comparativamente com as dietas práticas, este tipo de dietas conduz geralmente a taxas de crescimento e de eficiência de utilização do alimento reduzidas, o que poderá, pelo menos em parte, explicar estes resultados (Robinson et al., 1981; Walton et al., 1982; Chiu et al., 1984; Murai et al., 1984). Por outro lado, Gomes et al. (1995) salientam a importância da qualidade da dieta controlo na avaliação de fontes proteicas alternativas. Segundo estes autores, a substituição de 50% de farinha de peixe por uma fonte proteica vegetal afectou negativamente o crescimento e a utilização do alimento apenas quando essa substituição foi feita em dietas de elevada qualidade nutricional.

A incorporação de ácidos nucleicos em dietas para cães, gatos e galinhas demonstrou reduzir significativamente a taxa de ingestão voluntária de alimento (Clifford e Story, 1976;

Giesecke et al., 1982; Karasawa e Kubota, 1990). De um modo geral, nos peixes a incorporação de níveis elevados de leveduras nas dietas também afecta negativamente a ingestão de alimento (Tacon e Cooke, 1980; De La Higuera et al., 1981; Muray e Marchant, 1986). Para a truta arco-íris, Rumsey et al. (1992) estudaram o efeito da incorporação das bases púricas livres na dieta, tendo observado que apenas a dieta que incluía adenina provocou uma diminuição significativa da ingestão de alimento, do crescimento e elevada mortalidade. Com efeito, para outros animais que não os peixes foi observado que a adenina provoca anorexia, atraso do crescimento e é simultaneamente nefrotóxica (Yokozawa et al., 1982; Brule et al., 1988; Karasawa e Kubota, 1990).

Ainda na truta arco-íris, Rumsey et al. (1991b) observaram uma redução da taxa de ingestão quando as leveduras eram incorporadas na dieta em níveis superiores a 25%. Também, Tacon e Cooke (1980) observaram que a incorporação na dieta de um extracto de ácidos nucleicos de origem bacteriana, equivalente à incorporação de 50% da fonte azotada unicelular, diminuiu significativamente a ingestão do alimento. Murray e Marchant (1986) referem uma diminuição da ingestão do alimento quando a truta arco-íris foi alimentada com uma dieta que incluía mais de 50% de uma mistura de leveduras, com ou sem suplementação de aminoácidos essenciais. Rumsey et al. (1992) observaram que a incorporação de ARN na dieta, equivalente à incorporação de 7,5 a 50 % de levedura, aumentou significativamente a ingestão do alimento. No presente trabalho, pelo contrário, verificamos que a incorporação de ARN na dieta não afectou significativamente a ingestão do alimento. Tais resultados poderão, pelo menos em parte, ser imputados a diferenças da composição química das fontes azotadas utilizadas. Com efeito, as condições de crescimento e de propagação destas fontes azotadas unicelulares, bem como os tratamentos tecnológicos a que são submetidas, condicionam o seu conteúdo em ácidos nucleicos e em azoto não proteico (Shetty e Kinsella, 1982; Lichfield, 1983; Rumsey et al., 1990). Para além disso, os diferentes métodos de extracção do ARN também podem afectar a sua composição química (Kinsella e Shetty, 1978).

A incorporação de extracto de ARN em dietas marginalmente deficientes em proteína demonstrou ter efeitos benéficos na utilização do azoto nos animas superiores (Clifford e Story, 1976; Greife et al., 1981). Para os peixes, poucos são os trabalhos que visam o estudo da utilização do azoto não proteico na economia das proteínas da dieta. Na truta arco-íris, Tacon e Cooke (1980) observaram que a incorporação na dieta de ARN bacteriano não teve qualquer efeito na utilização do azoto, enquanto que Rumsey et al. (1992) observaram um

aumento da eficiência de utilização azotada. Neste trabalho, a incorporação do extracto de ARN na dieta LP diminuiu significativamente a utilização do azoto, embora este efeito tenha sido significativo apenas para o nível de incorporação mais elevado. Para além disso, verificou-se que a suplementação da dieta LP com o extracto de ARN promoveu um aumento significativo da excreção azotada urinária e branquial, sugerindo que o azoto não proteico ingerido foi integralmente excretado por via urinária e branquial. Estas constatações sugerem que os ácidos nucleicos das dietas não foram utilizados na biossíntese dos aminoácidos não essenciais. Estes resultados podem, pelo menos em parte, ser atribuídos ao facto de que a dieta LP, formulada de modo a ser marginalmente deficiente em proteína, promoveu um crescimento similar ao da dieta de elevado teor proteico. Assim sendo, uma elevação do teor em azoto da dieta, tanto de origem proteica como de origem não proteica, conduziu a um "desperdício" do azoto da dieta.

O conteúdo corporal em proteína, lípidos e energia dos robalos não foi significativamente afectado pela composição das dietas. Nos trabalhos apresentados nos capítulos anteriores, também se verificou que a composição corporal dos robalos foi independente da dieta com que os robalos foram alimentados, com excepção do conteúdo lipídico. Para a mesma espécie, Dias (1999) verificou que a variação do teor proteico ou lipídico das dietas não influenciou significativamente a composição corporal dos robalos. No presente trabalho, a incorporação de 12,4% ARN nas dietas conduziu a um aumento do teor corporal em cinzas, tal como foi anteriormente observado quando níveis elevados de ácidos nucleicos foram incorporados nas dietas (Tancon e Cooke, 1980; Davis e Wareham, 1988; Rumsey et al., 1992).

Os valores dos índices hepatossomático e visceral são da mesma ordem de grandeza dos observados nos trabalhos apresentados nos capítulos anteriores. Tal como foi observado no trabalho do capítulo 4, a diminuição do teor proteico das dietas conduziu a um aumento significativo do índice hepatossomático. No presente estudo, a diminuição do teor proteico das dietas foi acompanhada por um aumento da incorporação de dextrina amarela, um hidrato de carbono de elevada digestibilidade para o robalo (Silva e Oliva-Teles, 1998). Deste modo, o aumento do índice hepatossomático deve-se, possivelmente, ao aumento do glicogénio hepático. Uma relação positiva entre os hidratos de carbono digestíveis da dieta e o teor em glicogénio hepático foi também observada nos trabalhos apresentados nos capítulos 5 e 6.

A incorporação do extracto de ARN nas dietas contribuiu para aumentar ainda mais o índice hepatossomático. Este aumento poderá estar relacionado com o aumento do conteúdo em ácidos nucleicos do fígado, uma vez que este é o principal órgão de metabolização dos ácidos nucleicos, inclusivamente nos peixes marinhos (Hayashi et al., 1989). Resultados similares foram observados para a truta arco-íris (Rumsey et al., 1992).

Os resultados deste estudo indicam que a redução do teor proteico das dietas não afectou o crescimento dos robalos tendo, inclusivamente, aumentado significativamente a eficiência de utilização das proteínas devido, sobretudo, a uma diminuição significativa das perdas de azoto metabólico. Contudo, a eficiência de utilização do alimento e da energia foram piores. A incorporação do extracto de ARN nas proporções de 6 e 12%, numa dieta com 17,2 mg proteína digestível/kJ energia digestível, apesar de não ter afectado negativamente a ingestão do alimento ou a eficiência de conversão alimentar reduziu a taxa de crescimento, embora este efeito tenha sido significativo apenas para o nível de suplementação mais elevado. A incorporação do extracto de ARN, em dietas com 17,2 mg proteína digestível/kJ energia digestível, diminuiu significativamente a taxa de retenção proteica e promoveu um aumento significativo da excreção de azoto urinário e branquial, sugerindo que o azoto não proteico ingerido foi integralmente excretado via urinária e branquial. A incorporação do extracto de ARN na dieta não teve qualquer feito na economia da proteína, tendo afectado negativamente a eficiência de utilização da energia.

9. Conclusões Gerais

Neste trabalho julgamos ter contribuído de alguma forma para esclarecer alguns aspectos referentes à utilização das proteínas e da energia por juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*), permitindo assim a formulação de alimentos compostos nutricionalmente mais equilibrados e menos poluentes para esta espécie.

Em síntese e com base nos resultados obtidos, entendemos poder formular as seguintes conclusões:

Necessidades Proteicas e Energéticas de Manutenção

1. As necessidades proteicas de manutenção para os juvenis de robalo, estimadas com base nos dados do ensaio de crescimento ou com base no doseamento da excreção de amónia, são aproximadamente de 1,2 g proteína digestível/kg PM/dia, valor da mesma ordem de grandeza do estimado em condições de jejum, com base na perda de proteína corporal ou na excreção endógena de azoto total (1,0 g/kg PM/dia).

2. As necessidades energéticas de manutenção para os juvenis de robalo foram estimadas em 98,6 kJ energia digestível/kg PM/dia, com base nos dados do ensaio de crescimento, e em 57,2 kJ energia digestível/kg PM/dia, com base nos dados da calorimetria indirecta. Este último valor é aproximado do estimado em condições de jejum, com base na perda de energia corporal ou no consumo de oxigénio de rotina (66 e 50 kJ/kg PM/dia, respectivamente).

Influência da Temperatura na Utilização da Proteína

3. O crescimento e a eficiência de utilização do alimento foram influenciados sobretudo pela temperatura da água e, em menor extensão, pelo teor proteico das dietas experimentais. O aumento da temperatura da água de 18 para 25 °C foi acompanhado por um considerável aumento da taxa de crescimento, da ingestão voluntária e da eficiência de utilização do alimento.

4. As necessidades proteicas para crescimento parecem ser independentes da temperatura da água e foram satisfeitas com uma dieta com 48% de proteína (25 mg proteína digestível / kJ energia digestível).

5. A ingestão voluntária de alimento a 18 °C foi melhor ajustada às necessidades de energia digestível, enquanto que a 25 °C parece ter sido melhor ajustada à ingestão proteica.

6. A utilização da proteína da dieta foi mais eficiente a 18 do que a 25 °C, apesar de se terem observado interacções significativas entre a temperatura e a composição das dietas experimentais.

7. O aumento da temperatura da água foi acompanhado por um aumento significativo, em valores absolutos, da taxa metabólica e da excreção de amónia nos robalos alimentados ou em jejum. Contudo, expressa em percentagem do azoto ingerido, a excreção de amónia não foi afectada quer pela variação térmica quer pelo teor proteico das dietas.

8. Em valores absolutos, o incremento calórico foi significativamente maior a 25 do que a 18 °C, mas expresso em percentagem da energia ingerida não diferiu significativamente entre as temperaturas. A 25 °C o incremento calórico (% energia ingerida) não foi afectado pelo teor proteico das dietas, enquanto que a 18 °C foi significativamente menor com as dietas com 36 e 56% de proteína do que com as restantes dietas.

9. A composição de aminoácidos corporais dos robalos não foi significativamente afectada pela variação do teor proteico das dietas, com excepção do teor em histidina, leucina, fenilalanina e treonina, que foram significativamente maiores nos robalos alimentados com as dietas com 36 e 56% de proteína do que com as restantes dietas.

Efeito do Nível de Inclusão Lipídica da Dieta

10. O aumento do teor lipídico de 12 para 24%, em dietas com 48% de proteína, não melhorou as performances de crescimento ou a eficiência de utilização das dietas. Este aporte suplementar de lípidos não afectou a eficiência de utilização da proteína das dietas,

tendo, no entanto, aumentado significativamente a retenção energética. Isto indica que o robalo não utilizou o aumento de energia, proporcionado pelos lípidos, pelo menos no intervalo testado, para economizar a proteína da dieta para fins de crescimento.

11. A inclusão de 30% de lípidos na dieta, apesar de não ter afectado o crescimento, aumentou significativamente a ingestão de alimento e reduziu significativamente a eficiência de conversão do alimento e a retenção proteica e energética.

12. Neste estudo, a ingestão voluntária de alimento parece ter sido melhor regulada pela quantidade de proteína ingerida do que pela quantidade de energia ingerida.

13. O aumento do teor lipídico das dietas de 18 para 30% contribuiu para diminuir significativamente a excreção azotada, o consumo de oxigénio e o incremento calórico.

Efeito da Disponibilidade dos Hidratos de Carbono da Dieta

14. A redução do teor proteico da dieta de 63 para 50%, mediante a incorporação de amido, não afectou negativamente o crescimento ou a retenção proteica e energética nos robalos, o que indica que a incorporação do amido contribuiu para economizar a proteína da dieta para fins de crescimento.

15. Em dietas com 25% de amido, a substituição total do amido cru por gelatinizado diminuiu significativamente a ingestão voluntária do alimento e a taxa de crescimento específico. Pelo contrário, a eficiência de conversão alimentar e o coeficiente de eficácia proteica aumentaram significativamente com a substituição total do amido cru por gelatinizado. A retenção proteica e energética também aumentaram, embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo.

16. Em dietas com 25% de amido, a excreção de amónia, o consumo de oxigénio e o incremento calórico foram significativamente reduzidos com a substituição total do amido cru por gelatinizado.

17. Embora o crescimento seja negativamente afectado, a substituição total do amido cru por gelatinizado nas dietas pode contribuir para uma redução significativa da carga poluente dos efluentes em matéria orgânica fecal e em compostos azotados solúveis.

Teste de Tolerância à Glucose

18. O robalo e a dourada são capazes de restabelecer os níveis plasmáticos de glucose 12 horas após a injecção intraperitoneal de 1 g de glucose por kg de peso corporal.

19. A resposta metabólica inicial após a sobrecarga de glucose foi, porém, diferente nas duas espécies. Na dourada constatou-se um desvio do fluxo metabólico no sentido de um aumento do catabolismo das reservas corporais, enquanto que no robalo verificou-se um desvio metabólico em sentido contrário, isto é, um aumento do anabolismo.

20. Em ambas as espécies, os valores basais dos diferentes parâmetros analisados, excluindo a glucose plasmática, foram restabelecidos 24 horas após a injecção de glucose.

21. A variação dos triglicerídeos plasmáticos e do glicogénio hepático, nas duas espécies, sugere que estes parâmetros poderão ter um papel importante na regulação da glucose plasmática.

Efeito da Substituição de Azoto Proteico da Dieta por Azoto Não Proteico

22. Em dietas com 18% de lípidos (22,6 kJ/g matéria seca) o teor proteico da dieta pode ser reduzido de 50 para 40% (17,2 mg proteína digestível/kJ energia digestível) sem afectar negativamente o crescimento e aumentando significativamente a eficiência de utilização das proteínas. Contudo, a eficiência de utilização do alimento e da energia foram piores.

23. A incorporação do extracto de ácido ribonucleico (ARN) nas proporções de 6 e 12%, em dietas com 40% de proteína e 18% de lípidos (17,2 mg proteína digestível/kJ energia

digestível), apesar de não ter afectado negativamente a ingestão do alimento ou a eficiência de conversão alimentar reduziu a taxa de crescimento, embora este efeito tenha sido significativo apenas para o nível de suplementação mais elevado.

24. A incorporação de 6 e 12% do extracto de ARN, em dietas com 40% de proteína e 18% de lípidos (17,2 mg proteína digestível/kJ energia digestível), diminuiu significativamente a taxa de retenção proteica e promoveu um aumento significativo da excreção de azoto urinário e branquial, sugerindo que o azoto não proteico ingerido foi integralmente excretado por via urinária e branquial. A incorporação do extracto de ARN não teve qualquer feito na economia da proteína da dieta.

Digestibilidade dos Nutrientes e da Energia

25. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas experimentais aumentaram significativamente com o aumento da taxa de ingestão e da temperatura da água.

26. Em todos os ensaios de digestibilidade efectuados os CDA da proteína foram bastante elevados (92-96 %) e não foram afectados pela composição das dietas.

27. Os CDA dos lípidos foram muito elevados (98 – 99 %) e aumentaram significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas.

28. O CDA do amido gelatinizado (98 %) foi substancialmente mais elevado do que o do amido cru (66 %).

29. Os CDA da energia foram elevados (89–96 %) e aumentaram com o aumento do teor lipídico das dietas ou com a substituição do amido cru por gelatinizado nas dietas.

Composição Corporal dos Robalos

30. De um modo geral, a taxa de ingestão ou a composição das dietas experimentais tiveram pouca influência na composição corporal dos robalos, com excepção do conteúdo lipídico, que aumentou significativamente com o aumento do teor lipídico das dietas.

31. O teor lipídico muscular não foi significativamente influenciado quer pelo aumento do teor lipídico das dietas quer pela substituição do amido cru por gelatinizado nas dietas.

32. Os lípidos foram depositados principalmente nas vísceras, pelo que os índices hepatossomático e visceral reflectiram as variações da composição das dietas.

33. Os índices hepatossomáticos aumentaram com a inclusão de hidratos de carbono digestíveis nas dietas.

34. O teor em glicogénio hepático parece estar correlacionado com o teor em hidratos de carbono digestíveis da dieta, enquanto que os lípidos hepáticos parecem estar correlacionados mais com o teor do que com a origem da energia digestível das dietas (lípidos ou hidratos de carbono).

35. Os índices viscerais foram significativamente maiores a 18 do que a 25 °C e aumentaram com o aumento da energia digestível das dietas.

10. Bibliografia

Ackman, R.G., 1995. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. In: Ruiter, A. (Ed.), Fish and Fishery Products, CAB International, pp. 117-156.

Aguirre, P., Médale , F., Kaushik, S.J, 1995. Influence de la nature des glucides alimentaires sur l'utilisation de deux sources protéines par la truit arc-en-ciel élevée à 8 ou 18 °C. Reprod. Nutr. Dev. 25, 129-136.

Akiyama, T., Arai, S., 1991. Amino acid requirement of chum salmon fry and supplementation of amino acid to diet. Proc. 20th U.S. – Japan Symp. on Aquaculture Nutrition, Newport, Oregon, pp. 35-48.

Akiyama, T., Oohara, I., Yamamoto, T., 1997. Comparison of essential amino acid requirements with A/E ratio among fish species (review paper). Fish. Sci. 63(6), 963-970.

Alanärä, A., 1994. The effect of temperature, dietary energy content and reward level on the demand feeding activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 126, 349-359.

Alava, V.R., De la Cruz, M.C., 1983. Quantitative dietary fat requirements of *Chanos chanos* fingerlings in a controlled environment. In: Int. Milkfish Aquaculture Conf., Iloilo, Philippines.

Alexis, M.N., 1997. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In: Tacon, A., Basurco, B. (Eds.), Feeding Tomorrow's Fish, Proc. Work. CIHEAM Network Technology on Aquaculture in the Mediterranean, Mazarrón, Spain, pp. 183-204.

Alexis, M.N., Papaparaskeva-Papoutsoglou, E., 1986. Amino-transferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. Comp. Biochem. Physiol. 83B, 245-249.

Alliot, E., 1982. Aspects nutricionneles chez le loup (*Dicentrarchus labrax*) en milieu contrôle. Influence des régimes alimentaires et des facteurs de l' environnement sur le bilan azoté. Thesis Doctoral, Fac. Sci. de Luminy, Université de Marseille II, France, pp. 180.

Alliot, E., Pastoureaud, A., 1984. Les besoins alimentaires et leur couverture chez le bar et la daurade. In: Barnabé, G., Billard, R. (Eds.), L' Aquaculture du Bar et des Sparidés, INRA Publ., Paris, pp. 337-349.

Alliot, E., Febvre, A., Métailler, R., Pastoureaud, A., 1974. Besoins nutritifs du bar (*Dicentrarchus labrax*): Étude du taux de protéine et du taux de lipide dans le regime. CNEXO, Actes de Colloque 1, 215-228.

Alliot, E., Pastoureaud, A., Nedelec, J., 1979 a. Etude de l'apport calorique et du rapport calorico-azoté dans l'alimentation du bar *Dicentrarchus labrax*. Influence sur la croissance et la composition corporelle. In: Halver, J.E., Tiews K. (Eds.), Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 241-255.

Alliot, E., Pastoureaud, A., Hudlet, J.P., Métaillar, R., 1979 b. Utilisation des farines végétales et des levures cultivées sur alcanes pour l'alimentation du bar (*Dicentrarchus labrax*). In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), Proc. Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. II, pp. 229-238.

Alliot, E., Pastoureaud, A., Thebault, H., 1983. Influence de la temperature et de la salinite sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 31, 181-194.

Alliot, E., Pastoureaud, A., Thebault, H., 1984. Amelioration des formules d'aliments artificiels chez le loup (*Dicentrarchus labrax*). II Utilisation des glucides. Recherches Biologiques en Aquaculture I, pp. 87-95.

Alsted, N.S., 1991. Studies on the reduction of discharges from fish farms by modification of the diet. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Proc. First Int. Symp. on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, Canada, pp. 77-89.

Alsted, N.S., Jokumsen, A., 1990. The influence of dietary protein, fat ratio on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture, Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, pp. 209-220.

Andersen, N.G., Alsted, N.S., 1993. Growth and body composition of turbot (*Scophthalmus maximus* (L.)) in relation to different lipid/protein ratios in the diet. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 459-491.

Anderson, J., Jackson, A.J., Matty, A.J., Capper, B.S., 1984. Effects of dietary carbohydrate and fiber on the tilapia *Oreochromis niloticus* (Linn). Aquaculture 37, 303-314.

Appelbaum, S., 1979. The sustainability of alkan-yeast (hydrocarbon grown yeast) as a fist nutrient for *Coregonus albula* (L.) fry. Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 515-524.

Arai. S., 1981. A purified test diet for coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47, 547-550.

Arai, S., 1991. Eel, *Anguilla* spp. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 69-70.

Arai, S., Ogata, H., 1991. Quantitative amino acid requirements of fingerlings coho salmon. Proc. 20th U.S. and Japan Symp. on Aquaculture Nutrition, Newport, Oregon, 19-28.

Arnesen, P., Krogdahl, Å., Kristiansen, I., 1993. Lipogenic enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Comp. Biochem. Physiol. 105B, 541-546.

Arzel, J., Martinez-Lopez, F.X., Métailler, R., Stéphan, G., Viau, M., Gandemer, G., Guillaume, J., 1994. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. Aquaculture 123, 361-375.

Aston, R.J., 1981. The availability and quality of power station cooling water for aquaculture. In: Tiews, K. (Ed.), Proc. World Symp. on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems, Berlin, vol. I, pp. 39-58.

Atack, T., Matty, A.J., 1979. The evaluation of some single-cell proteins in the diet of rainbow trout, II. The determination of net protein utilization, biological values and true digestibility. In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), Proc. Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, 261-273.

Atherton, W.D., Aitken, A., 1970. Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri*, Rich.. Comp. Biochem. Physiol. 36, 719-747.

Atkinson, J.L., Hilton, J.W., 1981. Response of rainbow trout to increase dietary carbohydrate. FASEB 40, 3486.

Austreng, E., Skrede, A., Eldegard, A., 1980. Digestibility of fat and fatty acids in rainbow trout and mink. Aquaculture 19, 93-95.

Azevedo, P.A., Cho, C.Y., Leeson, S., Bureau, D.P., 1998. Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Living Resour. 11, 269-272.

Baker, D.H., Molitoris, B.A., 1974. Utilization of nitrogen from selected purines and pyrimidines and from urea by young chick. J. Nutr. 104, 553-557.

Ballestrazzi, R., Lanari, D., Agaro, E.D., Mion, A., 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax)*. Aquaculture 127, 197-206.

Ballestrazzi, R., Lanari, D., Agaro, E.D., 1998. Effect of DP/DE ratio on performance and nutrient retentions in growing European seabass (*Dicentrarchus labrax*) In: Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition, Proc. VIII Int. Symp. Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas, Gran Canaria, Spain, pp. 41.

Barnabé, G., 1990. Rearing Bass and Gilthead Bream. In: Barnabé, G. (Ed.), Aquaculture, Vol. II, (L. Laird, Trans.). Ellis Horword, England, pp. 647-686 (original work published 1989).

Beamish, F.W.H., Thomas, E., 1984. Effects of dietary protein and lipid on nitrogen losses in rainbow trout, *Salmo gairdneri.* Aquaculture 41, 359-371.

Beamish, F.W.H., Medland, T.E., 1986. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri.* Aquaculture 18, 157-167.

Beamish, F.W.H., Trippel, E.A., 1990. Heat increment: a static or dynamic dimension in bioenergetic models? Trans. Am. Fish. Soc. 119, 649-661.

Beamish, F.W.H., Hilton, J.W., Niimi, E., Slinger, S.J., 1986. Dietary carbohydrate and growth, body composition and heat increment in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish Physiol. Biochem. 1, 85-91.

Beck, F., Gropp, J., 1995. Estimation of the starvation losses of nitrogen and energy in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with special regard to protein and energy maintenance requirements. J. Appl. Ichthyol. 11, 263-275.

Bell, J.C., Cowey, C.B., 1985. Roles of vitamin E and selenium in the prevention of pathologies related to fatty acids oxidation in salmonids. In: Cowey, C.B., Macwie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), Nutrition and Feeding in Fish, Academic Press, London, pp. 333-347.

Bell, J.C., Henderson, R.J., Sargent, J.R., 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comp. Biochem. Physiol. 4, 711-719.

Bell, J.C., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995. Effects of different dietary arachidonic acid / docosahexaenoic acid ratio on phospholipid fatty acid composition and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish. Physiol. Biochem. 14, 139-151.

Berger, A., Halver, J.E., 1987. Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate content on the growth, feed efficiency and carcass composition of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaurm), fingerlings. Aquacult. Fish. Manage. 18, 345-356.

Bergot, F., 1979 a. Carbohydrate in rainbow trout diets: effects of the level and source of carbohydrate and the number of meals on growth and body composition. Aquaculture 18, 157-167.

Bergot, F., 1979 b. Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comp. Biochem. Physiol. 63A, 543-547.

Bergot, F., 1993. Digestibility of native starch of various botanical origins by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, pp. 857-865.

Bergot, F., Brèque, J., 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. Aquaculture 22, 81-96.

Boonyaratpalin, M., 1991. Asian seabass, *Lates calcarifer*. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 5-11.

Borlongan, I.G., Coloso, R.M., 1993. Requirements of juvenile milkfish (*Chanos chanos*) for essential amino acids. J. Nutr. 123, 125-132.

Boujard, T., Médale, F., 1994. Regulation of voluntary feed intake in juvenile rainbow trout fed by hand or by self-feeders with diets containing two different protein/energy ratios. Aquat. Living Resour. 7, 211-215.

Bowen, S.H., 1987. Dietary protein requirements of fish. A reassessment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 1995-2001.

Braaten, B.R., 1979. Bioenergetics - a review on methodology. Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology 2, 461-504.

Bradfield, A.E., 1985. Laboratory studies on energy budgets. In: Tytler, P., Calow, P. (Eds.), Fish Energetics: New Perspectives, Croom Helm, London, Sidney, pp. 257-281.

Brauge, C., 1994. Influences des sources non protéiques d'énergie et des facteurs environnementaux sur les métabolismes énergétique et lipidique de la triute arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*. Bordeaux University Thesis Doctoral, 161 pp.

Brauge, C., Médale, F., Corraze, G., 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater Aquaculture 123, 109-120.

Brauge, C., Corraze, G., Médale, F., 1995. Effects of dietary levels of carbohydrates and lipid on glucose oxidation and lipogenesis from glucose in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in freshwater or in seawater. Comp. Biochem. Physiol. 111A, 117-124.

Brett, J.R., Zala, C.A., 1975. Daily patterns of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) under controlled conditions. J. Fish. Res. Bd. Can. 32, 2479-2486.

Brett, J.R., Groves, T.D., 1979. Physiological energetics. In: Fish Physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett., J.R. (Eds.), Academic Press, Vol. 8, pp. 279-350.

Brett, J.R., Shelbourn, J.E., Shoop, C.T., 1969. Growth rate and body composition of fingerling sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to temperature and ration size. J. Fish Res. Bd. Canada 26, 2363-2394.

Brown, P.B., Neill, W.H., Robinson, E.H., 1990. Preliminary evaluation of whole body energy changes as a method of estimation maintenance energy needs of fish. J. Fish Biol. 36, 107-108.

Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J.F., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Bromage, N., 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of *n*-3 and *n*-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. Aquaculture 177, 85-97.

Brule, D., Sarwar, G., Savoir, L., Compbell, J., VanZrggelaar, M., 1988. Differences in uricogenic effects of dietary purine bases, nucleosides, and nucleotides in rats. J. Nutr. 118, 780-786.

Cai, Y., Summerfelt, R.C., 1992. Effects of temperature and size on oxygen consumption and ammonia excretion by walleye. Aquaculture 104, 127-138.

Calderer, A., Castelló-Orvay, F., 1996. Estudio comparativo del crescimento de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) en diferentes condiciones de cultivo. Proc. Actas Sym. Discovery to Commercialization, Worl Aquaculture 93, Torremolinos, Spain, pp. 329.

Castell, J.D., Lee, D.J., Sinnhuber, R.O., 1972. Essential fatty acid in the diet of rainbow trout; Lipid metabolism and fatty acid composition. J. Nutr. 102, 93-99.

Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combination of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 128, 315-333.

Catacutan, M.R., Coloso, R.M., 1995. Effects of dietary protein to energy ratios on growth, survival and body composition of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 131, 125-133.

Catacutan, M.R., Coloso, R.M., 1997. Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. Aquaculture 149, 137-144.

Caulton, M.S., 1977. The effect of temperature on routine metabolism in *Tilapia rendalli* boulenger. J. Fish. Biol. 11, 549-553.

Caulton, M.S., 1978. The effect of temperature on routine metabolism in *Sarotherodon* (Tilapia) *mossambicus* (Peters). J. Fish. Biol. 13, 165-201.

Chakraborty, S.C., Ross, L.G., Ross, B., 1992 a. The effect of dietary protein level and ration level on excretion of ammonia in common carp, *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. 103, 801-808.

Chakraborty, S.C., Ross, L.G., Ross, B., 1992 b. Specific dynamic action and feeding metabolism in common carp, *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. 103, 809-815.

Chakraborty, S.C., Ross, L.G., Ross, B., 1995. Energy budget and metabolism in common carp, *Cyprinus carpio* L., fed on different dietary protein levels and at different ration levels. Aquacult. Nut. 1, 179-187.

Champ, M., Faisant, N., 1992. Technologies et qualites nutritionalles des amidons. Cahiers de l'ENS.BANA 8,

1-23.

Chan, H., W-S., Coxon, D. T., Peers, K. E., Price, K. R., 1982. Oxidative reactions of unsaturated lipids. Food Chemistry 9, 21-34.

Chance, R.E., Mertz, E.T., Halver, J.E., 1964. Nutrition of salmonoid fishes XII. Isoleucine, leucine, valine and phenylalanine requirements of chinook salmon and interrelation between isoleucine and leucine for growth. J. Nutr. 83, 177-185.

Chaves, J.M., Carrillo, M., Thorpe, A., Planas, J., 1982. Plasma insulin measurements in Mediterranean fishes determined by radioimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol. 40, 350.

Chervinki, J., 1975. Sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne) and *D. Punctatus* (Bloch) (Pisces, Serraniade) a control fish in fresh water. Aquaculture 6, 249-256.

Chiu, Y.N., Austic, R.E., Rumsey, G.L., 1984. Effect of dietary electrolytes and histidine on histidine metabolism and acid-base balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 78B (4), 777-783.

Chiu, Y.N., Camacho, A.S., Sastrillo, M.A.S., 1986. Effect of the amino acid supplementation and vitamin level on the growth and survival of milkfish (*Chanos chanos*) fry. In: Maclean, J. L., Dizon, L. B., Hosillos, L.V. (Eds.), Proc. of the First Asian Fisheries Forum, Manila, Philippines, pp. 543-546.

Cho, C.Y., 1982. Effects of dietary protein and lipid levels on energy metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Ehern, P., Sundstø, S. (Eds.), Proc. 9th Symp. on Energy Metabolism on Farm Animals, Norway, pp. 176-179.

Cho, C.Y., 1992. Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. Aquaculture 100, 107-123.

Cho, C.Y., 1993. Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 365-374.

Cho, C.Y., Slinger, S.J., 1979. Effect of water temperature on energy utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Mount, L.E. (Ed.), Proc. 8th Symp. on Energy Metabolism, Butterworth, London, pp. 287-291.

Cho, C.Y., Watanabe, T., 1985. Dietary energy and lipid requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at different water temperatures. In: Moe, P.W., Tyrrell, H.F., Reynolds, P.J. (Eds.), Proc. of the 10th Symp. Energy Metabolism of Farm Animals. EAAO 32, 206-209.

Cho, C.Y., Woodward, B., 1989. Studies on the protein-to-energy ratio in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In. Proc. 11th Symp, Energy Metabolism, Lunteren, pp. 37-40.

Cho, C.Y., Kaushik, S.J., 1990. Nutritional energetic in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). World Review of Nutrition and Dietetics vol. 61, 132-172.

Cho, C.Y., Bayley, H.S., Slinger, S.J., 1976. Energy metabolism in growing rainbow trout (*Salmo gairdneri*): partition of dietary energy in high protein and high fat diets. In: Vermorel, M. (Ed.), Proc. 7th Symp. on Energy Metabolism, Vichy, France, pp. 299-302.

Cho, C. Y., Slinger, S. J., Bayley, H. S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. Comp. Biochem. Physiol. 73, 25-41.

Cho, C.Y., Cowey, C.B., Watanabe, T., 1985. Finfish Nutrition in Asia. Methodological approaches to research and development. International Development Research Center, Ottawa, Ontario, Publ. N°. IDRC- 233a, 154 pp.

Choubert, G., Fauconneau, B., Luquet, P., 1982. Influence d'une elevation de la température de l'eau sur la digestibilité de la matière sèche, de l'azote et de l'énergie de l'aliment distribué à la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Reprod. Nutr. Dévelop. 22(6), 941-949.

Clarke, W.C., Higgs, D.A., Marterk, J.R., Shelbourn, J.E., Castledine, A.L., 1982. Effects of varying dietary protein / lipid ratios on growth and body composition of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) reared at different temperatures. Can. Data. Rep. Fish. Aquat. Sci. 373, Vol. IV, pp. 18.

Clifford, A.J., Story, D.L., 1976. Levels of purine in foods and their metabolic effects in rats. J. Nutr. 106, 435-442.

CNEXO, 1983. Fiches biotechniques d'aquaculture. Le Loup. Cnexo Ed., Paris. 102pp.

Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 1999. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diet. Aquaculture 171, 279-292.

Corraze, G., 1994. Nutrition lipidique des poissons, importance et conséquences. La Pisciculture Francese 117, 25-36.

Corraze, G., 1997. Modulation de la composition lipidique et de la qualite de la chair de poisson par l' alimentation. In: Actes de le Colloque Annuel Critt Valicentre, Matière Premières-Nutrition Animale, Tours, pp. 43-50.

Corraze, G., Larroquet, L., Maisse, G., Blanc, D., Kaushik, S.J., 1993. Effects of temperature and of dietary lipid origin on female broodstock performance and fatty acid composition of the eggs of rainbow trout. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 61-66.

Corraze, G., Aires, T., Médale, F., 1998. Dietary starch levels affect the activity of enzymes involved in lipogenesis in gilthead sea bream. In: Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition, Proc. VIII Int. Symp. on Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas, Gran Canaria, Spain, pp. 57.

Coves, D., Dewavrin, G., Breuil, G., Devauchelle, N., 1991. Culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Mevey, J.P. (Ed.), Handbook of Mariculture, Vol. II, CRC Press, Boston, pp. 3-20.

Cowey, C.B., 1975. Aspects of protein utilization by fish. Proc. Nutr. Soc. 34, 57-63.

Cowey, C.B., 1988. The nutrition of fish: the developing scene. Nutrition Research Reviews 1, 255-280.

Cowey, C.B., 1992. Nutrition: estimating requirements of rainbow trout. Aquaculture 100, 177-189.

Cowey, C.B., 1993. Some effects of nutrition and flesh quality of cultured fish. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Fish Nutrition and Feeding, Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 227-236.

Cowey, C.B., 1994. Amino acid requirements of fish; a critical appraisal of present values. Aquaculture 124, 1-11.

Cowey, C.B., Luquet, P., 1983. Physiological basis of protein requirements of fishes. Critical analysis of allowances. Protein Metabolism and Nutrition Vol. I, INRA Publications, pp. 365-384.

Cowey, C.B., Walton, M.J., 1989. Intermediary metabolism. In: Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition, 2nd ed. Academic Press, New York, pp. 259-329.

Cowey, C.B., Cho, C.Y., 1991. Nutritional Strategies and Aquaculture Waste. Univ. Guelph, Guelph, Canada, 275 pp.

Cowey, C.B., Adron, J.W., Brown, D.A., 1975. Studies on nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice (*Pleuronectes platessa*) and the effect of dietary energy source on protein utilization on plaice. Br. J. Nutr. 33, 463-470.

Cowey, C.B., Knox, D., Walton, M.J., Adron, J.W., 1977. The regulation gluconeogenesis by diet and insuline in rainbow trout. Br. J. Nutr. 38, 463-470.

Cowey, C.B., Cooke, D.J., Matty, A.J., Adron, J.W., 1981. Effects of quantity and quality of dietary protein on certain enzymes activities in rainbow trout. J. Nutr. 111, 336-345.

Cowey, C.B., Adron, J.W., Youngson, A., 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. Aquaculture 30, 85-3.

Cowey, C. D., Begener, E., Tacon, A., Youngson, A., Bell, J., 1984. The effect of vitamin E and oxidised fish oil on nutrition of rainbow tout growth at natural, varying water temperatures. Brit. J. Nutr. 51, 443-451.

Cromwell, G.L., Stahly, T.S., Gomez-Rojas, V., Monegue, H.J., 1983. Amino acid supplementation of a low-protein diet for finishing pigs. J. Anim. Sci. 57 (suppl. 1), 50.

Cui, Y., Wooton, R. J., 1988. Bioenergetics of growth of a cyprinid, *Phoxinus phoxinus* (L.) (Pisces: Cyprinidae). Funct. Ecol. 2, 57-62.

Dalla-Via , J., Villani, P., Gasteiger, E., Niederstatter, H., 1989. Effects of salinity and handling stress on metabolic rate of *Dicentrarchus labrax*. E.A.S., Special Publication 10, 79-80.

Dalla-Via, J., Villani, P., Gasteiger, E., Niederstätter, H., 1998. Oxygen consumption in sea bass fingerling *Dicentrarchus labrax* exposed to acute salinity and temperature changes: metabolic basis for maximum stocking density estimations. Aquaculture 169, 303-313.

Davis, S.J., Wareham, H., 1988. A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). Aquaculture 73, 189-199.

De La Higuera, M., Sanchez-Munz, F.J., Mataix, F.J., Varela, G., 1981. Nitrogen utilization by rainbow trout fed on yeast *Hansenula anamola*. Comp. Biochem. Physiol. 69A, 583-586.

De Silva, S.S., Perera, M.K., 1985. Effects of protein level on growth, food conversion and protein use in young *Tilapia nilotica* at four salinities. Trans. Am. Fish. Sci. 114, 584-589.

De Silva, S.S., Gunasekera, R.M., Atapattu, D., 1989. The dietary protein requirements of young tilapia and an evaluation of the least cost dietary protein levels. Aquaculture 80, 271-284.

Degani, G., Viola, S., 1987. The protein sparing effect of carbohydrates in the diets of eels (*Anguilla anguilla*). Aquaculture 64, 283-291.

DeLong, D.C., Halver, J.E., Mertz, E.T., 1958. Nutrition of salmonid fishes VI. Protein requirements of chinook salmon at two water temperatures. J. Nutr. 65, 589-599.

Deshimaru, O., Kuroki, K., 1983. Studies on the optimal levels of protein and lipid in yellowtail diets. In: Reports of Kagoshima Prefectural Fishery Experimental Station. Kagoshima, Japan, pp. 44-79.

Deshimaru, O., Kuroki, K., Shintani, K., 1986. Studies on nutrition of lipids and protein in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) diet. Reports of Kagoshima Perfectural Fishery Experimental Station, pp. 1-48.

Dias, J., 1999. Lipid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European seabass (*Dicentrarchus*

labrax): nutritional regulation of hepatic lipogenesis. Thesis Doctoral, Universidade do Porto, Portugal and Université de Bordeux I, France, pp.190.

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

Dosdat, A., Servais, F., Metailler, R., Huelvan, C., Desbruyères, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. Aquaculture 141, 107-127.

Duncan, D.B., 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11, 1-42.

Eccles, D.H., 1985. The effect of temperature and mass on routine oxygen consumption in the South African cyprinid fish *Barbus aeneus* Burcell. J. Fish. Biol. 27, 155-165.

Echevarría, G., Martínez-Bebía, M., Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comp. Biochem. Physiol. 118, 111-123.

EIFAC, 1993. Report of EIFAC Workshop on methodology for determination of nutrient requirement in fish. In: Gropp, J.M., Tacon, A. (Eds.), EIFAC Occasional Paper N°. 29, Rome, FAO, 92 pp.

Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., 1993. Differential effects of somatostatin-14 and somatostatin-25 on carbohydrate and lipid metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 92, 62-70.

El-Kerdawy, A., Salama, A., 1997. Effect of dietary lipid sources on the growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). In: Tacon, A., Basurco, B. (Eds.), Feeding-Tomorrow's Fish, Proc. Workshop CIHEAM, Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean TECAM, Mazarron, Spain, CIHEAM, 22 pp. 235-241.

Elliott, J.M., 1976 a. Body composition of brown trout (*Salmo trutta*) in relation to temperature and ration size. J. Anim. Ecol. 45, 273-281

Elliott, J.M., 1976 b. Energy losses in waste products of brown trout (*Salmo trutta* L.). J. Anim. Ecol. 45, 561-580.

Elliott, J.M., 1978. The energetics of feeding metabolism and growth of brown trout (*Salmo trutta*) in relation to body weight, water temperature and ration size. J. Anim. Ecol. 47, 923-948.

Elliott, J.M., Davison, W., 1975. Energy equivalents of oxygen consumption in animal energetics. Oecologia 19, 383-394.

Ellis, S.C., Reigh, R.C., 1991. effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile Red Drum, *Sciaenops oecllatus*. Aquaculture 97, 383-394.

El-Sayed, A.M., 1987. Protein and energy requirements of *Tilapia zillii*. Ph.D. Dissertation. Michigan State University. East Lansing, Mich (citado por NCR, 1993).

El-Sayed, A.M., Garling, D.L., 1988. Carbohydrate-to-lipid ratios in diets for *Tilapia zillii* fingerlings. Aquaculture 73, 157-163.

El-Sayed, A.-F. M., Teshima, S., 1992. Protein and energy requirements of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fry. Aquaculture 103, 55-63.

Fair, P.H., Williams, W.P., Smith, T.I., 1993. Effect of dietary menhaden oil on growth and muscle fatty acid composition of hybrid striped bass. *Morone chrysops x Morone saxailis*. Aquaculture 116, 171-189.

FAO (Food and Agriculture Organization), 1997. Review of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular, N°. 886, Rev.1, pp. 55-66.

Fauconneau, B., 1985. Protein synthesis and protein deposition in fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), Nutrition and Feeding in Fish, Academic Press, London, pp. 17-45.

Fauconneau, B., Choubert, G., Blanc, D., Brèque, J., Luquet, P., 1983. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. Aquaculture 34, 27-39.

Fernández, F., Miquel, A.G., Guinea, J., Martínez, R., 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the effect of diet composition and ration size. Aquaculture 166, 67-84.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J.M., 1995. Effect of *n*-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture 132, 325-337.

Filipiak, J., 1991. Effect of different protein level feed doses on growth of carp (C_{1-2}) cage reared in heated water. Aquaculture and Environment 14, 101-102.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem. 226, 497-509.

Forsberg, J., Summerfelt, R.C., 1992. Effect of temperature on dial ammonia excretion of fingerlings walleye. Aquaculture 102, 115-126.

Frigg, M., Prabucki, A.L., Ruhdel, E.U., 1990. Effect of dietary vitamin-E levels on oxidative stability of trout fillets. Aquaculture 84, 145-158.

Furuichi, M., 1983. Studies on the utilization of carbohydrates by fishes. Rept. Fish. Res. Lab. Kiushu Univ. 6, 1-59.

Furuichi, M., Yone, Y., 1971. Studies on nutrition of red sea bream. 4. Nutritive value of dietary carbohydrates. Rep. Fish. Res. Lab. (Japan) 1, 75-81.

Furuichi, M., Yone, Y., 1980. Effects of dietary dextrine levels on the growth and feed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle, and the absorption of dietary protein and dextrine in fishes. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46, 225-229.

Furuichi, M., Yone, Y., 1981. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47, 761-764.

Furuichi, M., Yone, Y. 1982 a. Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red sea bream. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48, 945-948.

Furuichi, M., Yone, Y., 1982 b. Effects of insulin on blood sugar levels on fishes. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48, 1289-1291.

Furuichi, M., Yone, Y., 1982 c. Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrates metabolism of fishes in glucose and insuline-glucose tolerance test. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48, 463-466.

Furuichi, M., Yone, Y., 1986. Availability of carbohydrate in nutrition of yellowtail. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52, 99-102.

Furuichi, M., Ito, G., Yone, Y., 1987. Effects of α-starch on growth, feed efficiency and chemical components of liver, muscle and blood of carp and red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 1437-1442.

Furukawa, A., Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 32, 502-506.

Fynn-Aikins, K., Hung, S., Liu, W., Li, H., 1992. Growth lipogenesis and liver composition of juvenile white sturgeon fed different levels of D-glucose. Aquaculture 105, 61-72.

Garcia-Gallego, M. Zamora, S., Lopez, M.A., 1981. The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by rainbow trout *Salmo gairdneri.* Comp. Biochem. Physiol. 68, 457-460.

Garcia-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Suarez, M.D., Sanz, A., De La Higuera, M., 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla.* II Influence of dietary lipid level. Comp. Biochem. Physiol. 105, 171-175.

Garcia-Riera, M.P., Hemre, G.-I., 1996. Glucose tolerance in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquacult. Nutr. 2, 117-120.

Gardner, W.S., Miller, W.H., 1980. Reverse-phase liquid chromatography of amino acids after reaction with o-phthalaldehyde. Anal. Biochem. 101, 61-70.

Garling, D.L., Wilson, R.P., 1976. The optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus.* J. Nutr. 106, 1368-1375.

Garling, D.L., Wilson, R.P., 1977. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerlings channel catfish. Prog. Fish-Cult. 39, 4347.

Gatesoupe, F.J., Leger, C., Méatiller, R., Luquet, P., 1977. Alimentation lipidique du turbot (*Scopthalmus maximus* L.). 1. Influence de la longueur de chaine des acides gras de la serie ω-3. Annu. Hydrobiol. 8, 89-97.

Gatlin III, D.M., 1987. Whole-body amino acid composition and comparative aspects of amino acid nutrition of the Goldfish, Golden Shiner and Fathead Minnow. Aquaculture 60, 223-229.

Gatlin III, D.M., Poe, W.E., Wilson, R.P., 1986. Protein and energy requirements of fingerling channel catfish for maintenance and for maximum growth. J. Nut. 116, 2121-2131.

Gélineau, A., Médale, F., Boujard, T., 1998. Effect of feeding time on post-prandial nitrogen excretion and energy expenditure in rainbow trout. J. Fish. Biol. 52, 655-664.

Gershanovich, A.D., Pototskij, I.V., 1992. The peculiarities of nitrogen in sturgeon (*Acipenser ruthenus*) (Pisces, Acipenseridae) - I. Influence of ration size. Comp. Biochem. Physiol. 103, 609-612.

Giesecke, D., Gaebler, S., Tiemayer, W., 1982. Purine availability and metabolism in dogs fed single cell protein or RNA. J. Nutr. 112, 1822, 1826.

Gnaiger, E., 1983. Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. Appendix C. In: Gnaiger, E., Forstner, F. (Eds.), Polarographic Oxigen Sensors, Spring-Verlag, Heidelberg, pp. 337-345.

Gomes, E.F., Rema, P., Gouveia, A., Oliva-Teles, A., 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances. Wat. Sci. Tech. 31, 205-211.

Goolish, E.M., Adelman, I.R., 1984. Effects of ration size and temperature on the growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 36, 27-35.

Gouveia, A., 1994. Aquaculture in Portugal - state of the art, constrains and perspectives. Magazine of the European Aquaculture Society 19, 23-28.

Gouveia, A., Oliva-Teles, A., Gomes, E., Peres, M.H., 1995. The effect of two dietary levels of raw and gelatinized starch on growth and food utilization by the European sea bass. In: Castelló, I., Orvay, F., Calderer, I., Reig, A., Proc. of the Fifth National Congress on Aquaculture, Univ. Barcelona, Spain, pp. 516-521.

Greene, D.H.S., Selivonchick, D.P., 1987. Lipid metabolism in fish. Prog. Lipid Res. 26, 53-85.

Greene, D.H.S., Selivonchik, D.P., 1990. Effects of dietary vegetal, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout. Aquaculture 89, 165-182.

Greife, H.A., Nofer, E., Molnar, S., 1981. Protein quality of dietary yeast-ribonucleic acid studies in growing rats. Arch. Tierernahr. 31, 667-673.

Grisdale-Helland, B., Helland, S.J., 1997. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage. Aquaculture 152, 167-180.

Gropp, J., Koops, H., Tiews, K., Beck, H., 1979. Replacement of fishmeal by other feedstuffs. In: Pillay, T.V.R., Dill, W.A. (Eds.), Advances in Aquaculture, Fishing News Books, Farnham, Surrey, Great Britain, pp. 596-601.

Guerin-Ancey, O., 1976. Etude experimentale de l'excretion azotee du bar (*Dicentrarchus labrax*) en cours de croissance. I. Effects de la temperature et du poids du corps sur l'excretion d'ammoniac et d'uree. Aquaculture 9, 71-80.

Guillaume, J., 1995. Principales caractéristiques de la nutrition des poissons et en particulier des salmonidés. N.S.T. 13, 71-77.

Guillaume, J., Coustans, M.-F., Métailler, R., Person-Le Ruyet, J., Robin, J., 1991. Flatfish, turbot, sole and plaice. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrient Requirements of Finfish. CRC Press, Boca Raton, pp. 77-82.

Guillaume, J., Arzel, J., Stephan, G., Fauconneau, B., 1996. Lipides et qualité de la chair de poisson. In: Actes Journées Chevreul, Lipides et Qualité des Aliments d'Origine Animale, Nantes, pp. 47-59.

Guinea, J., Fernandez, F., 1991. The effect of SDA, temperature and daily rhythm on the energy metabolism of the mullet *Mugil saliens*. Aquaculture 97, 353-364.

Guinea, J., Fernandez, F., 1997. Effect of feeding frequency, feeding level and temperature on energy metabolism in *Sparus aurata*. Aquaculture 148, 125-142.

Gutiérrez, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Planas, J., 1984. Daily rhythms of insulin and glucose in plasma of seabass *Dicentrarchus labrax*, after experimental feeding. Gen. Comp. Endocrinol. 55, 393-397.

Gutiérrez, J., Fernández, J., Blasco, J., Gesse, J.M., Planas, J., 1986. Plasma glucagon levels in different species of fish. Gen. Comp. Endocrinol. 63, 328-333.

Gutiérrez, J., Åsgård, T., Fabbri, E., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. Fish. Physiol. Biochem. 9, 351-360.

Haddj-Kacem, N., Aldrin, J.F., Romestand, B., 1987. Influence immédiate d'une augmentation rapide detemperature sur certains paramétres sanguins du "loup", *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 64, 325-331.

Halver, J.E., 1965. Tryptophan requirements of chinook, sockeye and silver salmon. Fed. Proc. 24, 169.

Halver, J.E., Delong, D.C., Mertz, E.T., 1958. Threonine and lysine requirements of Chinook salmon. Fed. Proc. 17, 478.

Halver, J.E., Delong, D.C., Mertz, E.T., 1959. Methionine and cystine requirements of chinook salmon. Fed. Proc. 18, 2076.

Hardy, R.W., 1991. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 105-121.

Hardy, R.W., Roby, D.D., 1998. Lipid oxidation, prevention, detection and biological effects on fish. In: Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition, Proc. VIII Int. Symp. on Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas, Gran Canaria, Spain, pp. 75.

Hardy, R.W., Scott, T.M., Harrell, L.W., 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil soybean oil or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. Aquaculture 65, 267-277.

Harmon, J.S., Sheridan, M.A., 1992. Effects of nutritional state, insulin and glucagon on lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 87, 214-221.

Harmon, J.S., Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. Am. J. Physiol. 261 (3), R609-R613.

Harmon, J.S., Rieniets, L.M., Sheridan, M.A., 1993. Glucagon and insulin regulate lipolysis in trout liver by altering phosphorylation of triacylglycerol lipase. Am. J. Physiol. 265, R255-R260.

Harpaz, S., 1991. Comparison of different feeds for juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*) reared in freshwater. In: Pauw, N., Joyce, J. (Compilers), Aquaculture and the Environment. EAS Spec. Publ. 14, 136-137.

Hasan, M.R., Macintosh, D.J. 1993. Effect of environmental temperature and feeding rate on the growth, food utilization and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 767-778.

Hayashi, S., Fujiwara, S., Noguchi, T., 1989. Degradation of uric acid in fish liver peroxisomes. Intraperoxisomal localization of hepatic allantoicase and purification of its peroxisomal membrane-bound form. J. Biol. Chem. 264, 3211-3215.

Helland, S., Storebakken, T., Grisdale-Helland, B., 1991. Atlantic Salmon, *Salmo salar*. In. Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrient Requirement of Finfish. CRC Press, Boca Raton, pp. 13-22.

Hemre, G.-I., Lie, Ø., Lied, E., Lambertsen, G., 1989. Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. Aquaculture 80, 261-270.

Hemre, G.-I., Lambertsen, G., Lie, Ø., 1991. The effect of dietary carbohydrate on the stress response in cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 95, 319-328.

Hemre, G.-I., Lie, Ø., Sundby, A., 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): metabolic response to feeding and fasting. Fish. Physiol. Biochem. 6, 455-463.

Hemre, G.-I., Torrissen, O., Krogdahl, A., Lie, Ø., 1995 a. Glucose tolerance in Atlantic salmon *Salmo salar* L., dependence on adaptation to dietary starch and water temperature. Aqua. Nut. 1, 69-75.

Hemre, G.-I., Sandnes, K., Lie, Ø., Torrissen, O., Waagbø. R., 1995 b. Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon *Salmo salar* L., growth and feed utilization. Aqua. Res. 26, 149-154.

Hemre, G.-I., Sandnes, K., Lie, Ø., Waagbø, R., 1995 c. Blood chemistry and organ nutrient composition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed graded amounts of wheat starch. Aqua. Nut. 1, 37-42.

Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. Prog. Lipid Res. 26, 281-347.

Henry, Y., 1993. Affinement du concept de la protéine idéale pour le porc en croissance, INRA Prod. Anim. 6, 199-212.

Hernández, M., Takeuchi, T., Watanabe, T., 1994. Effect of gelatinized corn meal as a carbohydrate source on growth performance, intestinal evacuation, and starch digestion in common carp. Fisheries Science 60(5), 579-582.

Hertz, Y., Epstein, N., Abraham, M., Madar, Z., Hepoher, B., Gertler, A., 1989. Effects of metamorfine on plasma insulin, glucose metabolism and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus cyprinus* L.). Aquaculture 80, 175-187.

Hidalgo, F., Alliot, E., 1988. Influence of water temperature on protein requirements and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 72, 115-129.

Hidalgo, F., Alliot, E., Thebault, H., 1987 a. Influence of water temperature on food intake, food efficiency and gross composition of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 64, 199-207.

Hidalgo, F., Alliot, E., Thebault, H., 1987 b. Methionine- and cystine-supplemented diets for juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 64, 209-217.

Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture 170, 267-283.

Higuera, M., Murillo, A., Varela, G., Zamora, S., 1977. The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 56, 37-41.

Hillestrad, M., Johnsen, F., 1994. High energy / low protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. Aquaculture 124, 109-116.

Hilton, J.W., 1982. The effect of pre-feeding diet and water temperature on liver glycogen and liver weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during fasting. J. Fish Biol. 20, 69-78.

Hilton, J.W., Atkinson, J.L., 1982. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increase levels of available carbohydrates in practical trout diets. Br. J. Nutr. 47, 597-607.

Hilton, J.W., Atkinson, J.L., Slinger, S.J., 1982. Maximum tolerable level, digestion and metabolism of D-glucose (cerelose) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) reared on a practical trout diet. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 1229-1234.

Hofer, R., 1979 a. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd, *Scardinius eryrophtalmus* L. I. Amylase. J. Fish Biol. 14, 565-572.

Hofer, R., 1979 b. The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd, *Scardinius eryrophtalmus* L. II. Proteases. J. Fish Biol. 14, 373-379.

Hofer, R., Sturmbauer, C., 1985. Inhibition of trout and carp α-amylase by wheat. Aquaculture 48, 277-283.

Hogendoorn, H., Jansen, J.A.J., Koops, W.P., Machiels, M.A.M., van Ewijk, P.H., van Hees, J.P., 1983. Growth and production of the African catfish, *Clarias lazera*. II. Effects of body weight, temperature and feeding level in intensive tank culture. Aquaculture 34, 265-285.

Houlihan, D.F., McMillan, D.N., Laurent, P., 1986. Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: effects of body size. Physiol. Zool. 59, 482-493.

Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C., 1989. Effects of ration on protein turnover in cod. Aquaculture 79, 103-110.

Huisman, E.A., 1976. Food conversion efficiencies at maintenance and production levels for carp, *Cyprinus carpio* L., and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Aquaculture 9, 259-273.

Huisman, E.A., Breteler, J.G.P.K., Visman, M.M., Kanis, E., 1979. Retention of energy, protein, fat and ash in growing carp (*Cyprinus carpio* L.) under different feeding and temperature regimes. In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 175-189.

Hung, S.S.O., Storebakken, T., 1994. Carbohydrate utilization by rainbow trout is affected by feeding strategy. J. Nutr. 124, 223-230.

Hung, S.S.O., Cho, C.Y., Slinger, S.J., 1980. Measurement of oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets of marine zooplankton. Comp. Biochem. Physiol. 76, 565-570.

Hung, S.S.O., Conte, F.S., Hallen, E.F., 1993. Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. Aquaculture 121, 349-361.

Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H., Storebakken, T., Cui, Y., 1997. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acienser transmontanus*. Aquaculture 151, 357-383.

Hutchins, C.G., Rawles, S.D., Gatlin III, D.M., 1998. Effects of dietary carbohydrates kind and level on growth, body composition and glicemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops; female* × *M. saxatilis; male*). Aquaculture 161, 187-199.

Hutchinson, V.H., Kohl, M.A., 1971. The effect of photoperiod on daily rhythms of oxygen consumption in the tropical toad, *Bufo marinus*. V. Vergl. Physiol. 75, 367-382. (citado por LeGrow e Beamish, 1986).

Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S., Lorenzo, A., 1996. Influence of dietary n-3 HUPA levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 142, 221-235.

Ibeas, C., Cejas, J., Fores, R., Bádia, P., Gómez, T., Lorenzo, A., 1997. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoi acid ratio (EPA/DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Aquaculture 150, 91-102.

Iwata, N., Kikuchi, K., Honda, H., Kiyono, M., Kurokura, H., 1994. Effect of temperature on the growth of Japanese flounder. Fish. Sci. 60(5), 527-531.

Jacobsen, C., Børresen, T., 1995. Formulation of fish diets with reduced phosphorous content. Wat. Sci. Tech. 31, 167-173.

Jayaram, M., Beamish, F.W.H., 1992. Influence of protein and lipid on nitrogen and energy losses in lake trout, *Salvelinus namaycush*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49, 2267-2272.

Jeong, K.S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 1991. Improvement of nutritional quality of carbohydrate ingredient by extrusion process in diets of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 57, 1543-1549.

Jeong, K.S., Takeuchi, T., Okamoto, N., Watanabe, T., 1992 a. The effects of dietary gelatinized ratios at different dietary energy on growth and characteristic of blood in rainbow trout fingerlings. Nippon Siusan Gakkaishi 58, 937-944.

Jeong, K.S., Takeuchi, T., Okamoto, N., Watanabe, T., 1992 b. The effects of dietary gelatinized ratios at different dietary energy on growth and characteristic of blood in carp fingerlings. Nippon Siusan Gakkaishi 58, 945-951.

Jobling, M., 1981. The influence of feeding on metabolic rate of fishes: a short review. J. Fish Biol. 18, 385-400.

Jobling, M., 1983. Influence of body weight and temperature on growth rate of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). J. Fish Biol. 22, 471.

Jobling, M., 1994. Respiration and metabolism. In: Jobling, M. (Ed.), Fish Bioenergetics, Chapman and Hall, London, pp. 121-145.

Jobling, M., Davis, P.S., 1980. Effects of feeding on metabolic rate, and specific dynamic action of plaice, *Pleuronectes platessa* L. J. Fish. Biol. 16, 629-638.

Johnsen, F., Wandsvik, A., 1991. The impact of high energy diets on pollution control in the fish farming industry. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Proc. First Int. Symp. on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, Canada, pp. 51-63.

Johnsen, F., Hillestad, M., Austreng, E., 1993. High energy diets for Atlantic salmon, effects on pollution. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Fish Nutrition and Feeding, Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 391-401.

Kalogeropoulos, N., Alexis, M.N., Henderson, R.J., 1992. Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 104, 293-308.

Kanazawa, A., Teshima, S.I., Ono, K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and capacity for bioconverson of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. Comp. Biochem. Physiol. 63, 295-298.

Kanazawa, A., Teshima, S.I., Sakamoto, M., Awal, M.A., 1980. Requirement of *Tilapia zillii* for essential fatty acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46, 1353-1356.

Karasawa, Y., Kubota, T., 1990. Effect of dietary RNA on growth and food intake of young chicks. Jpn. Pout. Sci. 27, 165-172.

Kaushik, S., 1979. Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish: Quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities. In: Halver J.E., Tiews, K. (Eds.), Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 197-207.

Kaushik, S.J., 1980. Influence of the nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus carpio*) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Reprod. Nutr. Dev. 20, 1751-1765

Kaushik, S.J., 1981. Influence of a rise in temperature on the nitrogen excretion of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). In: Tiews, K. (Ed.), Proc. World Symp. on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems, Berlin, Vol. I, pp. 77-82.

Kaushik, S.J., 1989 a. Status of European aquaculture and fish nutrition In: Proc. of the 3rd Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish. Toba, Japan, pp. 3-12.

Kaushik, S.J., 1989 b. Nitrogen and energy balance studies in fish. In: Nose T. (Ed.), Protein and Amino Acid Nutrition in Fish, pp. 71-85.

Kaushik, S.J., 1990 a. Use of alternative protein sources for the intensive reading of carnivorous fish. In: Shiau, S.Y. (Ed.), Progress in Fish Nutrition. Marine Food Science Series 9, 125-138.

Kaushik, S.J., 1990 b. Importance des lipides dans l'alimentation des poisson. Aqua Revue 29, 9-16.

Kaushik, S.J., 1990 c. Nutrition et alimentation des poisson et contrôle des déchets piscicoles. La Pisciculture Francese 101, 14-23.

Kaushik, S.J., 1994. Nutritional strategies for the reduction of aquaculture wastes. In: Proc. of the Fisheries and Ocean Industrial Development, Research Center for Ocean Industrial Development, Pursan, Korea, pp. 115-132.

Kaushik, S.J., 1995 a. Protein nutrition and metabolism in fish. In: Nunes, A.F., Portugal, J.P., Ribeiro, J.R. (Eds.), Proc. of the 7th Int. Symp. on Protein Metabolism and Nutrition, Vale de Santarém, Portugal, EAAP Pub. 81, pp. 47-56.

Kaushik, S.J., 1995 b. Nutrient requirement, supply and utilization in the context of carp culture. Aquaculture 129, 225-241.

Kaushik, S.J., 1996 a. Problemes et prespectives en production animale en milieu aquatique. Communication à l' Académie de Médecine, Paris, 12pp.

Kaushik, S.J., 1996 b. Feed quality and feeding strategies for sustained aquaculture development. Suisanzoshoku H8, 231-234.

Kaushik, S.J., 1997 a. Nutrition and improvement of the seabass and seabream production in the Mediterranean region. INVE Conference, ALIIA Tradeshow, Thessaloniki, Greece.

Kaushik, S.J., 1997 b. Nutrition – Alimentation et composition corporelle chez le poisson. Cah. Nutr. Diet. 32, 100-106.

Kaushik, S.J., Luquet, P., 1980. Influence of bacterial protein incorporation and of sulphur amino acid supplementation to such diets on growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Aquaculture 19, 163-175.

Kaushik, S.J., Luquet, P., 1984. Relationship between protein intake and voluntary energy intake as affected by body weight with an estimation of maintenance needs in rainbow trout. Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd. 51, 57-69.

Kaushik, S.J., Oliva-Teles, A., 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50, 89-101.

Kaushik, S.J., Gomes, E.F., 1988. Effect of frequency of feeding on nitrogen and energy balance in rainbow trout under maintenance conditions. Aquaculture 73, 207-216.

Kaushik , S.J., Cowey, C.B., 1991. Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Proc. First Int. Symp. on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, Canada, pp. 3-19.

Kaushik, S.J., Mambrini, M., 1994. Nutrition azotée des poissons, remplacement partiel ou total de la farine de poissons. La Pisciculture Francese 118, 12-20.

Kaushik, S.J., Médale, F., 1994. Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. Aquaculture 124, 81-97.

Kaushik, S.J., Luquet, P., Blanc, D., 1981. Usefulness of feeding protein and non-protein calories apart in studies on energy-protein interrelationships in rainbow trout. Ann. Zootech. 30 (1), 3-11.

Kaushik, S.J., Médale, F., Fauconneau, B., Blanc, D., 1989 a. Effect of digestible carbohydrates on protein / energy utilization and on glucose metabolism in rainbow trout *(Salmo gairdneri* R.). Aquaculture 79, 161-169

Kaushik, S.J., Luquet, P., Blanc, D., Paba, A., 1989 b. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. I. Utilization of digestible carbohydrates by sturgeon. Aquaculture 76, 97-107.

Kaushik, S.J., Breque, J., Blanc, D., 1991. Requirements for protein and essential amino acids and their utilization by Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). In: Williot, P. (Ed.), Proc. of the Int. Conf. of Sturgeon, Antony, France, Cemagref-Dicova Publ., pp. 25-39.

Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995 a. Partial and total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterol and flesh quality in rainbow trout. Aquaculture 133, 257-274.

Kaushik, S.J., Doudet, T., Médale, F., Aguirre, P., Blanc, D., 1995 b. Protein and energy needs for maintenance and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Appl. Ichthyol. 11, 290-296.

Keembiyehetty, C.N., Wilson, R.P., 1998. Effect of water temperature on growth and nutrient utilization of sunshine bass (*Morone chrysops* & female; × *Morone saxatilis* & male;) fed diets containing different energy/protein ratios. Aquaculture 166, 151-162.

Ketola, H.G., 1982. Amino acid nutrition of fish: requirements and supplementation of diets. Comp. Biochem. Physiol. 73, 17-24.

Ketola, H.G., Hapland, B.F., 1993. Influence of phosphorus in rainbow trout diets on phosphorus discharges in effluent water. Trans. American Fish. Soc. 122, 1120-1126.

Kiaerskou, J., 1991. Production and economics of "low pollution diets" for the aquaculture industry. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Proc. First Int. Symp. on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste, Ontario, Canada, pp. 51-63.

Kihlberg, R., 1972. The microbe as a source of food. Annu. Rev. Microbiol. 26, 427-454.

Kikuchi, K., Sato, T., Iwata, N., 1995. Effects of temperature on nitrogenous excretion of Japanese flounder. Fish. Sci. 61(4), 604-607.

Kim, J.D., Kaushik, S.J., 1990. Additive nature of digestible energy and relative energy values of different energy-yielding nutrients in practical trout diets. AJAS. 3 (3), 231-242.

Kim, J.D., Kaushik, S.J., 1992. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 106, 161-169.

Kim., J.D., Kayes, T.B., Amundson, C.H., 1992. Requirements for sulphur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 101, 95-103.

Kim, J.D., Brèque, J., Kaushik, S.J., 1998. Apparent digestibilities of feed components from fish meal or plant protein based diets in common carp as affected by water temperature. Aquatic Living Resour. 38, 377-390.

Kinsella, J.E., Shetty, K.J., 1978. Yeast proteins: recovery, nutritional and functional properties. In: Friedman, M. (Ed.), Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins. Plenum Publishing, New York, NY, pp. 797-824.

Kinsella, J.E., German, B., Shetty, J., 1985. Uricase from fish liver: isolation and some properties. Comp. Biochem. Physiol. 28, 621-624.

Kissil, G.W., Gropp, J., 1984. Optimal protein and energy ratios in gilthead bream (*Sparus aurata*) feeds. In: European Mariculture Society (Ed.), Proc. of the II Seminar of the German-Israel Cooperation in Aquaculture Research. Hamburg, pp. 99-102.

Kissileff, H.R., Van Itallie, T.B., 1982. Physiology of the control of food intake. Ann. Rev. Nutr. 2, 371-418.

Klein, R.G., Halver, J.E., 1970. Nutrition of salmonoid fishes: Arginine and histidine requirements of chinook salmon and coho salmon. J. Nutr. 100, 1105-1110.

Knigsts, B., 1985. Energetics in fish farming. In: Tyler, P., Calow, P. (Eds.), Fish Energetics: New Perspectives, Croom Helm, London, Sidney, pp. 309-340.

Krogdahl, A., Holm, A., 1983. Pancreatic proteases from man, trout, rat, pig, cow, chicken, mink and fox enzyme activities and inhibition by soybean and lima bean proteinase inhibitors. Comp. Biochem. Physiol. 74 B, 403-409.

Krom, S., Gayter, Davison, A., 1985. An automated method of ammonia determination for use in mariculture. Aquaculture 44, 153-160.

Kutty, M.N., Mohamed, M.P., 1975. Metabolic adaptations of mullet *Rhinomugil corsula* (Hamilton) with special reference of energy utilization. Aquaculture 5, 259-263.

Lall, S.P., Bishop, F.J., 1976. Studies on the nutrient requirement of rainbow trout *Salmo gairdneri*, grown in seawater and fresh water. In: Pillay, T.V.R., Dill, W.A. (Eds.), Advances in Aquaculture, Fishing New Books Ltd., Farnham, Surrey, England, pp. 580-584.

Lanari, D., Agaro, E., Ballestrazzi, R., 1995. Effect of dietary DP/DE ratio on apparent digestibility, growth and nitrogen and phosphorus retention in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult. Nut. 1, 105-110.

Lanari, D., Ballestrazzi, R., D'Agaro, E., 1998. The effect of dietary fat and NFE level on growing European seabass (*Dicentrarchus labrax*) I: Growth rate, body composition and nutrient retention efficiency. In: Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition, Proc. VIII Int. Symp. on Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas, Gran Canaria, Spain, pp. 30.

Langar, H., 1992. Effects physiologiques et metaboliques de la qualite nutritionnelle des proteins chez le jeune alevin de bar (*Dicentrarchus labrax*). Thesis Doctoral, University of Bretagne Occidentale, 136 pp.

Léauté, J.-P., 1986. Approches du régime alimentaire des juvéniles de bars et de limandes en baie de Somme. Rev. Trav. Pêches Marit. 48, 55-63.

Leclercq, B., Tesseraud, S., 1993. Possibilités de réduction des rejets azotés en aviculture. INRA Prod. Anim. 6, pp. 225-236.

Lee, D.J., Putnam, G.B., 1973. The responses of rainbow trout varying protein/energy ratios in a test diet. J. Nutr. 103, 916-922.

Lee, J.Y., Kang, Y.J., Lee, S.M., Park, Y.J., 1993. Evaluation of protein source for Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) test diets. Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency Korea 48, 97-105.

LeGrow, S.M., Beamish, F.W., 1986. Influence of dietary protein and lipid on apparent heat increment of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43, 19-25.

Lemarie, G., Dutto, G., Audrain, J.M., 1997. Influence of the feeding level on the specific growth rate and conversion index in juveniles of seabass (*Dicentrarchus labrax*). In: Houlihan, D., Kiessling, A., Boujard, T. (Eds.), Voluntary Food Intake in Fish, Proc. of the COST 827 Workshop, Aberdeen (UK), pp. 55.

Leray, C., Pelletier, X., 1985. Fatty acid composition of trout phospholips: Effect of (n-3) essential fatty acid deficiency. Aquaculture 50, 51-59.

Li, M., Lovell, R.T., 1992. Growth, feed efficiency and body composition of second and third year channel catfish fed various concentrations of dietary protein to satiety in production ponds. Aquaculture 103, 153-163.

Lie, Ø., 1997. Fish nutrition and product quality. In: Proc. 16th Congress of Nutrition, Montreal, Canada, pp. 25.

Lichfield, J.H., 1983. Single cell proteins. Science 219, 740-743.

Lied, E., Braaten, B., 1984. The effect of feeding and starving, and different ratios of protein energy to total energy in the feed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. 78A (1), 49-52.

Likimani, T.A., Wilson, R.P., 1982. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. J. Nutr. 112, 112-117.

Lim, C., 1991. Milkfish, *Chanos chanos*. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 97-104.

Lin, J.H., Romsos, D.R., Tack, P.I., Leveille, G.A., 1977. Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)). J. Nutr. 107, 846-854.

Lin, J.H., Cui, Y., Hung, S.S.O., Shiau, S.-Y., 1997. Effect of feeding strategy and carbohydrate source on carbohydrate utilization by white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). Aquaculture 148, 201-211.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lupatsch, I., Kissil, G.W., Sklan, D., Pfeffer, E., 1998. Energy and protein requirements for maintenance and growth in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquacult. Nut. 4, 165-173.

Luquet, P., 1991. Tilapia, *Orechromis spp.* In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 169-179.

Luquet, P., Sabaut, J., 1974. Nutrition azotée et croissance chez la daurade et la truite. In: CNEXO (Ed.), Actes des Colleques, Colloques sur L'Aquaculture, Brest, 1, 243-453.

Luquet, P., Fauconneau, B., 1979. Influence de la température sur quelques aspects de l'alimentation des poissons. Bull. Cent. Etud. Rech. Sci., Biarritz 12(3), 475-492.

Lyndon, A.R., Houlihan, D.F., Hall, S.J., 1992. The effect of short-term fasting and a single meal on protein synthesis and oxygen consumption in cod, *Gadus morhua*. J. Comp. Physiol. 162, 209-215.

Mahnken, C.V.W., Spinelli, J., Waknitz, F.W., 1980. Evaluation of an alkaline yeast (*Candida* sp.) as a substitute for fish meal in Oregon Moist Pellet: feeding trials with coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 20, 41-56.

Malinovskaya, M.V., 1989. Pathways of carbohydrate metabolism in fishes in relation to temperature adaptation (a review). Hydrobiol. J. 597, 30-40.

Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1995. Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. J. Applied Ichthyology 11, 240-247.

Mangalik, A., 1986. Dietary energy requirements of channel catfish. PhD. Dissertation. Auburn University, Auburn, Alabama, (citado por NRC, 1993).

Marti-Palanca, H., Martínez-Barbera, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S., 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein:energy ratio in marine teleost, the gilthead bream (*Sparus aurata*). Growth Regulation 6, 253-259.

Mazur, C.N., Higgs, D.A., Plisetskaya, E., March, B.E., 1992. Utilization of dietary starch and glucose tolerance in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of different strains in seawater. Fish. Physiol. Biochem. 10, 303-313.

McClelland, G., Zwingelstein, G, Weber, J.-M., Brichon, G., 1995. Lipid composition of tissue and plasma in two Mediterranean fishes, the gilt-head sea bream (*Chrysophyrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Can J. Fish. Aquat. Sci. 52, 161-170.

McGoogan, B.B., Gatlin III, D.M., 1998. Metabolic requirements of red drum, *Sciaenops ocellatus*, for protein and energy based on weigth and body composition. J. Nutr. 128, 123-129.

Médale, F., Aguirre, P., Kaushik, S.J., 1991 a. Utilization of dietary carbohydrates by rainbow trout at two water temperatures. European Association for Animals Production 58, 392-395.

Médale, F., Blanc, D., Kaushik, S.J., 1991 b. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. II. Utilization of dietary non-protein energy by sturgeon. Aquaculture 93, 143-154.

Médale, F., Vallée, F., Kaushik, S.J., 1994. Measurement of energy requirements for maintenance and substrate utilization in rainbow trout using indirect calorimetry and growth trials. In: Gropp, M.J., Tacon, A.G.J. (Eds.), Report of the EIFAC Workshop on Methodology for Determination of Nutrient Requirements in Fish, Occasional Paper N° 29.

Médale, F., Brauge, C., Vallé, F., Kaushik, S.J., 1995. Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. Wat. Sci. Tech. 31, 185-194.

Médale, F., Vallée, F., Corraze, G., Boujard, T., Kaushik, S., 1997. Nutrition des poissons, croissance et qualité de l'environnement. La Pisciculture Française 124, 8-10.

Médale, F., Panserat, S., Corraze, G., Gutiérrez, J., Rema, P., Blin, C., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S.J., 1998. Digestive and metabolic utilization of dietary carbohydrates by rainbow trout and common carp. In: Recent Advances in Finfish and Crustacean Nutrition, Proc. VIII Int. Symp. Nutrition and Feeding of Fish, Las Palmas, Gran Canaria, Spain, pp. 31.

Medland, T.E., Beamish, F.W.H., 1985. The influence of diet and fish density on apparent heat increment in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture 47, 1-10.

Métailler, R., Aldrin, J.F., Messager, J.L., 1981. Feeding of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Role of protein level and energy source. J. World Maricult. Soc. 12, 117-118.

Meyer-Burgdorff , K.H., Mueller, C., Becker, K., Guenther, K.D., 1989. Determination of energy metabolism in mirror carp (*Cyprinus carpio*, L.) at maintenance and different production levels. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 62, 75-84.

Mezincescu, M.D., Szabo,F., 1936. Method for the determination of the non-protein nitrogen of tissue. J. Biol. Chem. 115, 131-138.

Miki, H., Nishimoto, J. I., Nishimoto, M., Shindo, J., 1994. Oxidation rate of lipid in fish muscles during storage at low temperature. Nippon Suisan Gakkaishi 60, 509-513.

Millikin, M.R., 1982. Effects of dietary protein concentration on growth, feed efficiency and bogy composition of age-0 striped bass. Trans. of the American Fish. Society 111, 373-378.

Millikin, M.R., 1983. Interactive effects of dietary protein and lipid on growth and protein utilization of age-0 stripped bass. Trans. Am. Fish. Soc. 112, 185-191.

Ming, F.W., 1985. Ammonia excretion rate as an index for comparing efficiency of dietary protein utilization among rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of different strains. Aquaculture 46, 27-35.

Mohanty, S.N., Kaushik, S.J., 1991. Whole body amino acid composition of Indian major carps and its significance. Aquat. Living Resour. 4, 61-64.

Mommsen, T.P., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin in fish and agnathans: history, structure and metabolic regulation. Rev. Aquat. Sci. 4, 225-259.

Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 1995. Resultados preliminares sobre la utilização metabólica de dietas con dos niveles lipidicos en lubina (*Dicentrarchus labrax*). In: Orvay, F.C., Reig, A.C. (Eds.), Proc. of the V National Congress on Aquaculture, Sant Carles de la Ràpita, Spain, pp. 570-575.

Morris, D.J., North, A.W., 1984. Oxygen consumption of five species of fish from South Georgia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 78, 75-86.

Mugrditchian, D.S., Hardy, R.W., Iwaoka, W.T., 1981. Linseed oil and animal fat as alternative lipid source in dry diets for Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 25, 161-172.

Murai, T., 1992. Protein nutrition in rainbow trout. Aquaculture 100, 191-207.

Murai, T., Akiyama, T., Nose, T., 1984. Effect of amino acid balance on efficiency in utilization of diet by fingerling carp. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 50 (5), 893-897.

Murai, T., Ogata, H., Kosutarak, P., Arai, S., 1987. Effects of methanol treatment and amino acid supplementation on utilization of soy flour by chum salmon fingerlings. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Japan 12, 37-41.

Murray, A.P., Marchant, R., 1986. Nitrogen utilization in rainbow trout fingerlings (*Salmo gairdneri*) fed mixed microbial biomass. Aquaculture 54, 263-275.

Mwangangi, D.M., Mutungi, G., 1994. The effect of temperature acclimation on oxygen consumption and enzyme activity of red and white muscle fibers isolated from the tropical freshwater fish *Oreochromis niloticus*. J. Fish. Biol. 44, 1033-1043.

Nagayama, F., Ohshima, H., 1974. Studies on the enzymes system of carbohydrate metabolism in fish. I. Properties of liver hesokinase. Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish. 40, 285-290.

Nagayama, F., Ohshima, H., Takeuchi, T., 1973. Activities of hexokinase and glucose desidrogenase in fish liver. Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish. 39: 1349.

National Research Council (NRC), 1981. Nutrient requirement of coldwater fishes. National Academy Press, Washington DC, 63 pp.

National Research Council (NRC), 1984. Nutrition requirements of poultry. National Academy Press, Washington DC.

National Research Council (NRC), 1988. Nutrition requirements of swine. National Academy Press, Washington DC.

National Research Council (NRC), 1993. Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington DC, 114 pp.

Nematipour, G.R., Brown, M.L., Gatlin III, D.M., 1992 a. Effects of dietary carbohydrate: lipid ratio on growth and body composition on hybrid striped bass. J. World Aquat. Soc. 23, 128-132.

Nematipour, G.R., Brown, M.L., Gatlin III, D.M., 1992 b. Effects of dietary energy: protein ratio on growth and body characteristics and body composition on hybrid striped bass, *Morone chrysops* (X) × *M. saxatilis* (Ξ). Aquaculture 107, 359-368.

Ng, W.K., Hung, S.S.O., 1995. Estimating the ideal dietary indispensable amino acid pattern for growth of white sturgeon, *Acipenser transmontanus* (Richardson). Aquacult. Nutr. 1, 85-94.

Nose, T., 1979. Summary report on the requirements of essential amino acid for carp. In: Proc. of the World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 145-154.

Ogata, H., Arai, S., Nose, T., 1983. Growth response of cherry salmon *Oncorhynchus masou* and amago salmon *O. rhodurus* fry fed purified casein diets supplemented with amino acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49, 1381-1385.

Ogino, C., 1980. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46, 171-174.

Ohta, M., Watanabe, T., 1996. Energy requirements for maintenance of body weight and activity, and for maximum growth in rainbow trout. Fish. Sci. 62, 737-744.

Ohta, M., Watanabe, T., 1998. Effect of feed preparation methods on dietary energy budgets in carp and rainbow trout. Fish. Sci. 64, 99-114.

Oliva-Teles, A., Rodrigues, A.M., 1993. The effect of high temperature and diet protein level on metabolic utilization of diets by rainbow trout. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 301-305.

Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L., 1997. Effect of the dietary protein level on metabolic utilization of diets by seabass (*Dicentrarchus labrax*). Proc. Actas III Int. Symp. on Research for Aquac., Barcelona, Spain, 1997, pp. 187.

Oliva-Teles, A., Henriques, M.C., Kaushik, S.J., 1995. The effect of dietary protein level on energy metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*) In: F.C., Orvay, A.C. Reig (Eds.), Actas del V Congreso Nac. de Acuicult., Barcelona, Espanya, pp. 576-581.

Oliva-Teles, A., Pereira, J.P., Gouveia, A., Gomes, E., 1998. Utilization of diets supplemented with microbial phytase by seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquat. Living Resour. 11, 255-259.

Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C., Cowey, C.B., 1975. Elongation and desnaturation of dietary fatty acids in turbot (*Scophthalmus maximus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Lipids 10, 528-531.

Page, J.W., Andrews, J.W., 1973. Interactions of dietary levels of protein and energy on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Nutr. 103, 1339-1346.

Palmer, T.N., Ryman, B.E., 1972. Studies on oral glucose intolerance in fish. J. Fish. Biol. 4, 311-319

Pannevis, M.C., Earle, K.E., 1994. Maintenance energy requirement of five popular species of ornamental fish. J. Nutr. 124, 2616-2618.

Paspais, M., Boujard, T., 1996. A comparative study of automatic feeding and self-feeding in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets of different energy levels. Aquaculture 145, 245-257.

Paulson, L.J., 1980. Models of ammonia excretion for brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 1421-1425.

Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1999. Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 179, 425-437.

Pereira, C., 1996. Glucose metabolism in salmonids: dietary effects and hormonal regulation. Ph.D. Thesis, Norwegian University of Technology and Science, Trondheim, Norway.

Peres, H., 1995. Formulação de uma dieta de referência para o robalo Europeu (*Dicentrarchus labrax*). Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal, 141 pp.

Pérès, G., Bogé, G., Colin, D., Rigal, A., 1973. Effects de la temperature sur les processus digestifs des poissons. Activités enzymatiques et absorption intestinale. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 37, 223-232.

Pérez, L., Gonzales, M., Jover, M., Fernández-Carmona, J., 1997. Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate. Aquaculture 156, 183-193.

Person Le-Ruyet, J., Chartois, H., Quemener, L., 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. Aquaculture 136, 181-194.

Person Le-Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juveniles turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 154, 155-171.

Person Le-Ruyet, J., Boeuf, G., Infante, Z., Helgason, S., Le Roux, A., 1998. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. Comp. Biochem. Physiol. 119, 511-518.

Pfeffer, E., 1995. Carbohydrate utilization and its determination. J. Appl. Ichthyol. 11, 175-182.

Pfeffer, E., Beckmann-Toussaint, J., Henrichfreise, B., Jansen, H.D., 1991. Effect of extrution on efficiency of utilization of maize starch by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 96, 293-303.

Phillips, S.M., Jr., Tunison, A.V., Brockway, D.R., 1948. Utilization of carbohydrates by trout. Fish. Res. Bull. NY 11, 1-44.

Picket, G.D., Pawson, H.G., 1994. Sea bass. Biology, exploitation and conservation. Chapman, C., Hall, A. (Eds.), 325pp.

Pieper, A., Pfeffer, E., 1979. Carbohydrates as a possible source of dietary energy for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), Proc. Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 209-219.

Pieper, A., Pfeffer, E., 1980. Studies on the comparative efficiency of utilization of gross energy from carbohydrates, proteins and fats by rainbow trout (*Salmo gairdneri*, R.). Aquaculture 20, 323-332.

Pillay, T.V.R., 1996. The challenges of sustainable aquaculture. World Aquaculture 27 (2), 7-9.

Plisetskaya, E.M., 1990. Recent sutidies on fish pancreatic hormones: Selected Topics. Zool. Sci. 7, 335-353.

Plisetskaya, E.M., Ottolenghi, C., Sheridan, M.A., Mommsen, T.P., Gorbman, A., 1989. Metabolic effects of salmon glucagon and glucagon-like peptide in coho and chinook salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 73, 205-216.

Plummer, P., 1987. Glycogen determination in animal tissues. An introduction to practical biochemistry. In: McGraw Hill Book Company, Maidenhead, Berkshire, 3rd Ed. UK., 332 pp.

Porter, C.B., Krom, M.D., Robbins, M.G., Brickell, L., Davidson, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. Aquaculture 66, 287-297.

Rajendra, W., 1987. High performance liquid chromatographic determination of amino acids in biological samples by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. J. Liq. Chromatogr. 10, 941-955.

Ramnarine, I.W., Pirie, J.M., Johnstone, A.D.F., Smith, G.W., 1987. The influence of ration size and feeding frequency on ammonia excretion by juveniles Atlantic cod, *Gadus morhua* L. J. Fish. Biol. 31, 545-559.

Ramos, J., Trhush, M., Navas, J.M., Zanuy, S., Carrillo, M., Bromage, N., 1993. Effect of lipidic enrichment of artificial diets on broodstock growth, fecundity and spawning quality in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: Cervino, A., Landin, A., de Coo, A., Guerra, A., Torre, M., (Eds.), Proc. 4th Natl. Congr. on Aquaculture, Vilanova de Arousa, Galicia, Spain, pp. 13-18.

Rawles, S.D., Gatlin III, D.M., 1998. Carbohydrate utilization in striped bass (*Morone saxatilis*) and sunshine bass (*M. chrysops* &female×*M. saxatilis* &male). Aquaculture 161, 201-212.

Rechignat, H., Arzel, J., Viau, M., Gandemer, G., Guillaume, J., 1995. Nature des lipides alimentaires et composition lipidique de la truite commune (*Salmo trutta*) élevée en eau douce ou en mer. N. S. T. 13(1), 79-84.

Reeds, P.J., 1988. Nitrogen balance and protein requirements. In: Blaxter, K., McDonald, I. (Eds.), Comparative Animal Nutrition, John Libbey, pp. 55-72.

Refstie, T., Austreng, E., 1981. Carbohydrate in rainbow trout diets. III. Growth and chemical composition of fish from different families fed four levels of carbohydrate in the diet. Aquaculture 25, 35-49.

Reinitz, G., 198'/. Performance of rainbow trout as affected by amount of dietary protein and feeding rate. Prog. Fish-Cult. 49, 81-86.

Reinitz, G., Hitzel, F., 1980. Formulation of practical diets for rainbow trout based on desired performance and body composition. Aquaculture 19, 243-252.

Reinitz, G.L., Orme, L.E., Lemm, C.A., Hitzel, F.N., 1978. Influence of varying lipid concentration with two protein concentration in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Trans. Am. Fish. Soc. 107, 751-754.

Reis, L.M., Reutebuch, E.M., Lovell, R.T., 1989. Protein to energy ratios in production diets and growth, feed conversion and body composition of channel catfish. Aquaculture 76, 1-7.

Rérat, A., Kaushik, S.J., 1995. Nutrition, animal production and the environment. J. Int. Wat. Sci. Tech. 31, 1-19.

Ringo, E., 1991. Hatchery-reared landlocked Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), from Lake Takvatn reared in fresh and sea water. II. The effect of salinity on the digestibility of protein, lipid and individual fatty acids in a capelin roe diet and commercial feed. Aquaculture 93, 135-142.

Robert, N., Le Gouvello, R., Mauviot, J.C., Arroyo, F., Aquirre, P., Kaushik, S.J., 1993. Use of extruded diets in intensive trout culture: effects of protein to energy ratios on growth, nutrient utilization and on flesh and water quality. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Nutrition and Feeding. Les Colloques INRA, N°. 61, Editions INRA, Paris, pp. 497-500.

Roberts, R.J., Muir, J.F., 1995. Twenty five years of world aquaculture: sustainability, a global problem, pp. 167-181. (citado por FAO, 1997).

Robinson, E.H., Wilson, R.P., Poe, W.E., 1981. Arginine requirement and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling channel catfish. J. Nutr. 111, 46-52.

Rodehutscord, M., Pfeffer, E., 1995. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Wat. Sci. Tech. 31, 143-147.

Rodrigues, A.M.P., 1995. Biological and nutritional approach to the environmental impact of trout culture in Portugal. Water Science and Technology 31(10), 239-248.

Rodriguez, C., Cejas, J.R., Martin, M.V., Badia, P., Samper, M., Lorenzo, A., 1998. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. Fish Physiol. Biochem. 18, 177-187.

Rombaut, A., 1982. Contribuition à l''etude du metabolisme intermédiaire chez le loup (*Dicentrarchus labrax*). Influence de la température et de la salinité sur l'utilisation du glucose et de l'acide glutamique. Thèse Doctoral 3e Cycle en Endocrinologie et Développement. Université de Clermont II, 144 pp. (citado por Brauge, 1994).

Ross, B., Jaunsey, K., 1981. A radiographic estimation of the effect of temperature on gastric emptying time in *Sarotherodon niloticus* (L.) × *S. aurens* (Steindachner) hybrids. J. Fish Biol. 19, 333-344.

Ross, L.G., McKinney, R.W., Fullarton, J.G., Roberts, S.E.J., Ross, B., 1992. The effects of dietary protein content, lipid content and ration level on oxygen consumption and specific dynamic action in *Oreochromis niloticus* L. Comp. Biochem. Physiol. 103, 573-578.

Rumsey, G.L., Ketola, H.G., 1975. Amino acid supplementation of casein diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and of soybean meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. J. Fish. Res. Board Can. 32, 422-426.

Rumsey, G.L., Hughes, S.G., Kinsella, J.L., 1990. Use of dietary yeast *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen by lake trout. J. World Aq. Soc. 21, 205-209.

Rumsey, G.L., Kinsella, J.E., Shetty, K.L., Hughes, S.G., 1991 a. Effect of high dietary concentrations of brewer's dried yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Feed Sci. Technol. 33, 177-183.

Rumsey, G.L., Hughes, S.G., Smith, R.R., Kinsella, J.E., Shetty, K.L., 1991 b. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extracts from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Feed Sci. Technol. 33, 185-193.

Rumsey, G.L., Winfree, R.A., Hughes, S.G., 1992. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 108, 97-110.

Russel, N.R., Fish, J.D., Wootton, R.J., 1996. Feeding and growth of juvenile sea bass: effect of ration and temperature on growth rate and efficiency. J. Fish Biol. 49, 206-220.

Rychly, J., 1980. Nitrogen balance in trout. II. Nitrogen excretion and retention after feeding diets with varying protein and carbohydrates levels. Aquaculture 20, 343-350.

Rychly, J., Marina, B.A., 1977. The ammonia excretion of trout during a 24-hour period. Aquaculture 11, 173-178.

Rychly, J., Spannhof, L., 1979. Nitrogen balance in trout. I. Digestibility of diets containing varying levels of protein and carbohydrate. Aquaculture 16, 39-46.

Sanchez-Muniz, F.J., De La Higuera, M., Mataix, F.J., Varela, G., 1979. The yeast *Hansenula anomala* as a protein source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Hematological aspects. Comp. Biochem. Physiol. 63, 153-157.

Santiago, C.B., Lovell, R.T., 1988. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. J. Nutr. 106, 761-766.

Santinha, J., Gomes, E. F., Coimbra, J., 1996. Effects of protein level of the diet on digestibility and growth of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. Aqua. Nut. 2, 81-87.

Sargent, J., 1997. Fish oils and human diet. Brit. J. Nutr. 78, S5-S13.

Sargent, J., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. In: Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition, 2nd ed. Academic press, New-York, pp. 153-218.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999 a. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture 177, 191-199.

Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999 b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture 179, 217-229.

Sarwar, G., Shah, G., Mongeau, R., Hopper, K., 1985. Nucleic acid, fiber, and nutrient composition of inactive dried food yeast products. J. Food Sci. 50, 353-357.

Satoh, S., 1991. Common carp, *Cyprinus carpio*. In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 55-67.

Satoh, S., Poe, W.E., Wilson, R.P., 1989 a. Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 79, 121-128.

Satoh, S., Poe, W.E., Wilson, R.P., 1989 b. Effects of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. J. Nutr. 119, 23-28.

Savitz, J., 1969. Effects of temperature and body weight on endogenous nitrogen excretion in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). J. Fish. Res. Board Can. 26, 1813-1821.

Savitz, J., 1971. Effects of starvation on body protein utilization of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) with calculation of caloric requirements. Trans. Am. Fish. Soc. 100, 18-21.

Savitz, J., Albanesem, E., Evinger, M.J., Kolasinski, P., 1977. Effect of ration level on nitrogen excretion, nitrogen retention and efficiency of nitrogen utilization for growth in largemouth bass (*Mecropterus salmonides*). J. Fish. Biol. 11, 185-192.

Schäfer, A., Kopper, W.M., Meyer-Burgdorff, K.,-H., Gunther, K.D., 1995. Effects of a microbial phytase on the utilization of native phosphorus by carp in a diet based on soybean meal. Wat. Sci. Tech. 31, 149-155.

Schwarz, F.J., Kirchgessner, M., 1988. Amino acid composition of carp (*Cyprinus carpio* L.) with varying protein and energy supplies. Aquaculture 72, 307-317.

Seenappa, D., Devaraj, K.V., 1995. Effect of different levels of protein, fat and carbohydrate on growth, feed utilisation and body carcass composition of fingerlings in *Catla catla* (Ham.). Aquaculture 129, 243-249.

Serrano, J.A., Nematipour G.R., Gatlin III, D.M., 1992. Dietary protein requirements of the Red Drum, *Sciaenops ocellatus*) and relative use of dietary carbohydrate and lipid. Aquaculture 101, 283-291.

Serrano-Gordo, L., 1989. Age, growth and sexuality of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciforme, Moronidae) from Aveiro lagoon, Portugal. Scient. Mar. 53, 121-126.

Shehadeh, Z.H., Pedini, M., 1997. Issues and challenges. In: Review of the State of World Aquaculture, FAO Fish Circulares, N°. 886, Rev. 1, pp. 22-29.

Sheridan, M.A., 1988. Lipid dynamics in fish: Aspects of absorvation, transportation, deposition and mobilisation. Comp. Biochem. Physiol. 90B, 679-690.

Sheridan, M.A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 107B, 495-508.

Sheridan, M.A., Plisetskaya, E.M., Bern, H.A., Gorbman, F.L., 1987. Effects of somatostatin-25 and urotensin II on lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocinol. 66, 405-414.

Sheridan, M.A., Eilertson, C.D., Plisetskaya, E.M., 1991. Radioimmunoassay for salmon pancreatic somatostati-25. Gen. Comp. Endocrinol. 81, 365-372.

Shetty, K.J., Kinsella, J.E., 1979. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of the isolated protein. J. Agric. Food Chem. 340, 1166-1171.

Shetty, K.J., Kinsella, J.E., 1982. Isolation of yeast protein with reduces nucleic acid level using reversible acylating reagent: some properties of isolated protein. J. Agric. Food Chem. 30, 1166-1171.

Shiau, S.-Y., 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish – with particular reference to tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture 151, 79-96.

Shiau, S.-Y., Peng, C.-Y., 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture 117, 327-334.

Shikata, T., Iwanaga, S., Shimeno, S., 1994. Effects of dietary glucose, frutose and galactose on hepatopancreatic enzyme activities and body composition in carp. Fisheries Sci. 60, 613-617.

Shimeno, S., 1991. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata.* In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 181-191.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H., Takeda, M., 1977. Comparative studies on carbohydrate metabolism of yellowtail and carp. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43, 213-217.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Takeda, M., 1978. The importance of carbohydrate in the diet of a carnivorous fish. FAO/FN: EIFAC/79/Symp: E/5, pp. 1-31.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H., Takeda, M., 1979. The importance of carbohydrates in the diet of a carnivorous fish. In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), Proc. Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 127-143.

Shimeno, S., Takeda, M., Takayama, S., Fukui, A., Sasaki, H., Kajiyama, H., 1981. Adaptation of hepatopancreatic enzymes to dietary carbohydrates in carp. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47, 71-77.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Takeda, M., 1996. Metabolic response of juvenile yellowtail to dietary carbohydrate to lipid ratios. Fish. Science 62(6), 945-949.

Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T., Kheyyali, D., 1997. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio.* Aquaculture 151, 371-377.

Siddiqui, A.Q., Howlader, M.S., Adams, A.A., 1988. Effect of dietary protein level on growth, feed conversion and protein utilization in fry and young tilapia *Oreochromis niloticus.* Aquaculture 70, 63-73.

Silva, J.G., Oliva-Teles, A., 1998. Apparent digestibility coefficients of feedstuffs in seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquatic Living Resour. 11, 187-191.

Sing, R.P., Nose, T., 1967. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. (Japan) 17(1), 21-25.

Slinger, S.J., Cho, C.Y., Holub, B.J., 1977. Effect of water temperature on protein and fat requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Proc. of the 12th Annual Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Guelph, Ontario, pp. 1-5.

Smith, R.R., 1989. Nutritional energetics. In: Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition, 2nd Ed. Academic Press, New York, pp. 1-30.

Smith, A.K., Thorpe, A., 1976. Nitrogen metabolism and trophic input in relation to growth in freshwater and saltwater *Salmo gairdneri.* Biol. Bull. 150, 139-151.

Smith, R.R., Rumsey, C.L., Scott, M., 1978. Net energy maintenance requirements of salmonids as measured by direct calorimetry: effect of body size and environmental temperature. J. Nutr. 108: 1017-1024.

Smith, R.R., Kincaid, H.L., Regenstain, J.M., Rumsey, G.L., 1988. Growth, carcass composition, and taste of rainbow trout of different strains fed diets containing primarily plant or animal protein. Aquaculture 70, 309-321.

Sosulski, F.W., Imafidon, G.I., 1990. Amino acid composition and nitrogen to protein conversion factors for animal and plant foods. J. Agric. Food Chem. 38, 1351-1356.

Spannhof, L., Plantikow, H., 1983. Studies on carbohydrates digestion in rainbow trout. Aquaculture 30, 95-108.

Spies, J.R., 1957. Colorimetric procedures for aminoacids. In: Colowick, S.P.S., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods of Enzymology, Academic Press, New York, Vol. III, pp. 467-477.

Spyridakis, P., 1989. Utilization des proteins alimentares chez le bar (*Dicentrarchus labrax*). Aspects digestifs et métaboliques. Thesis Doctoral, Univ. Bretagne Occidentale, 190 pp.

Spyridakis, P., Métailler, R., Gabaudan, J., 1986. Proetin et amidon dans l'alimentation du juvenile de bar ou loup (*Dicentrarchus labrax*). ICES, C.M. 1986/F: 30, 11pp.

Steffens, W., 1989. Protein digestion. In: Principles of Fish Nutrition. Ellis Horwood, Chichester, pp. 47-51.

Steffens, W., 1997. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. Aquaculture 151, 97-119.

Stephan, G., Guillaume, J.C., Lamour, F., 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. Aquaculture 5, 251-268.

Stephan, G., Dreanno, C., Guillaume, J., Arzel, J., 1996. Incidence de regimes contenant des teneurs variables en proteines, lipides et glucides sur la fraction lipidique du muscle chez un poisson d'elevage, le turbot (*Scophthalmus maximus*). Ichtyophysiologica Acta 19, 11-30.

Stickney, R.R., Hardy, R.W., 1989. Lipid requirements of some warmwater species. Aquaculture 79, 145-156.

Storebakken, T., Austreng, E., 1987 a. Ration level for salmonids. I. Growth, survival, body composition, and feed conversion in Atlantic salmon fry and fingerlings. Aquaculture 60, 189-206.

Storebakken, T., Austreng, E., 1987 b. Ration level for salmonids. II. Growth, feed intake, protein digestibility, body composition and feed conversion in rainbow trout weighting 0.5-1.0 kg. Aquaculture 60, 207-221.

Storebakken, T., Hung, S.S.O., Calvert, C.C., Plisetskaya, E.M., 1991. Nutrient partitioning in rainbow trout at different feeding rates. Aquaculture 96, 191-203.

Storebakken T., Shearer, K.D., Refstie, S., Lagocki, S., McCool, J., 1998. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 163, 345-357.

Tabachek, J.L., 1986. Influence of dietary protein level on growth, body composition and utilization efficiencies of Arctic Charr *Salvelinus alpinus* L. J. Fish Biol. 29, 139-151.

Tacon, A.G., 1993. Feed ingredient for warmwater fish. Fish meal and others processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular, N°. 856, 64 pp.

Tacon, A.G., 1994. Feed ingredient for carnivorous fish species: Alternatives to fishmeal and other fishery rescues. FAO Fisheries Circular, N.° 8581, 35 pp.

Tacon, A.G., 1997. Feeding tomorrow's fish: keys for sustainability. In: Tacon, A., Basurco, B. (Eds), Feeding Tomorrow's Fish, Proc. of the Work. CIHEAM Network Technology of Aquaculture in the Mediterranean, Mazarrón, Spain, pp. 11-33.

Tacon, A.G., Cooke, D.J., 1980. Nutritional value of dietary nucleic acids to trout. Nutrition Reports International 22, 631-640.

Tacon, A.G., Cowey, C.B., 1985. Protein and amino acid requirements. In: Tytler, P., Calow, P. (Eds.), Fish Energetics, New Perspectives. Croom Helm, London and Sidney, pp. 155-183.

Tacon, A.G., Jackson, A.J., 1985. Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds. In: Cowey G., Mackie, J. (Eds.), Fish Feeding and Nutrition, Academic Press, London, pp. 119-145.

Tacon, A.G., Haaster, J.V., Feathustone, P.B., Kerr, K., Jackson, A.J., 1983. Studies on the utilization of full-fat soybean and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49, 1437-1443.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1976. Nutritive value of ω3 highly unsaturated fatty acid in pollock liver oil for rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 42, 907-919.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1977 a. Requirement of carp for essential fatty acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43, 541-551.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1977 b. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in pollock liver oil on growth and fatty acid composition of rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43, 947-953.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1979. Effects of excess amounts of essential fatty acids on growth of rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45, 1517-1519.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1980. Effect of polyunsaturated fatty acids in the growth of rainbow trout, chum salmon and coho salmon. Oral presentation at the annual meeting of Japan. Soc. Sci. Fish.

Takeuchi, T., Watanabe, T., 1982. Effects of various polyunsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48: 1745-1752.

Takeuchi, T., Watanabe, Y., Ogino, C., 1978 a. Supplementary effects of lipids in a high protein diet for rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44, 677-681.

Takeuchi, T., Yokoyama, M., Ogino, C., 1978 b. Optimum ratio of dietary energy to protein for rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 44, 729-732.

Takeuchi, T., Watanabe, T., Nose, T., 1979 a. Requirement for essential fatty acid of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in freshwater environment. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45, 1319-1323.

Takeuchi, T., Watanabe, T., Ogino, C., 1979 b. Availability of carbohydrate and lipid as dietary energy source for carp. Jpn. Soc. Sci. Fish. 45, 977-982.

Takeuchi, T., Arai, S., Watanabe, T., Shimma, Y., 1980. Requirements of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46, 345-353.

Takeuchi, T., Watanabe, T., Ogino, C., Saito, M., Nishimura, K., Nose, T., 1981. A long-term feeding with rainbow trout by a low protein diet with a high energy value. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47, 637-643.

Takeuchi, T., Satoh, S., Watanabe, T., 1983. Requirements of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49,1127-1134.

Takeuchi, T., Jeong, K.S., Watanabe, T., 1990. Availability of extruded carbohydrate ingredients to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. Nippon Suisan Gakkaishi 56, 1839-1845.

Takeuchi, T., Arakawa, T., Shiina, Y., Satoh, S., Imaizumi, K., Sekiya, S., Watanabe, T., 1992. Effect of dietary α- and β-starch on growth of juvenile striped jack and yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 701-705.

Tandler, A., Beamish, F.W.H., 1980. Specific action and diet in largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepede). J. Nut. 110, 750-764.

Tandler, A., Beamish, F.W.H., 1981. Apparent specific dynamic action (SDA), fish weight and level of caloric intake in largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepede. Aquaculture 23, 231-242.

Tashima, L., Cahill, G.E., 1968. Effects of insulin in the toadfish, *Opsanus tau*. Gen. Comp. Endocrinol. 11, 262-271.

Tátai, I., 1986. Influence of temperature, rate of feeding and body weight on nitrogen metabolism of bream *Abramis brama* L. Comp. Biochem. Physiol. 83A, 543-547.

Thebault, H., Alliot, E., Pastaureaud, A., 1985. Quantitative methionine requirements of juveniles sea-bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Aquaculture 50, 75-87.

Thivend, P., Mercier, C., Guilbot, A., 1972. Determination of starch with glucoamylase. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), Methods in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, New York, USA, pp. 100-105.

Thomassen, M.S., R[illegible]sj[illegible], C., 1989. Different fats in feed for salmon: influence on sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart. Aquaculture 79, 129-135.

Thorpe, A., Ince, B.W., 1974. Plasma insuline levels in teleosts determined by a charcoal. In: Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 35-53.

Thorpe, J.E., Cho, C.Y., 1985. Minimizing wastes through bioenergetically and behaviorally based feeding strategies. Wat. Sci. Tech. 31, 29-40.

Tibaldi, E., Lanari, D., 1991. Optimal dietary lysine levels for growth and protein utilization of fingerling sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed semipurified diets. Aquaculture 95, 297-304.

Tibaldi, E., Tulli, F., 1999. Dietary threonine requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 175, 155-166.

Tibaldi, E., Tulli, F., Ballestrazzi, R., Lanari, D., 1991. Effect of dietary protein/metabolizable energy ratio and body size on the performance of juvenile seabass. Zootech. Nutr. Anim. 17, 313-320.

Tibaldi, E., Tulli, F., Lanari, D., Pinosa, M., 1993. Quantitative triptophan requirements of sea-bass fingerlings. E.A.S. Special Publication 19, 482.

Tibaldi, E., Tulli, F., Lanari, D., 1994. Arginine requirements and effect of different dietary and lysine levels for fingerlings sea-bass (*Dicentarchus labrax* L.). Aquaculture 127, 207-218.

Tibaldi, E., Beraldo, P., Volpelli, L.A., Pinosa, M., 1996 a. Growth response of juvenile dentex (*Dentex dentex* L.) to varying protein level and protein to lipid ratio in practical diets. Aquaculture 139, 91-99.

Tibaldi, E., Tulli, F., Corsin, F., 1996 b. Current estimates of the essential amino acid requirements of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as determined by unconventional (empirical) methods. In: Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects, Verona, EAS, pp. 320-323.

Tsevis, N., Klaoudatos, S., Conides, A., 1992. Food conversion budget in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns. Aquaculture 101, 293-304.

Túse, D., 1984. Single-cell protein: current status and future prospects. Food Science and Nutrition, CRC Press, Vol. 19, Issue 4, pp. 273-325.

Usher, M.L., Talbot, C., Eddy, F.B., 1990. Effects of transfer to seawater on digestion and gut function in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). Aquaculture 94, 309-326.

van den Thillard, G., 1986. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine and glutamate. J. Comp. Physiol. 156, 511-520.

Vergara, J.M., Robainà, L., Izquierdo, M., Higuera, M., 1996. Protein sparing effects of lipids in diets for fingerlings of gilthead sea bream. Fish. Sci. 62, 624-628.

Viola , S., Lahav, E., Angeoni, H., 1992 a. Reduction of feed protein levels and of nitrogenous excretions by lysine supplementation in intensive carp culture. Aquat. Living Resour. 5, 277-285.

Viola, S., Angeoni, H., Lahav, E., 1992 b. Limits of protein sparing by lysine supplementation of pondfish feeds. In: Japanese Israeli Symp. on Aquaculture, Haifa, Israel, pp. 125 126.

Vitale-Lelong, D., 1989. Bilan azoté du loup (*Dicentrarchus labrax*) en cours de prégrossissement. Vie Marine, Hors série 11, 111pp.

Walton, M.J., Cowey, C.B., 1982. Aspects of intermediary metabolism in fish. Comp. Biochem. Physiol. 73B, 59-79.

Walton, M.J., Cowey, C.B., Adron, J.W, 1982. Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. J. Nutr. 112, 1525-1535.

Walton, M.J., Cowey, C.B., Adron, J.W, 1984. The effect of lysine on growth and metabolism of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 52, 115-122.

Walton, M.J., Adron, J.W., Coloso, R.M., Cowey, C.B., 1986. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine as determined by growth and biochemical measurements. Fish Physiol. Biochem. 2, 161-169.

Watanabe, T., 1977. Sparing action of lipids on dietary protein in fish - low protein diets with high caloric content. Technocrat. 10 (8), 34-39.

Watanabe, T., 1982. Lipid nutrition in fish. Comp. Biochem. Physiol. 73B (1), 3-15.

Watanabe, T., 1988. Nutrition and growth. In: Intensive Fish Farming, BSP Professional Books, Oxford, pp. 154-197.

Watanabe, T., 1991. Past and present approaches to aquaculture waste management in Japan. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Nutritional Strategies and Aquaculture Waste, Univ. Guelph, Guelph, Canada, pp. 137-154.

Watanabe, T., Ohta, M., 1995. Endogenous nitrogen excretion and non-fecal energy losses in carp and rainbow trout. Fish. Sci. 61, 53-60.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Ogino, C., 1979. Studies on sparing effect of lipids on dietary protein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology 1, 113-125.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Wada, M., Uehara, R., 1981. The relationship between lipid levels and α-tocopherol requirements of rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47, 1463-1471.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Satoh, S., Wang, K-W., Ida, T., Yaguchi, M., Nakada, M., Amano, T., Yoshijima, S., Aoe, H., 1987 a. Development of practical diets for reduction of total nitrogen loading on water environment. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 2217-2225.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Satho, S., Ida, T., Yaguchi, M., 1987 b. Development of low protein – high energy diets for practical carp culture with special reference to reduction of total nitrogen excretion. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 1413-1423.

Watanabe, T., Satoh, S., Takeuchi, T., 1995. Abst, Metg. Japan. Soc. Fisheries Sci., pp.33. (citado por Akiyama et al., 1997).

Weatherup, R.N., McCracken, K.J., Foy, R., Rice, D., McKendry, J., Mairs, R.J., Hoey, R., 1997. The effects of dietary fat content on performance and body composition of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 151, 173-184.

Were, K.E., 1989. Determination of the tryptophan requirement of the juvenile trout using the indicator oxidation technique. M.Sc. Thesis of Guelph, Guelph, Canada, 199 pp. (citado por Cowey, 1992).

Wilson, R.P., 1991. Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). In: Wilson, R.P. (Ed.), Handbook of Nutrition Requirements of Finfish, CRC Press, Boca Raton, pp. 35-53.

Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. Aquaculture 124, 67-80.

Wilson, R.P., Cowey, C.B., 1985. Amino acid composition of whole body tissue of rainbow trout and Atlantic salmon. Aquaculture 48, 373-376.

Wilson, R.P., Poe, W.E., 1985. Relationship of whole body and egg essential amino acid requirements of fingerling channel catfish. J. Nutr. 110, 627-633.

Wilson, R.P., Halver, J.E., 1986. Protein and amino acid requirements of fishes. Annu. Rev. Nut. 6, 225-244.

Wilson, R.P., Poe, W.E., 1987. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. J. Nutr. 117, 280-285.

Winberg, G.G., 1956. Rate of Metabolism and Food Requirements of Fishes. Beloruss. State Univ. Minsk. (Fish. Res. Board Can., Transl. Ser., N°. 194 (1960).

Windell, J.T., Foltz, J.W., Sarokon, J.A., 1978. Effect of body size, temperature and ration size on digestibility of dry pelleted diet by rainbow trout *Salmo gairdneri*. Trans. Am. Fish. Soc. 107, 613-616.

Xie, S., Cui, Y., Yang, Y., Liu, J., 1997. Energy budget of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in relation to ration size. Aquaculture 154, 57-68.

Yamada, K., Kobayashi, K., Yone, Y., 1980. Conversion of linoleic acid to w3-highly unsaturated fatty acid in marine fishes and rainbow tout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46, 1231-1233.

Yokozawa, T., Oura, H., Okada, T., 1982. Metabolic effects of dietary purine in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 28, 519-526.

Yone, Y., 1978. Essential fatty acid and lipid requirement of marine fish. In: Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. (Ed.), Dietary Lipids in Aquaculture, pp. 43-59.

Yone, Y., Furuichi, M., Sakamoto, S., 1971. Studies on nutrition of red sea bream. 3. Nutritive value and optimum content of lipids in diets. Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ. 1, 49-60.

Yone, Y., Sakamoto, S., Furuichi, M., 1975. Studies on red sea bream IX: The basal diet for nutrition studies. Rep Fish. Res. Lab. Kyushu Univ. 2, 13-24.

Yu, T.C., Sinnhuber, R.O., 1979. Effect of dietary ω3 and ω6 fatty acids on growth and feed conversion efficiency of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture 16, 31-38.

Zamora, S., Echevarria, G., 1987. Los hidratos de carbono en la nutrition de los peces. In: Espinosa de los Monteros, J.E., Labart, U. (Eds.), Nutrition en Aquicultura, Plano de Formacion de Técnicos Superiores de Aquicultura, CAICIT, Madrid, Vol. II, pp. 167-196.

Zeitoun, I.H., Halver, J.E., Ulley, D.E., Tack, P.I., 1973. Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. J. Fish. Res. Bd. Can. 30, 1867-1871.

Zeitoun, I.H., Ulley, D.E., Halver, J.E., Tack, P.I., Magee, W.T., 1974. Influence of salinity on protein requirement of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. J. Fish. Res. Bd. Can. 31, 1145-1148.

Zoar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984. La reprodution de la dourade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte- In: Barnabé, G., Billard, R. (Eds.), L'Aquaculture du Bar et des Sparidés, INRA Publ., Paris, pp. 3-24.

Lista das Espécies de Teleósteos Citadas no Texto

Nome comum	Nome comum em inglês	Nome científico
Bacalhau	Atlantic cod	*Gadus morhua*
Capelim	Capelin	*Mallotus villosus*
Carpa	Common carp	*Cyprinus carpio*
Corvinão de pintas	Red drum	*Sciaenops ocellatus*
Dentex	Dentex	*Dentex dentex*
Dourada	Seabream	*Sparus aurata*
Dourada japonesa	Red seabream	*Pagrus major*
Enguia	Eel	*Anguilla spp.*
Enguia japonesa	Japanese eel	*Anguilla japonica*
Esturjão	Sturgeon	*Acipenser* spp.
Linguado	Sole	*Solea solea*
Peixe gato	Channel catfish	*Ictalurus punctatus*
Peixe leite	Milkfish	*Chanos chanos*
Robalo	Seabass	*Dicentrarchus labrax*
Robalo asiático	Asian seabass	*Lates calcarifer*
Robalo-muge	Striped bass	*Morone saxatilis*
Rodovalho	Turbot	*Scophthalmus maximus*
Salmão do Atlântico	Atlantic salmon	*Salmo salar*
Salmão do Pacífico	Pacific salmon	*Oncorhynchus* spp
Salmão keta	Chum salmon	*Oncorhynchus keta*
Salmão prateado	Coho salmon	*Oncorhynchus kisutch*
Salmão real	Chinook salmon	*Oncorhynchus tshawytscha*
Salvelino-árctico	Arctic Charr	*Salvelinus alpinus*
Seriola	Yellowtail	*Seriola quinqueradiata*
Solha	Plaice	*Pleuronectes platessa*
Tilápia	Tilapia	*Orechromis spp.*
Tilápia do Nilo	Nile tilápia	*Oreochromis niloticus*
Truta arco-íris	Rainbow trout	*Oncorhynchus mykiss*
Truta comum	Brown trout	*Salmo trutta*
Truta-de-lago-americana	Lake trout	*Salvelinus namaycush*