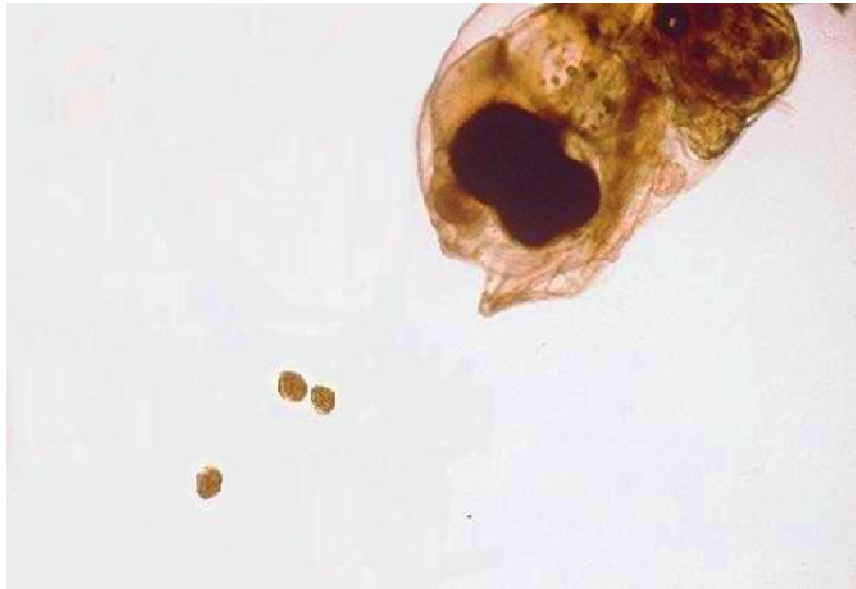


UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**REQUISITOS DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EM
MICRODIETAS PARA LARVAS DE DOURADA
(*Sparus aurata*, L., 1758)**



FILIPA SOARES ROCHA

Mestrado em Aquacultura e Pescas
Ramo de Aquacultura

2009

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**REQUISITOS DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EM MICRODIETAS
PARA LARVAS DE DOURADA (*Sparus aurata*, L., 1758)**

Mestrado em Aquacultura e Pescas
Ramo de Aquacultura

FILIPA SOARES ROCHA

Orientador: Doutor Luís Conceição

Co-orientador: Doutora Dulce Alves Martins

Faro, 2009

Para o meu Pai

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	iii
AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Descrição da espécie	1
1.2. Cultivo de dourada	2
1.2.1. Cultivo larvar	3
1.3. Alimentação de larvas de peixe	5
1.4. Importância dos ácidos gordos	7
2. METODOLOGIA GERAL	
2.1. Cultivo Larvar	10
2.1.1. Material biológico	10
2.1.2. Condições de cultivo	10
2.1.3. Desenho experimental	13
2.1.4. Amostragem	13
2.2 Alimentação das larvas	14
2.2.1. Produção de fitoplâncton	14
2.2.2. Produção de rotíferos	15
2.2.3. Preparação das dietas experimentais	16
2.2.4. Plano de alimentação	18
2.3. Parâmetros analisados	20
2.3.1. Crescimento e sobrevivência	20
2.3.2. Análise da composição proximal das dietas	21
2.3.3. Perfil de ácidos gordos	23
2.4. Análise Estatística	24
3. RESULTADOS	

3.1. Qualidade da água	25
3.2. Crescimento e sobrevivência	25
3.3. Composição lipídica das dietas experimentais	28
3.4. Composição lipídica das larvas	31
4. DISCUSSÃO	
4.1. Avaliação da performance larvar	37
4.2. Requisitos de ácido araquidónico	40
4.3. Interações entre ácidos gordos essenciais	43
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – Ácidos gordos essenciais

AGT – Ácidos gordos totais

ALA – Ácido linolénico (α -linolenic acid)

AO – Ácido oleico (oleic acid)

ARA – Ácido araquidónico (arachidonic acid)

DAE – Dias após a eclosão

DHA – Ácido docosahexaenóico (docosahexaenoic acid)

DPA – Ácido docosapentanóico (docosapentaenoic acid)

EPA – Ácido eicosapentaenóico (eicosapentaenoic acid)

FAME – Ésteres metílicos derivatizados dos ácidos gordos (fatty acids methyl esters)

HC – Hidratos de carbono

HUFA – ácidos gordos altamente insaturados (highly unsaturated fatty acids)

HUFA n-3 ou n-6 – Ácidos gordos altamente insaturados da série n-3 ou n-6

LA – Ácido linoleico (linoleic acid)

MS – Matéria seca

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados (monounsaturated fatty acids)

PA – Ácido palmítico (palmitic acid)

PUFA – ácidos gordos polinsaturados (polyunsaturated fatty acids)

SA – Ácido esteárico (stearic acid)

SFA – Ácidos gordos saturados (saturated fatty acids)

TCR – Taxa de crescimento relativo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e entidades que, de alguma forma, ajudaram a tornar possível a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, Professor Doutor Luís Conceição, por me ter proporcionado uma excelente experiência de trabalho, e por todo o apoio, disponibilidade e acompanhamento prestados durante a realização deste trabalho.

À Doutora Dulce Alves Martins, por ter aceite a co-orientação deste trabalho, pela incansável ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimentos e pela sua amizade.

À Doutora Narcisa Bandarra, directora do Laboratório de Nutrição no IPIMAR, Lisboa, por me ter proporcionado uma experiência laboratorial enriquecedora, e pelas sugestões feitas para a melhor abordagem prática.

À Doutora Luísa Valente, coordenadora do Laboratório de Nutrição, Crescimento e Qualidade do Peixe (LANUCE) no CIIMAR, Porto, por todo o apoio e atenção que me dispensou, e pela oportunidade de me integrar no seu grupo de trabalho.

Ao Doutor Pedro Pousão, responsável da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão, por ter dispensado as larvas utilizadas neste trabalho.

Às minha colegas de trabalho Helena Teixeira, Maria Filipa Castanheira e Rita Colen por terem sido inextinguíveis na prestação de apoio, indispensável para a execução do cultivo larvar, pela vossa partilha de conhecimentos e experiências tão preciosas para mim e por nunca me terem faltado!

Ao Dr. João Reis e Miguel Viegas, pela boa disposição, ensinamentos e constante disponibilidade para todos os meus contratemplos.

Aos meus colegas do grupo de Aquacultura, Elisabete Matos, Wilson Pinto, Vera Rodrigues, que juntamente com a Helena, a Maria Filipa e a Rita me ajudaram durante a amostragem final do cultivo, sem a vossa colaboração não teria conseguido.

Ao projecto EFAR (PTDC/MAR/67017/2006) – Novo Método para o Estudo dos Requisitos em Ácidos Gordos Essenciais em Larvas de Peixes.

Aos meus colegas Cláudia Silva, Pedro Borges e Cláudia Escórcio do LANUCE (CIIMAR) e à Joana Coutinho do IPIMAR, pela ajuda na realização das análises experimentais e por me terem tratado como parte da vossa equipa.

À minha família, por me incentivarem e compreenderem a minha ausência.

À minha mãe e ao meu irmão por todo o amor, apoio e coragem incondicionais que sempre me transmitiram.

Ao Tiago pela sua dedicação e ajuda constantes, pelo seu amor e compreensão em todos os momentos.

Um muito Obrigado a todos!

RESUMO

Os ácidos gordos (AG) essenciais presentes nas dietas são tidos como factores críticos no sucesso do cultivo larvar. Tem sido dado um maior destaque aos ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) devido às suas funções na integridade celular membranar e predominância nos tecidos. A importância do ácido araquidónico (ARA) no crescimento, sobrevivência e resistência ao stress é também cada vez mais reconhecida.

Realizou-se um estudo para determinar os efeitos que diferentes concentrações de ARA em microdietas causam no crescimento, sobrevivência e perfil de ácidos gordos das larvas de dourada. As larvas foram alimentadas durante 25 dias com microdietas, incluindo um período inicial de co-alimentação com rotíferos enriquecidos. Foram testadas, em triplicado, quatro microdietas experimentais que diferiam nos níveis de ARA, variando entre 0,4% e 3,0% da matéria seca (ARA0,4/ ARA0,8/ ARA1,5/ ARA3,0). As microdietas apresentavam níveis de HUFA n-3 de 4,6% e um rácio DHA/EPA de 1,4. Mediu-se o crescimento com base no peso seco e taxa de crescimento relativo, e obteve-se a sobrevivência por contagem directa. O perfil em AG dos lípidos totais das larvas foi determinado por cromatografia em fase gasosa. Após 34 dias, não se registaram diferenças significativas no crescimento e sobrevivência, apesar de existir uma tendência nos tratamentos intermédios para um menor crescimento. A composição lipídica dos tecidos reflectiu o perfil de AG das dietas, particularmente quanto ao ARA. O DHA manteve-se constante, enquanto o EPA diminuiu com o aumento de ARA, mesmo com níveis semelhantes de EPA nas dietas, sugerindo uma competição entre estes AG para a incorporação nos tecidos. Até 1,5% nas dietas, o ARA mostrou ser preferencialmente depositado nos tecidos, sendo metabolizado em concentrações superiores (3,0%). O DHA e alguns AG saturados foram preferencialmente retidos enquanto que o EPA e os ácidos linoleico (LA), α -linolénico (ALA) e oleico (OA) foram metabolizados, provavelmente para fins energéticos.

Nas condições testadas, as larvas de dourada mostraram uma boa tolerância à variação de ARA nas dietas, de 0,4% a 3,0%. No entanto, o crescimento não foi afectado nem se verificou uma melhoria da sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido araquidónico; Ácidos gordos essenciais; Crescimento; Larvas de dourada; Nutrição.

ABSTRACT

Dietary essential fatty acids (FA) are recognised as critical success factors for larval fish rearing. Major attention has been given to docosahexaenoic (DHA) and eicosapentaenoic acids (EPA) due to their role in cell membrane function and predominance in fish tissues, but the importance of arachidonic acid (ARA) on growth, survival and stress resistance are increasingly recognised.

A study was conducted to determine effects of graded dietary ARA levels on growth, survival and whole body FA composition of seabream larvae. Triplicate groups of 4 day old larvae were fed microdiets for 25 days, including an initial co-feeding period with enriched rotifers. Four similar composition diets with ARA ranging from 0.4% to 3.0% on a dry matter basis (ARA0,4/ ARA0,8/ ARA1,5/ ARA3,0) were tested. All diets presented n-3 HUFA levels of 4.6% and DHA/EPA ratios of 1.4. Growth was measured by larval dry weight and relative growth rate, and survival assessed by direct counting. Total lipid FA composition was determined by gas chromatography. After 34 days, no significant differences in growth or survival were observed, although mid-range treatments presented slightly lower growth rates. Body tissue FA composition reflected dietary profiles, particularly regarding ARA. DHA remained constant but EPA was significantly reduced with increasing ARA, despite similar EPA concentration between diets, suggesting competition between these FA for incorporation into tissues. Correlation analysis between dietary and body FA concentration indicated preferential ARA retention up to 1.5% dietary content, whereas higher concentration (3.0%) resulted in its metabolism. In general, DHA and some saturated FA were preferentially retained in tissues while EPA, linoleic (LA), α -linolenic (ALA) and oleic acid (OA) were metabolised, probably for energy purposes.

Under the experimental conditions tested, seabream larvae seemed to tolerate a range of dietary ARA from 0.4% to 3.0%, without compromising growth. Furthermore, no beneficial effects on survival were apparent with increasing dietary ARA levels.

KEY-WORDS: Arachidonic acid; Essential fatty acids; Fish nutrition; Growth; Seabream larvae.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

A espécie *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), de nome comum dourada, é um perciforme pertencente à família Sparidae e ao género *Sparus*. Apresenta como características distintivas uma faixa de cor amarela “dourada” em crescente entre os olhos e uma mancha negra por cima do opérculo (Moretti *et al.* 1999; FAO, 2005).

A dourada é uma espécie demersal, euritérmica e eurialina, podendo ser encontrada tanto em águas marinhas como estuarinas. Distribui-se pelo mar Mediterrâneo e o Nordeste Atlântico, desde as ilhas Britânicas até ao Senegal ocorrendo, muito raramente, no Mar Negro (Moretti *et al.* 1999).

São hermafroditas protândricos, os machos tornam-se funcionais nos dois primeiros anos convertendo-se em fêmeas após atingirem cerca de 30cm de comprimento. A época de reprodução natural ocorre de Outubro a Dezembro (Moretti *et al.*, 1999; FAO, 2005). As posturas são compostas por ovos esféricos e transparentes, com um diâmetro menor que 1mm e com uma única gota lipídica (Figura 1) (Fernandez-Palacios *et al.*, 1995; Moretti *et al.*, 1999).

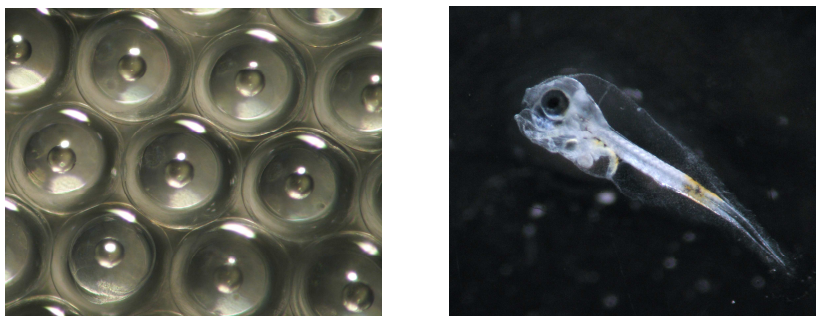


Figura 1: Ovos fecundados e larva de dourada (4 DAE) apta a alimentação exógena (fotografias: Patrícia Diogo).

A eclosão ocorre 48h após a fecundação dos ovos, a uma temperatura de 16–17°C, dando origem a larvas transparentes, pelágicas e com um comprimento total de cerca de 3mm (Moretti *et al.*, 1999; Pousão-Ferreira *et al.*, 1999).

As larvas recém eclodidas apresentam uma alimentação endógena do saco vitelino e uma fraca mobilidade, permanecendo em flutuação pela acção da circulação da água. A sua actividade aumenta, progressivamente, com a total absorção do saco vitelino que pode ocorrer entre 3 a 6 dias após a eclosão (DAE), dependendo da temperatura da água (Moretti *et al.*, 1999). No final deste período, encontram-se aptas para a alimentação exógena (Figura 1), possuindo uma visão mais apurada, com olhos pigmentados e o tubo digestivo completo (incluindo a boca aberta) mas não totalmente funcional, havendo ausência de determinadas enzimas digestivas (Moretti *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; FAO, 2005).

A dourada, nas fases juvenil e adulta, é uma espécie essencialmente carnívora, alimentando-se de moluscos, crustáceos e outros organismos bentónicos (Moretti *et al.* 1999).

1.2. CULTIVO DE DOURADA

Durante as últimas cinco décadas, a indústria da aquacultura desenvolveu-se a um ritmo quase exponencial (Moretti *et al.*, 1999). O crescimento neste sector verificou-se, principalmente, no aumento da capacidade de produção, no melhoramento da tecnologia, na expansão de mercados e na diversificação das espécies cultivadas (Shields, 2001). Em 2006, o sector da aquacultura providenciou 47% do total de pescado para consumo alimentar (FAO, 2009).

As zonas que mais contribuem para a produção de peixe a nível mundial são a Ásia, onde se destaca a China, e a Europa (FAO, 2009). No entanto, esta produção tem maior expressão em espécies de água doce, cerca de 54%, ao contrário das espécies de peixes marinhos que apenas representam 3% do total de produção, no ano 2006 (FAO, 2009).

O cultivo de peixes marinhos na Europa está principalmente direccionado para três espécies: o salmão (*Salmo salar*), o robalo (*Dicentrarchus labrax*) e a dourada (Shields, 2001). A dourada é uma espécie

que, devido à excelente qualidade da carne, ganhou uma elevada importância económica na zona sul da Europa, onde Portugal se integra, e na zona do Mediterrâneo. Por outro lado, destacou-se na área da produção por apresentar uma excelente adaptabilidade a condições de cultivo intensivo e pela existência de práticas de cultivo bem estabelecidas, iniciadas desde a antiguidade (FAO, 2005).

Consideram-se os principais produtores de dourada a Grécia, Turquia, Espanha e Itália, que em 2007 contribuíram para a produção de, aproximadamente, 125 mil ton (FAO, 2005). Em Portugal, esta espécie destaca-se por ser a mais cultivada entre os peixes, sendo que em 2006 foram produzidas em aquacultura 7,9 mil ton de pescado, dos quais 20% (1,6 mil ton) foram de dourada (INE & DGPA, 2008). O país apostou na implementação de unidades de pré-engorda e engorda de dourada, sendo praticado, na maioria dos casos, um cultivo semi-intensivo. Em 2006, existiam cerca de cinco unidades de reprodução (maternidades) para espécies salobras e marinhas, entre as quais a dourada (INE & DGPA, 2008).

Naturalmente, um aumento dos níveis de produção de uma espécie implica um aumento na procura de larvas e juvenis. Como tal, grande parte das espécies cultivadas na Europa está dependente do fornecimento de larvas provenientes de maternidades, como é o caso da dourada (Planas & Cunha, 1999). No Mediterrâneo, foi realizado um forte investimento em maternidades de dourada, existindo instalações industriais com sistemas totalmente automatizados e procedimentos zootécnicos padronizados (Moretti *et al.*, 1999; Shields, 2001).

1.2.1. CULTIVO LARVAR

O avanço na produção em aquacultura e a possibilidade de cultivar novas espécies de elevado valor económico estão dependentes do sucesso em produzir larvas e juvenis em cativeiro. O cultivo larvar é um dos períodos mais críticos do ciclo de produção, especialmente para os peixes marinhos. As larvas de peixes marinhos, como a dourada, são pequenas, frágeis e vulneráveis a quaisquer alterações do ambiente envolvente (Moretti *et al.*,

1999; Pousão-Ferreira *et al.*, 1999). Quando eclodem, não possuem todos os sistemas biológicos completamente funcionais. É o caso do sistema digestivo, que se vai tornando funcional e maturo com o desenvolvimento das larvas, constituindo, desta forma, um dos factores mais importantes a ter em conta durante o cultivo de dourada (Moretti *et al.*, 1999). A escolha do primeiro alimento deve ser feita com base no tamanho da presa em relação à boca da larva, na capacidade de captura por parte das larvas e na limitação digestiva provocada pela ausência de actividade enzimática gástrica (Planas & Cunha, 1999). Os protocolos para cultivo comercial de dourada foram desenvolvidos tendo em consideração todas as restrições existentes a nível alimentar assim como as elevadas mortalidades que ocorrem durante o primeiro mês (Moretti *et al.*, 1999).

As técnicas de larvicultura de dourada podem ser divididas entre protocolos altamente específicos (hiper-intensivos ou intensivos) e metodologias mais gerais adequadas a várias espécies (semi-intensivas ou extensivas) (Shields, 2001). Os cultivos intensivos, como a “técnica francesa”, são caracterizados por um controlo máximo dos parâmetros ambientais, uma elevada densidade larvar ($100 \text{ larvas L}^{-1}$) e produção de grandes quantidades de larvas. Os métodos menos específicos procuram simular um ecossistema natural para o desenvolvimento das larvas. Nestas condições, as larvas são criadas a baixas densidades (2 a 10 larvas L^{-1}), com poucas perturbações exteriores e praticamente sem uso de tecnologia (Moretti *et al.*, 1999; Shields, 2001; FAO 2005).

Actualmente, a maioria das maternidades de dourada utilizam sistemas intensivos de produção em “água verde”, mantendo sempre controlados os parâmetros ambientais e a densidade de cultivo das larvas (Moretti *et al.*, 1999). Procura-se maximizar o número de larvas produzidas em detrimento de larvas com melhor qualidade e taxas de sobrevivência mais altas, obtidas por métodos mais extensivos (Shields, 2001).

1.3. ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE PEIXES

Existem várias limitações que impedem a obtenção de melhores resultados nos cultivos larvares, estando a maioria relacionada com questões zootécnicas, nutricionais e de gestão de reprodutores (Planas & Cunha, 1999). No caso da dourada, estas restrições incidem sobre a nutrição larvar, quer em termos quantitativos como qualitativos, e no controlo de doenças (Moretti *et al.*, 1999).

Actualmente, as maternidades estão totalmente dependentes do uso de alimento vivo fornecido às larvas durante as primeiras semanas de alimentação exógena (Moretti *et al.*, 1999). As condições de cultivo intensivo não permitem a utilização de zooplâncton selvagem como fonte alimentar, embora seja o mais apropriado para as larvas devido ao seu equilibrado valor nutricional e, por outro lado, a produção controlada deste tipo de alimento permanece limitada (Shields, 2001). Deste modo, são exaustivamente utilizados rotíferos (*Brachionus* sp.) e *Artemia* sp. como alimento vivo para larvas de várias espécies comercialmente importantes. Os dois tipos de presa viva apresentam um elevado crescimento em condições de cultivo intensivo, sendo por isso ideais para satisfazer as necessidades das maternidades de escala industrial (Moretti *et al.*, 1999; Lubzens & Zmora, 2003).

O tamanho da presa viva utilizada na primeira alimentação é crucial para a dourada, uma vez que as larvas possuem uma boca bastante pequena e só conseguem ingerir presas menores que 100µm. Deste modo, são utilizados rotíferos desde o início da alimentação exógena até aos 27 DAE, aproximadamente (Moretti *et al.*, 1999). Quando as larvas crescem, as presas têm de ser maiores e com mais mobilidade, neste caso, a maioria das maternidades fornecem *Artemia* sp. às larvas a partir do dia 20 até ao 59 após a eclosão (Moretti *et al.*, 1999). Todo o processo é feito, normalmente, em regime de co-alimentação durante as mudanças de tipo de alimento.

Uma vez que os rotíferos e a *Artemia* sp. não fazem parte da dieta natural das larvas marinhas, o seu valor nutricional não é apropriado para um correcto desenvolvimento das mesmas (Lubzens & Zmora, 2003). Assim, é necessário melhorar os conteúdos nutricionais das presas vivas, através de técnicas de enriquecimento (Lubzens & Zmora, 2003). A manipulação

nutricional é especialmente importante em termos lipídicos, para o fornecimento de ácidos gordos essenciais (AGE) necessários para um bom crescimento e sobrevivência (Planas & Cunha, 1999; Sargent *et al.*, 1999a).

O fitoplâncton apresenta um papel importante no cultivo larvar pois quando é adicionado directamente na água dos tanques (técnica de água verde) não só contribui para a manutenção do valor nutricional das presas vivas como também proporciona às larvas melhores taxas de crescimento, sobrevivência e de conversão de alimento (Planas & Cunha, 1999; Shields, 2001; Muller-Feuga *et al.*, 2003). As espécies que geralmente são mais utilizadas nos cultivos de dourada são: *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella* sp., *Isochrysis* sp., e *Tetraselmis* sp. (Shields, 2001). A escolha das microalgas deve ter em conta o seu valor nutricional. As algas castanhas, como *Isochrysis galbana* contêm níveis relativamente altos de AGE como o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) (Muller-Feuga *et al.*, 2003). As algas verdes apresentam níveis baixos de AGE, no entanto sabe-se que *Tetraselmis chuii* proporciona aos rotíferos boas taxas de alimentação (“grazing”) (Muller-Feuga *et al.*, 2003; Southgate, 2003).

Embora as práticas de cultivo de alimento vivo e microalgas sejam usuais condicionam, de certa forma, a expansão da indústria de aquacultura, por ser uma das operações com maiores custos de produção, variando entre os 30% e 60% (Southgate, 2003).

O cultivo de larvas marinhas abrange um período de adaptação ao alimento inerte, onde se procura substituir, gradualmente, o alimento vivo por microdieta. Nas douradas, este período coincide com a metamorfose, pois o sistema digestivo das larvas encontra-se completamente funcional, podendo ser iniciado ao 45 DAE (Moretti *et al.*, 1999).

As principais vantagens na utilização de alimento inerte estão relacionadas com o baixo custo de produção, a disponibilidade imediata e a capacidade de adaptação do seu conteúdo nutricional a diversas espécies e estados de desenvolvimento, principalmente aos requisitos específicos das larvas (Southgate, 2003).

Existem diversas condições básicas para um alimento inerte ser utilizado no cultivo larvar: a) boa flutuabilidade; b) tamanho e palatabilidade apropriados que permitam uma rápida ingestão; c) estabilidade estrutural após

hidratação das partículas; d) composição nutricional apropriada aos requisitos das larvas; e) fácil digestão e absorção (Southgate, 2003; Yúfera *et al.*, 2005).

Na prática, as dietas artificiais ainda não se apresentam capazes de substituir o uso de alimento vivo desde a primeira alimentação. Vários estudos mostraram que a utilização de dietas no início do cultivo de dourada conduziu a fracos crescimentos e sobrevivências (Koven, 2002; Robin & Vincent, 2003; Robin & Peron, 2004; Yúfera *et al.*, 2005). Na dourada, as dietas artificiais são utilizadas, durante a fase larvar, apenas para reduzir as quantidades de alimento vivo fornecidas e consequentes custos de produção (Southgate, 2003). Neste sentido, o desenvolvimento de dietas artificiais adequadas à primeira alimentação proporcionaria uma maior desenvoltura económica do sector da aquacultura (Yúfera *et al.*, 2005).

1.4. IMPORTÂNCIA DOS ÁCIDOS GORDOS

Os lípidos nas dietas desempenham um papel importante como fontes de energia e de ácidos gordos essenciais, sendo também responsáveis pelo transporte de outros compostos lipossolúveis, como vitaminas e carotenóides (Rainuzzo *et al.* 1997; Sargent *et al.* 2002). Nos peixes marinhos carnívoros, os lípidos, mais especificamente, os ácidos gordos, são preferencialmente utilizados para gerar energia metabólica, via β -oxidação mitocondrial, havendo outras fontes de energia menos importantes, como os hidratos de carbono, dada a sua fraca disponibilidade nas dietas naturais (Sargent *et al.*, 2002).

Os ácidos gordos são considerados essenciais (AGE) quando não podem ser sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes para a realização de diversos processos biológicos, sendo a sua obtenção feita através da alimentação. Os peixes, como a maioria dos vertebrados, para promoverem o seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência, necessitam de três ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa, sendo estes o DHA, EPA e o ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), também denominados por ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) (Rainuzzo *et al.* 1997; Sargent *et al.*, 1999b; 2002; Izquierdo, 2005). Os peixes marinhos, ao contrário dos de

água doce, apresentam uma actividade reduzida ou inexistente das enzimas dessaturases e elongases ($\Delta 5$ e $\Delta 6$) para produzir DHA, EPA e ARA a partir dos respectivos precursores, os ácidos linolénico (ALA, 18:3n-3) e linoleico (LA, 18:2n-6) (Tocher, 2003; Izquierdo, 2005). Deste modo, quaisquer dietas para espécies marinhas têm de ser suplementadas em DHA, EPA e ARA e as quantidades a incluir dependem da fase de desenvolvimento dos peixes (Koven, 2002). Assim, são em geral elevados os requisitos em HUFA durante o período larvar (Izquierdo, 2005).

Os três principais PUFA desempenham funções vitais a nível celular e fisiológico, nomeadamente, na manutenção da integridade estrutural e funcional das membranas celulares, sendo alguns precursores importantes de um grupo de hormonas conhecidas por eicosanóides (Sargent *et al.*, 1999a; 2002; Tocher, 2003). Os principais fosfolípidos presentes nas membranas celulares dos peixes são os ácidos gordos DHA, EPA, oleico (OA, 18:1n-9) e palmítico (PA, 16:0). O ARA está presente em menores quantidades que os restantes PUFA membranares, apresentando concentrações mais elevadas no fosfatidilinositol, o qual não é um dos fosfolípidos abundantes nas membranas dos peixes (Sargent *et al.*, 1999a; 2002).

O DHA é um dos AGE mais estudados na nutrição larvar, em parte devido a existir em grandes quantidades nos tecidos das larvas, principalmente nos tecidos nervosos do cérebro e do olho (Sargent *et al.* 2002; Tocher, 2003). A importância de níveis elevados de DHA nas dietas mostra-se inequívoca (Sargent *et al.*, 1999b).

A importância do ARA na nutrição das larvas tem passado despercebida em detrimento do DHA e EPA, talvez pelo facto destes últimos serem quantitativamente predominantes nos tecidos dos peixes. Deste modo, a informação sobre os efeitos fisiológicos do ácido araquidónico nos peixes permanece limitada (Bell & Sargent, 2003). O ARA e o EPA são precursores na síntese de eicosanóides, um grupo de hormonas envolvidas numa vasta série de reacções biológicas (Sargent *et al.*, 1999a). A quantidade em que cada um destes ácidos gordos se encontra nos tecidos determina o modo de acção bem como a amplitude do efeito dos eicosanóides (Tocher, 2003), uma vez que é conhecida a interacção competitiva entre os dois ácidos gordos para a produção de eicosanóides (Sargent *et al.*, 1999b). Nos peixes, estas hormonas

são responsáveis por regular inúmeros processos fisiológicos como a osmorregulação, resposta a condições de stress e modelação dos sistemas imunitário e inflamatório (Sargent *et al.*, 1999a; Koven *et al.*, 2001; 2003; Tocher, 2003). Existem outros tipos de interacções negativas entre AGE, como a que ocorre durante a biossíntese dos fosfolípidos. Esta competição verifica-se entre ácidos gordos da mesma série mas com diferente número de átomos de carbono (ex. DHA e EPA) ou entre ácidos gordos com idêntico comprimento de cadeia mas séries diferentes (ex: EPA e ARA) (Sargent *et al.*, 1999a).

Actualmente, reúnem-se esforços para se estabelecer os requisitos óptimos em AGE para as larvas de peixes, tanto de espécies comerciais como para potenciais espécies de cultivo. Vários estudos foram e continuam a ser realizados com o intuito de determinar os requisitos mínimos de cada ácido gordo nas dietas e em que proporções cada um deve existir, de modo a proporcionar as melhores taxas de desenvolvimento e sobrevivência das larvas (Fernández-Palacios, 1995; Rodríguez *et al.*, 1998; Bessonart *et al.*, 1999; Salhi *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2008).

O presente estudo teve como objectivos estudar os requisitos nutricionais de ARA em larvas de dourada até 34 DAE através da determinação do efeito dose-resposta de ARA no crescimento, na sobrevivência e no perfil em ácidos gordos das larvas.

2. METODOLOGIA GERAL

2.1. CULTIVO LARVAR

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização desta experiência foram utilizados ovos de dourada (*S. aurata*) provenientes da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (IPIMAR, Olhão, Portugal). Estes foram obtidos a partir de uma postura natural de reprodutores mantidos em cativeiro, na mesma maternidade.

Após a eclosão das larvas, recolheram-se 20 amostras de 5 ml e procedeu-se à contagem do número de larvas presente em cada amostra. Com base na média dessas contagens, foi determinado o número total de larvas da postura. Uma vez conhecido o volume do tanque de incubação, e assumindo que as larvas estavam distribuídas uniformemente pela coluna de água, retirou-se o volume que contivesse 10000 larvas.

As larvas, mantidas em sacos plásticos, foram transportadas em caixas de esferovite até às instalações experimentais, situadas na Estação Experimental do Ramalhete, do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve.

2.1.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As larvas de dourada foram distribuídas, de modo aleatório, por doze tanques de cultivo cilíndrico de 100L, de modo a estabelecer uma densidade inicial de 100 larvas L⁻¹ (Figura 2). Efectuou-se uma aclimação das larvas à temperatura da água de cultivo, colocando cada saco num tanque durante alguns minutos, sendo depois lentamente vertido.



Figura 2: Disposição dos tanques de cultivo num lado da sala; pormenor do tanque

As larvas foram mantidas, durante 34 dias, num sistema com dois tipos distintos de recirculação da água. O primeiro sistema de recirculação, denominado interno, funcionava em cada tanque separadamente. Consistia numa recirculação da própria água do tanque e estava desprovido de qualquer tratamento da água, à excepção de arejamento. O segundo sistema, denominado externo, consistia na substituição parcial da água dos tanques por água do sistema de tratamento. Em ambos os sistemas de recirculação a entrada de água foi feita pelo fundo do tanque de modo a criar um movimento ascendente na coluna de água semelhante ao “upwelling”, o qual não perturbava as larvas. Por outro lado, a saída de água fez-se pela zona superior do tanque, onde se colocou um filtro de 150 μ m, substituído por um de 500 μ m quando as larvas já estavam maiores que a malhagem.

Os fluxos de água dos dois sistemas de recirculação sofreram aumentos progressivos, com o objectivo de manter a saturação de oxigénio acima dos 90% e nunca baixando dos 80%. O sistema de recirculação interno foi alterado uma vez ao 8 DAE, de 2 renovações para 4 renovações por dia. Esta recirculação interna serviu para manter quase inalteráveis as condições de cultivo de cada tanque, o que é particularmente importante nos primeiros dias de desenvolvimento das larvas de dourada. O sistema de recirculação externo sofreu mais alterações, variando o fluxo de 0,5 até 8 renovações por dia, ao longo do período de cultivo (ver detalhes no anexo I). Pretendeu-se, neste caso, ter uma renovação da água mais elevada quando as larvas se encontravam maiores, mais resistentes e com maior contributo para o aumento

de amónia (NH_4^+) e nitritos (NO_2^-) no sistema, provenientes de excreções e acumulação de alimento não consumido.

O cultivo funcionou em sistema fechado até ao 12º dia, passando neste dia a ser semi-fechado quando se procedeu à abertura da água do exterior. Este fluxo começou por ser de 0,5 passando a 2 renovações por dia. A tabela de fluxos de água encontra-se detalhada no anexo I.

O sistema de tratamento da água foi constituído por: filtro mecânico, tanque de depósito, bomba de água, resistências para aquecimento, filtro biológico submerso, escumador e luz ultra-violeta (Figura 3). A capacidade total do sistema de cultivo das larvas foi de 1440L, excluindo a água nas tubagens.

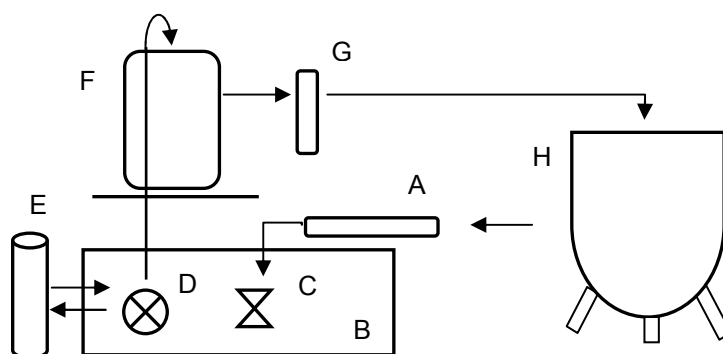


Figura 3: Sistema de tratamento da água: A. filtro mecânico; B. tanque de depósito de água; C. resistências; D. bomba submersa; E. escumador; F. filtro biológico (com biobolas); G. luz ultra-violeta; H. tanque de cultivo. As setas indicam o sentido de circulação de água dentro do sistema.

Em relação aos parâmetros físicos da água, pretendeu-se que o cultivo das larvas decorresse a uma temperatura de $18,0 \pm 0,5$ °C (regulada por resistências e ar condicionado), a uma salinidade de 35‰, com mais de 90% de oxigénio dissolvido e valores nulos de NH_4^+ e NO_2^- . Estes parâmetros foram registados, para cada tanque, diariamente ao início da manhã. Para a realização dos testes de amónia e nitritos, recolheu-se uma amostra de água, por tanque. O fotoperíodo foi de 14h de luz e 10h de obscuridade até ao 16 DAE, passando para 24h de luz até ao final da experiência. Antes da primeira alimentação do dia foi realizada, em cada tanque, uma purga para avaliação subjectiva do cheiro, numa escala de “sem cheiro” (0) até “cheiro forte” (+++), e da quantidade de matéria sólida em suspensão, usando a escala de “nenhuma” (N), “pouca” (P), “média” (M) e “muita” (MT).

A limpeza dos tanques foi feita com rampas de ar para remover a película lipídica resultante da alimentação, e sifonando / raspando o fundo dos tanques para eliminar os depósitos de matéria orgânica. As rampas de ar foram limpas diariamente e o fundo dos tanques sempre que necessário.

2.1.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Nesta experiência foram testadas quatro microdietas na alimentação de larvas de dourada durante 34 dias. As microdietas testadas em triplicado foram formuladas de modo a apresentar uma gradação no nível de ARA, de 3,7 a 30,0 mg/g. A distribuição das dietas a cada um dos doze tanques utilizados foi feita de um modo aleatório.

O regime alimentar foi composto por rotíferos e microdieta, aplicando-se um processo de co-alimentação gradual. O período de alimentação com presa viva não incluiu a utilização de *Artemia* sp.

Foi estabelecido um ponto crucial, denominado “ponto D”, no qual um mínimo de 75% das larvas apresentava microdieta no tubo digestivo e que ocorreu ao 16 DAE. A partir dessa data o fotoperíodo passou a ser contínuo (24h luz) e aumentou-se o número de refeições diárias com microdieta.

A amostragem em cada tanque foi realizada aos 16 DAE e aos 34 DAE, marcando o final da experiência. Na primeira amostragem foram recolhidas amostras para determinação do peso seco e na última para peso seco e análise lipídicas. Determinou-se ainda a sobrevivência em cada tanque.

Procedeu-se à avaliação da composição química aproximada das dietas e à análise detalhada do perfil de ácidos gordos existentes nas dietas e nos lípidos totais das larvas.

2.1.4. AMOSTRAGEM

A primeira amostragem foi realizada aos 16 DAE (“ponto D”), para determinação do peso seco, retirando-se aleatoriamente 200 larvas de cada tanque. Os indivíduos foram recolhidos, lavados com água destilada e

conservados em tubos Eppendorf[®] a uma temperatura de -20°C (uma amostra por tanque). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas durante 24h e mantidas num exsiccador até se proceder à pesagem numa balança de precisão “Sartorius” ($\pm 0,001\text{mg}$).

A última amostragem marcou o final da experiência e ocorreu ao 34 DAE. Reduziu-se o volume em todos os tanques de maneira a concentrar as larvas e proceder à amostragem. Recolheram-se amostras para os seguintes parâmetros:

- Peso seco: 50 larvas por tanque divididas por 2 tubos Eppendorf[®]. No tanque 10 apenas foram retiradas 25 larvas para um tubo Eppendorf[®].
- Análises lipídicas: não se retirou um número fixo de larvas, em média foram 97 larvas por tanque divididas por 2 tubos Eppendorf[®] (mínimo de 42 e máximo de 179 larvas por tanque).
- Sobrevivência: por contagem directa de todos os indivíduos existentes em cada tanque.

A recolha das amostras para peso seco e lípidos foi semelhante à anterior. As larvas foram recolhidas com auxílio de crivos, lavadas com água destilada e colocadas em tubos Eppendorf[®] que imediatamente foram mergulhados em azoto líquido e mantidos a -80°C . Posteriormente, foram liofilizadas (24h), pesadas e mantiveram-se conservadas a -80°C .

2.2. ALIMENTAÇÃO DAS LARVAS

2.2.1. PRODUÇÃO DE FITOPLANCTÓN

Durante o trabalho experimental foram produzidas duas espécies de microalgas – *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*.

Cada espécie de microalga foi produzida a partir de uma cultura monoespecífica em sistema intensivo. Foi efectuado um tipo de cultivo “scale-up”, que tem como princípio transferir as microalgas de pequenos para grandes volumes, sucessivamente (Southgate, 2003). Assim, as culturas começaram

em pequenos volumes sendo repicadas para garrafões de 5L (volume médio) e por último para mangas de plástico com 100L (volume grande), mantendo a mesma percentagem de inóculo correspondente a 10 % do volume final.

A água salgada utilizada foi submetida a uma desinfecção com hipoclorito de sódio (2ml L^{-1}) e neutralizada com uma solução de tiosulfato de sódio, na mesma proporção. Como este método de produção de algas tem como base a indução de “blooms”, foram adicionados nutrientes à água, utilizando 1ml de solução constituinte do meio F/2 de Guillard (1975) por cada 5L de água. Os cultivos foram realizados a uma salinidade de 32‰ (aproximadamente), com fotoperíodo de 24h luz, temperatura de 20 ± 1 °C e forte arejamento.

Iniciou-se a produção de microalgas previamente ao cultivo larvar, de modo a garantir microalgas em fase exponencial de crescimento para fornecer aos tanques de cultivo, dois dias antes da introdução das larvas nos tanques.

2.2.2. PRODUÇÃO DE ROTÍFEROS

O cultivo de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) foi efectuado em larga escala de modo a garantir as doses diárias necessárias para a alimentação das larvas de dourada. Assim, o cultivo foi realizado em quatro tanques de 100L, fortemente arejados, com a água a uma temperatura de 25°C e salinidade entre os 22 e 25‰. Os tanques encontravam-se numa sala climatizada com fotoperíodo de 24h luz. A densidade inicial para o começo de um cultivo foi de 250 rot ml^{-1} . A alimentação consistiu na adição de “Culture Selco 3000” (INVE AQUACULTURE, Bélgica), cinco vezes por dia. A quantidade de alimento diário foi determinada com base na densidade de rotíferos (rot ml^{-1}), na estimativa do número total de rotíferos e seguindo as indicações de uma tabela fornecida pelo fabricante do alimento utilizado. Diariamente, foi calculada a quantidade de rotíferos a enriquecer para alimentar as larvas no dia seguinte, esse volume foi filtrado e colocado noutra tanque.

Os rotíferos, como alimento vivo, não são nutricionalmente adequados para as larvas de peixes marinhos, sendo necessário proceder ao seu enriquecimento em AGE.

O enriquecimento começou com o início da alimentação exógena das larvas, tendo sido utilizado para esse efeito o produto “Easy DHA Selco” (INVE AQUACULTURE, Bélgica). O cultivo de rotíferos enriquecidos foi feito num tanque de 100L, a uma densidade inicial de 300 rot ml⁻¹. As condições de cultivo mantiveram-se tal como descrito para os rotíferos não enriquecidos, acrescentando-se o enriquecimento “Easy DHA Selco” numa proporção de 0,1g L⁻¹. Foram administrados, previamente, 20% desse total ao tanque de cultivo para evitar que os rotíferos sofressem longos períodos de jejum. O restante enriquecimento foi repartido em duas doses fornecidas 6h e 4h antes da recolha para alimentação das larvas.

Ao total de rotíferos calculado para enriquecimento foi acrescentado mais 20% de modo a compensar possíveis perdas durante as filtrações. Todos os dias foi calculado o número de rotíferos existente no tanque de enriquecimento, de modo a ajustar a dose diária a fornecer às larvas. Nas ocasiões em que a quantidade não foi suficiente para atingir a dose diária, foram acrescentados rotíferos não enriquecidos (Anexo II). Antes de serem administrados às larvas, os rotíferos enriquecidos foram filtrados e lavados com água salgada a 25°C.

O enriquecimento terminou ao 19 DAE, quando as quantidades fornecidas passaram a ser muito reduzidas, cerca de 0,5 rot ml⁻¹.

2.2.3. PREPARAÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

As quatro microdietas foram elaboradas a partir dos ingredientes apresentados na Tabela 1, onde se pode verificar que para a componente lipídica foram utilizados três óleos vegetais (linhaça, girassol e azeite), um concentrado de EPA (Incromega) e dois óleos ricos em DHA (DHASCO[®]) e ARA (ARASCO[®]). As microdietas diferiram na percentagem de ácido araquidónico incorporado; a variação está representada nas siglas utilizadas para identificação de cada dieta, “ARA 0,4”, “ARA 0,8”, “ARA 1,5” e “ARA 3,0” onde cada valor indica a percentagem deste ácido gordo observada no peso seco da dieta.

Tabela 1: Lista de ingredientes e composição proximal das diferentes microdietas experimentais ARA 0,4 /ARA 0,8 /ARA 1,5 /ARA 3,0^a

Dietas	ARA 0,4	ARA 0,8	ARA 1,5	ARA 3,0
Ingredientes (g/100g)				
Farinha de choco ¹	42,0	42,0	42,0	42,0
Hidrolisado de peixe ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Farinha de peixe ³	5,0	5,0	5,0	5,0
Caseína ⁴	5,0	5,0	5,0	5,0
Alginato de sódio ⁵	7,0	7,0	7,0	7,0
Dextrina ⁶	1,3	0,9	0,7	0,4
Lecitina de soja ⁷	5,0	5,0	5,0	5,0
Óleo de linhaça	3,5	3,0	3,0	0,0
Óleo de girassol	3,4	3,0	1,0	0,0
Azeite	2,0	2,0	2,0	2,0
ARASCO ⁸	0,7	2,1	4,4	8,8
DHASCO ⁹	4,0	4,0	4,0	4,0
Incromega ¹⁰	3,1	3,0	2,9	2,8
Premix vitamínico ¹¹	2,0	2,0	2,0	2,0
Ácido ascórbico ¹²	3,0	3,0	3,0	3,0
Acetato de α -Tocoferol ¹³	1,0	1,0	1,0	1,0
Premix mineral ¹⁴	2,0	2,0	2,0	2,0
Composição				
Matéria seca (%)	97,4	96,8	96,9	97,1
Proteína bruta (% p.s.)	58,0	59,5	59,5	57,9
Gordura bruta (% p.s.)	27,3	25,0	25,4	27,3
Hidratos de carbono (% p.s.)	10,9	11,9	11,1	11,0
Cinzas (%p.s.)	3,8	3,5	4,0	3,7
Energia bruta (kJ/g)	25,4	25,1	25,2	25,8

^a Os valores nas siglas correspondem aos dados observados de ácido araquidónico (ARA) presente em cada uma das microdietas, % p.s. da dieta.

¹ Scampi Powder, Rieber & Søn ASA, Bergen, Norway.

² CPSP-90, Soprepêche, France.

³ AgloNorse Microfeed, Norsildmel Innovation AS, Bergen, Norway.

⁴ VWR International, Fontenay sous Bois, France.

⁵ ICN 154724.

⁶ Commercial grade type I, MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France.

⁷ Lecitina de soja refinada, MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France.

⁸ Óleo vegetal de fungos, appr. 40% ARA, Market life enriched TM, MARKET Biosciences Corporation

⁹ Óleo vegetal de microalgas, appr. 40% DHA, Market life enriched TM, MARKET Biosciences Corporation

¹⁰ Incromega TG7010 SR, Croda, USA

¹¹ Premix de vitaminas forneceu o seguinte (por kg de dieta): vitamina A/D3 500/100, 1000mg; vitamina D3 500, 40mg; vitamina E 50, acetato alfa-tocoferol, 3000mg; vitamina K3 23%, 220mg; tiamina HCl, 50mg; riboflavina 80, 250mg; pantotenato de cálcio, 1100mg; niacina, 500mg; piridoxina, 150mg; ácido fólico, 50mg; vitamina B12 0,1, 500mg; biotina 20, 38mg; ácido ascórbico polifosfatado 35%, 57,2g; cloreto de colina 60%, 100g; inositol, 15g; antioxidantes, 1,25%.

¹² Sódio/cálcio ascorbil-2-fosfato, Rovimix STAY-C 35, DSM Nutritional Products, Inc.

¹³ Acetato de DL-alfa-tocoferol, MP Biomedicals, LLC, Eschwege, Germany

¹⁴ Premix de minerais forneceu o seguinte (por kg de dieta): fosfato de cálcio, 35,2%; carbonato de cálcio, 11,5%; cloreto de sódio, 20%; cloreto de potássio, 26%; sulfato de cobre, 0,024%; sulfato de magnésio, 5%; sulfato de ferro, 0,6%; sulfato de manganês, 0,81%; sulfato de zinco, 0,17%; iodeto de potássio, 0,0031%; selenito de sódio, 0,6%.

Para a preparação das microdietas foi utilizada uma modificação do procedimento de microencapsulação por gelificação interna, descrito por Yúfera *et al.* (2005). Este método permite formar microcápsulas que contêm a dieta experimental incorporada numa matriz de alginato de sódio. A elaboração das dietas decorreu no Instituto de Ciências Marinhas de Andaluzia (Cádiz, Espanha). Os ingredientes da dieta juntamente com citrato de cálcio foram dispersos numa solução de alginato de sódio. Duas partes desta solução foram homogeneizadas com lecitina de soja e azeite. Seguidamente foi adicionada à emulsão uma solução de ácido acético e óleo vegetal. As microcápsulas que se formaram foram dispersas numa solução de cloreto de cálcio, seguido de uma lavagem com “Tween 80”. As microcápsulas foram lavadas com água doce, liofilizadas e armazenadas a -20°C até à sua utilização.

Esta metodologia incluiu duas fases, primeiro uma emulsificação dos ingredientes das dietas e reagentes seguido de uma gelificação interna das microcápsulas, segundo um enrijamento da superfície por gelificação externa. Este método permite que a microdieta apresente várias condições favoráveis à alimentação de larvas marinhas tais como boa fluabilidade, estabilidade estrutural, tamanho e palatibilidade adequados (Yúfera *et al.*, 2005).

Antes de serem administradas às larvas, as microdietas foram crivadas de maneira a separar partículas inferiores a $200\mu\text{m}$ e entre 200 e $400\mu\text{m}$.

2.2.4. PLANO DE ALIMENTAÇÃO

As larvas de dourada foram mantidas no escuro até à abertura da boca, que ocorreu ao 4 DAE. Considerou-se o início da alimentação exógena quando mais de 75% das larvas apresentavam a boca aberta.

Iniciou-se a alimentação com rotíferos (*B. plicatilis*) fornecendo uma densidade média de $7,2 \text{ rot ml}^{-1}$ até ao 14 DAE. Ao 15 DAE houve uma redução drástica na dose diária, de forma a estimular as larvas a ingerirem microdieta, passando a ser perto de 1 rot ml^{-1} . Esta dose foi reduzida gradualmente, cessando ao 25 DAE.

A alimentação das larvas com rotíferos foi dividida em duas refeições, uma até às 10:30h e outra às 16:30h, para evitar períodos de jejum e eventuais mortalidades. Os rotíferos foram introduzidos no tanque das larvas através do tubo de recirculação da água, entrando pelo fundo do tanque, de modo a otimizar a sua distribuição na coluna de água e a minimizar perturbações ao hidrodinamismo do tanque. Durante o período de alimentação com rotíferos, foi adicionado, diariamente, 1L de mistura das microalgas *T. chuii* e *I. galbana* em cada tanque de cultivo, também através do tubo de circulação da água pelas razões já referidas.

A adaptação ao alimento inerte teve início ao 9 DAE e foi feita em co-alimentação, isto é, foi introduzida uma quantidade de microdieta na alimentação com rotíferos, para habituar as larvas à presença de alimento inerte. Este processo foi gradual, aumentando a quantidade de microdieta e diminuindo a concentração de rotíferos, em cada refeição. A adaptação terminou ao 25 DAE e as larvas passaram a alimentar-se, exclusivamente, de microdieta. Assim, e de um modo resumido, as larvas de dourada alimentaram-se cinco dias com rotíferos, dezassete dias em co-alimentação e oito dias unicamente com alimento inerte.



Figura 4: Alimentador automático com as 8 refeições diárias programadas; método de hidratação da microdieta com tubos “falcon”.

Em cada tanque foi colocado um alimentador automático modelo “Fishmate” (PETMATE, Inglaterra), para fornecer pequenas quantidades de microdieta às larvas. Inicialmente, o alimento foi fornecido em cinco refeições por dia (9h, 12h, 15h, 18h, 21h) e após a alteração do fotoperíodo para 24h de luz (no “ponto D” da experiência) as refeições passaram a ser oito com

intervalos de 3h (9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h, 3h, 6h). A microdieta foi hidratada durante alguns segundos antes de ser introduzida na água e servir de alimento às larvas. Para isso, ao alimentador automático foi fixado um tubo “falcon” no qual circulava água capaz de o encher até uma certa altura e por desnivelamento o “falcon” esvaziava (Figura 4). O objectivo da hidratação das microdietas foi o de impedir que as partículas de alimento ficassem retidas na interface ar-água pela tensão superficial.

A quantidade de microdieta fornecida por dia variou de 0,2g a 0,8g por tanque para as partículas menores que 200µm e 0,5g a 1g por tanque para as partículas entre 200-400µm de tamanho. O plano detalhado da alimentação das larvas de dourada utilizado nesta experiência encontra-se no Anexo II.

2.3. PARÂMETROS ANALISADOS

2.3.1. CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

O peso individual de cada larva foi estimado com base no peso seco da amostra recolhida de cada tanque e o número de larvas existente nessa amostra. Para o crescimento foi utilizada a taxa de crescimento relativo (TCR, % peso do corpo/ dia), calculada com base nos pesos individuais das larvas, para cada um dos tanques de cultivo, tendo sido utilizada a seguinte fórmula:

→ $TCR = (e^g - 1) * 100$, onde $g = \frac{[\ln(P_2) - \ln(P_1)]}{t_2 - t_1}$, sendo P_1 e P_2 o peso inicial e final, e t_1 e t_2 o período inicial e final.

A TCR foi calculada para os períodos 4-16 DAE e 16-34 DAE. Para a determinação da TCR ao 16 DAE foi necessário estimar o valor de peso seco das larvas no momento em que iniciaram a alimentação exógena (4 DAE). Recorreu-se para isso aos valores apresentados por Pousão-Ferreira *et al.* (1999), para larvas de dourada com 3 DAE.

A sobrevivência foi determinada a partir de dois métodos, um “conservador” (método 1) e outro “optimista” (método 2). A diferença consistiu em incluir ou não 200 larvas amostradas aos 16 DAE em cada tanque de cultivo. No método 1 não foram utilizadas as 200 larvas no cálculo da sobrevivência final, sendo que estes resultados mostram o número de larvas existente, em cada tanque, no final do cultivo. O método 2 incluiu as 200 larvas uma vez que destas larvas que foram retiradas não foi possível prever quantas iriam sobreviver até ao final da experiência. Deste modo, prevê-se que a sobrevivência real desta experiência se encontre entre os valores calculados por cada método.

Foi ainda determinada a biomassa de cada tanque (peso seco * nº de larvas no tanque) para avaliar se existiam diferenças no incremento de peso das larvas, mediante os diferentes tratamentos.

2.3.2. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS DIETAS

A determinação da composição química aproximada das quatro dietas experimentais foi realizada nas instalações do CIIMAR (Porto), sob a orientação do grupo de Nutrição, Crescimento e Qualidade do Peixe (LANUCE), com exceção da determinação do valor de gordura bruta. Esta análise foi realizada nas instalações do IPIMAR, em Lisboa.

→ Matéria seca

O teor em matéria seca (MS) de cada amostra foi calculada pela variação de massa antes e após a secagem numa estufa (“Binder”) a 105°C, até obtenção de um peso constante. Neste procedimento seguiu-se a metodologia descrita por Horowitz (2006). A amostra recolhida foi de 0,500 mg, em duplicado, para cada dieta analisada. Com os valores das massas aplicou-se a seguinte fórmula,

$$\% \text{ MS} = \frac{\text{massa da amostra seca a } 105^{\circ}\text{C}}{\text{massa inicial da amostra}} * 100$$

→ Cinza

As cinzas foram determinadas pela variação de massa antes e após a incineração numa mufla “Nobertherm”, até ser obtido um peso constante. Seguiu-se a metodologia descrita por Horowitz (2006). A amostra utilizada foi a mesma da matéria seca. A seguinte fórmula foi aplicada,

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{massa da amostra seca a } 500^{\circ}\text{C } 5\text{h}}{\text{massa "inicial" (amostra da matéria seca)}} * 100$$

→ Proteína bruta

O teor em proteína bruta (N*6,25) foi determinado pelo método de combustão, utilizando um analisador de azoto LECO, modelo FP-528, segundo a metodologia descrita em Horowitz (2006). A amostra utilizada foi cerca de 100mg tendo sido cada dieta analisada em duplicado. Para determinar o valor aplicou-se a seguinte fórmula,

$$\% \text{ Proteína (MS)} = \frac{\text{Valor da proteína obtido no LECO}}{\text{MS da amostra analisada}} * 100$$

→ Energia bruta

A energia bruta foi determinada recorrendo a uma combustão por acção do oxigénio. O calor que foi libertado pela combustão foi absorvido pelo calorímetro causando uma elevação da temperatura da água que foi medida por um termómetro de precisão “Beckmann”, antes e depois da reacção terminar. Utilizou-se um sistema de calorimetria IKA C2000, (IKA-Werke GMBH & CO.KG, Germany). O aparelho foi calibrado com ácido benzóico. As amostras foram analisadas em duplicado, cada uma com um peso de 200mg.

→ Gordura bruta

A gordura bruta foi determinada por extracção contínua com éter etílico (99,9%) durante 7h, usando uma bateria de placas de aquecimento “Selecta”

como aparelho de extracção. Seguiu-se o método de “Soxhlet”. Utilizou-se uma amostra de 1g, em duplicado, para cada microdieta. A seguinte fórmula foi aplicada,

$$\% \text{ Gordura (MS)} = \frac{\text{Massa do balão com gordura} - \text{massa do balão}}{\text{MS da amostra analisada}} * 100$$

→ Hidratos de carbono

Para complementar a análise feita à composição das dietas, estimou-se a percentagem de hidratos de carbono (HC) utilizando a seguinte fórmula,

$$\% \text{ HC} = 100 - (\% \text{ proteína bruta} + \% \text{ gordura bruta} + \% \text{ cinzas})$$

2.3.3. PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS

O método de determinação do perfil de ácidos gordos dos lípidos totais foi idêntico para as amostras das microdietas e as amostras de larvas de dourada. As amostras de microdietas foram preparadas com 150mg, em duplicados e as amostras de larvas tiveram um valor de massa variado dependente da amostragem realizada para a análise lipídica. Uma vez que a quantidade de cada amostra foi muito baixa (média de 17,64mg; mínimo de 7,7mg e máximo de 29,7mg), não foram utilizados duplicados para cada tanque de cultivo. Para além disso, devido a problemas no processamento das amostras perderam-se uma das amostras de larvas do tratamento ARA0,4 e do tratamento ARA0,8.

O processo de extracção e quantificação dos ácidos gordos das amostras foi efectuado segundo o método de transesterificação por catálise ácida (Cohen *et al.*, 1988). Para a análise qualitativa e quantitativa da composição em ácidos gordos das amostras foi usada a técnica de cromatografia em fase gasosa. Os ésteres metílicos derivatizados dos ácidos gordos (FAME) foram analisados no cromatógrafo Varian Cp 3800, com um detector de ionização (FID). Os FAME foram separados numa coluna de coluna

de polietilenoglicol (30m x 0,25mm ID x 0,25 μ m). A temperatura do injectore do detector foram mantidas constantes aos 250°C durante os 40min da análise. A coluna foi sujeita a uma rampa de temperaturas iniciando-se nos 180°C durante 5min e acabando nos 220°C durante 25 min. O padrão interno utilizado foi o ácido gordo saturado 21:0 na concentração de 5 mg ml⁻¹.

Os resultados foram obtidos sob a forma de um cromatograma. A identificação dos picos foi efectuada pelo método directo, através dos tempos de retenção de FAME, utilizando como padrão um óleo comercial PUFA nº 3 extraído do menhadem-escamudo (*Brevoortia patronus*) (SIGMA-ALDRICH®, USA)

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nesta experiência foram expressos através da média aritmética seguida da variação positiva e negativa do desvio padrão. Estes resultados foram submetidos a uma análise de variância de factor único (ANOVA). As diferenças encontradas entre os tratamentos foram avaliadas através do teste de Tukey – HSD, para comparação múltipla de médias.

Foi também testada a homogeneidade e a normalidade da distribuição dos valores usando o teste de homogeneidade de variâncias e o teste de Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando os dados não apresentavam uma distribuição normal ($p < 0.05$ para todos os parâmetros analisados), foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de médias.

Para verificar a existência de correlações entre ácidos gordos das dietas “versus” ácidos gordos das larvas e crescimento “versus” sobrevivência das larvas recorreu-se à correlação de Pearson.

Em todas as análises realizadas considerou-se o valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese nula (Zar, 1998). Toda a componente estatística foi executada com auxílio do programa informático SPSS® versão 16.0 para o Windows.

3. RESULTADOS

3.1. QUALIDADE DA ÁGUA

Os parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se relativamente estáveis durante o período de cultivo das larvas (Tabela 2). A temperatura da água permaneceu entre os 16,5°C e os 19,1°C em todos os tanques de cultivo. Os valores mais baixos foram registados no início da experiência, até ao 5 DAE. A salinidade apresentou uma baixa oscilação, com valor mínimo de 35‰ e máximo de 36,5‰. Relativamente à saturação de oxigénio esta apresentou um valor médio de $94,4 \pm 2,7$ %. Registaram-se os valores de saturação mais baixos entre o 7 e 9 DAE, onde o mínimo foi de 80%. Os níveis de NH_4^+ e NO_2^- permaneceram entre 0 e 0,25 ao longo da experiência.

Tabela 2: Valores de temperatura, salinidade e oxigénio (média \pm d.p.) observados durante o período de cultivo

	Temperatura (°C)	Salinidade (‰)	Oxigénio (% saturação)
Média	18,4	35,6	94,4
Dv. Padrão	0,60	0,29	2,74
Máximo	19,1	36,5	100
Mínimo	16,5	35	80

3.2. CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA

O crescimento das larvas foi analisado com base no peso seco e na taxa de crescimento relativo (TCR). Foi possível verificar que as quatro microdietas proporcionaram às larvas um aumento no peso, durante a experiência (do dia 3 ao 34) (Figura 5). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas para os valores de peso seco ao 16 DAE e 34 DAE, entre os tratamentos de diferentes concentrações de ARA (Tabela 3).

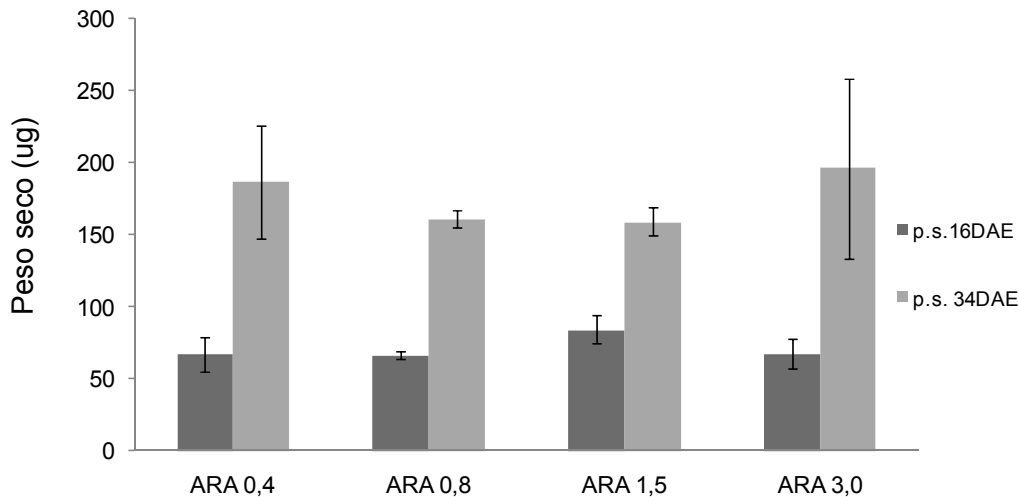


Figura 5: Peso seco das larvas aos 16 e 34 DAE (Média \pm desvio padrão), após terem sido alimentadas com as microdietas experimentais (n=3).

Os testes realizados para verificação dos pressupostos da ANOVA demonstraram que os valores de peso seco das larvas com 34 DAE não apresentavam homogeneidade de variâncias. Deste modo, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Por regra, o peso é uma variável que se apresenta como homogénea. O facto de não se verificar homogeneidade entre os valores de peso seco pode estar relacionado com o tamanho da amostra ser pequeno (n=3), influenciando os resultados estatísticos.

Tabela 3: Parâmetros de crescimento e sobrevivência das larvas alimentadas com as microdietas experimentais

	Tratamento				p
	ARA 0,4	ARA 0,8	ARA 1,5	ARA 3,0	
Peso seco (μ g)					
Dia 3 ¹	23,54	23,54	23,54	23,54	-
Dia 16	68,64 \pm 0,02	66,40 \pm 0,00	84,11 \pm 0,01	67,45 \pm 0,01	0,130
Dia 34 ²	186,85 \pm 0,04	160,79 \pm 0,01	159,22 \pm 0,02	196,41 \pm 0,05	0,715
Biomassa (g)	0,054 \pm 0,02	0,062 \pm 0,02	0,059 \pm 0,02	0,047 \pm 0,02	0,804
Sobrevivência (%)					
método 1	2,85 \pm 0,54	3,93 \pm 1,42	3,71 \pm 1,03	2,51 \pm 1,73	0,498
método 2	4,80 \pm 0,53	5,85 \pm 1,39	5,63 \pm 1,01	4,46 \pm 1,70	0,497
TCR (%)					
3-16 Dias	6,70 \pm 1,16	6,69 \pm 0,27	8,26 \pm 0,77	6,75 \pm 1,05	0,153
16-34 Dias	5,83 \pm 1,74	5,04 \pm 0,04	3,63 \pm 0,98	5,98 \pm 1,74	0,195

Média \pm desvio padrão; Não se registaram diferenças significativas

¹ média para larvas com 3 DAE, apresentados por Pousão-Ferreira *et al.* (1999)

² parâmetro analisado com o teste Kuskal-Wallis, $p < 0,05$

Em relação à biomassa das larvas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

Verificaram-se valores mais elevados para a TCR entre o dia 3 e 16 após a eclosão do que na segunda fase experimental (16 a 34 DAE), o que sugere que ocorreu um abrandamento no crescimento (Figura 6). As larvas que receberam o tratamento ARA1,5 mostraram ter a maior discrepância entre os valores das TCR. Uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de crescimento para os dois períodos (Tabela 3), determinou-se o tamanho do efeito (ETA^2), uma medida da associação entre as variáveis. Os valores de ETA^2 foram 0,46 (para TCR 3-16 DAE) e 0,43 (para TCR 16-34 DAE), o que significa que existe um efeito grande, isto é, parte da variância encontrada na TCR posso ser explicada pelos tratamentos aplicados, neste caso as microdeietas. Assim, mesmo com ausência de diferenças significativas é possível estabelecer uma tendência para menor crescimento das larvas alimentadas com as dietas ARA0,8 e ARA1,5, ao fim de 34 dias de cultivo.

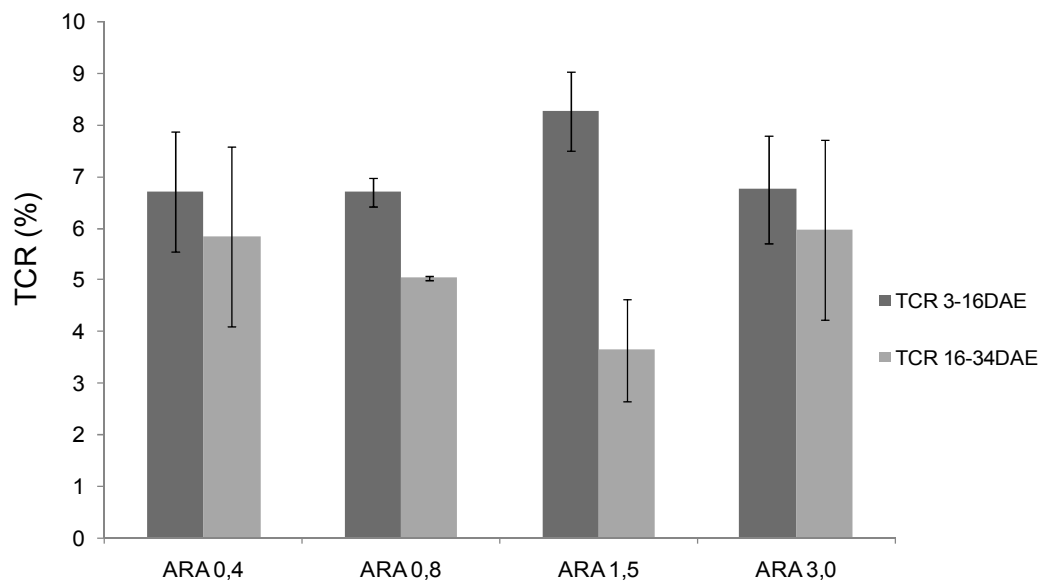


Figura 6: Taxa de crescimento relativo (TCR) (Média \pm desvio padrão) das larvas de dourada aos 16 e 34 DAE alimentadas com as microdietas experimentais durante 7 e 25 dias, respectivamente (n=3)

A taxa de sobrevivência obtida foi relativamente baixa, estando entre 2,5% e 3,9% para o método 1 e entre 4,5% e 5,9% para o método 2 de cálculo (Figura 7). Mais uma vez, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos tanto para o método 1 como para o método 2.

Verificou-se que o grau de correlação de Pearson entre a sobrevivência e o crescimento (peso seco) das larvas foi fraco ($p=0,37$).

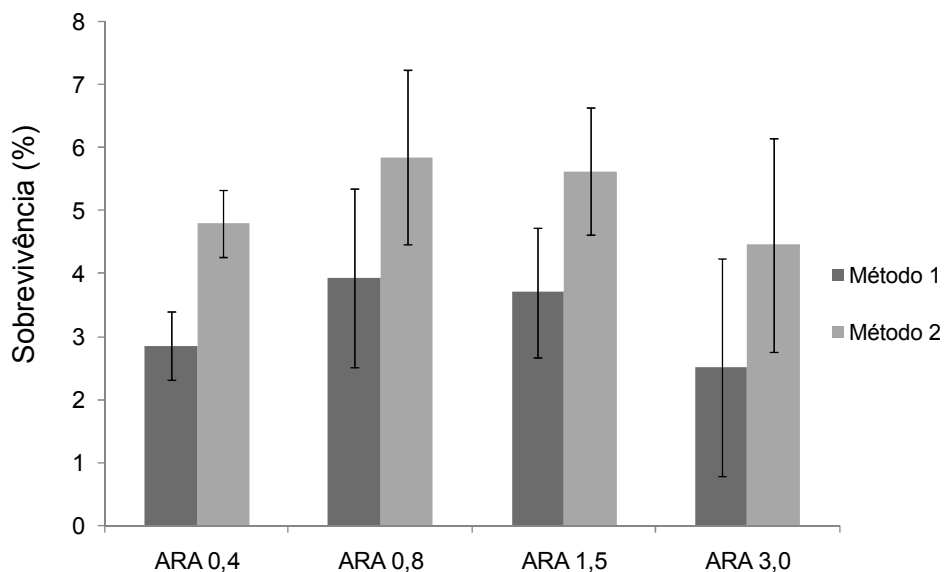


Figura 7: Representação dos dois métodos de quantificação de sobrevivência das larvas após 34 dias de cultivo. Valores de médias percentuais \pm desvio padrão, (n=3).

3.3. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS

As microdietas experimentais apresentaram um elevado conteúdo proteico, com valores entre 57,9% a 59,5%, um teor lipídico entre 25% a 27,3% e um valor de energia bruta próximo de 25 kJ g⁻¹ de dieta (Tabela 1). A composição em ácidos gordos das microdietas experimentais, “ARA0,4”; “ARA0,8”; “ARA1,5”; “ARA3,0” está representada na Tabela 4.

O aumento gradual de ARA nas microdietas não foi acompanhado por alterações nos níveis totais de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), polinsaturados (PUFA) e altamente insaturados da série n-3 (HUFA n-3). No caso dos ácidos gordos saturados (SFA), verificou-se um aumento dos valores para o tratamento ARA3,0, embora pouco pronunciado. relação aos estes apresentaram um valor ligeiramente mais elevado para o tratamento ARA3,0.

Comprovou-se que ocorreu efectivamente, entre as dietas, um aumento significativo dos níveis de 20:4n-6 (ARA) (Figura 8). Por sua vez, os

níveis dos ácidos gordos 18:2n-6 (LA) e 18:3n-3 (ALA) sofreram uma diminuição com a inclusão de ARA nas dietas, mais marcante para o ALA, que apresentou um valor para o tratamento ARA3,0 onze vezes menor que para o tratamento ARA0,4.

O ácido gordo 20:5n-3 (EPA) apresentou um valor mais elevado no tratamento ARA0,4 não diferindo nos restantes tratamentos, no entanto esta diferença é pouco marcada (Figura 8).

O ácido gordo 22:6n-3 (DHA) manteve os níveis praticamente inalteráveis entre os tratamentos. O total de PUFA n-3 demonstrou uma diminuição dos valores com o aumento dos níveis de ARA nas dietas. Em relação às razões EPA/ARA e DHA/ARA, verificou-se uma diminuição entre os tratamentos, com a maior concentração de ARA.

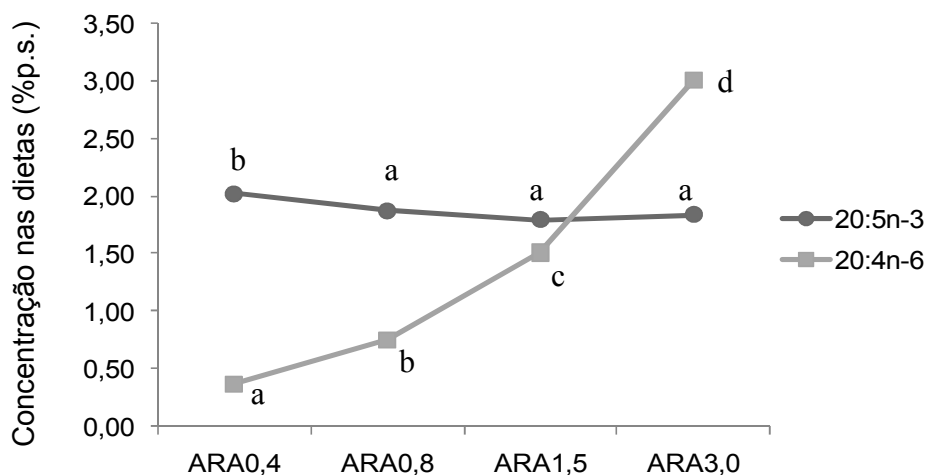


Figura 8: Níveis de 20:5n-3 (EPA) e 20:4n-6 (ARA) presentes nas microdietas experimentais (% peso seco); para o mesmo ácido gordo letras diferentes indicam diferenças significativas ($p=0,05$)

Tabela 4: Total de FAME (mg g^{-1} de amostra) e perfil em ácidos gordos (% peso seco na dieta; p.s.) das microdietas experimentais utilizadas na alimentação das larvas de dourada com 34 DAE.

Tratamento	ARA 0,4	ARA 0,8	ARA 1,5	ARA 3,0	p
Total FAME (mg/g)	182,2 ± 7,31	171,7 ± 0,54	171,3 ± 2,39	179,3 ± 1,12	0,108
Ácidos gordos					
14:0	0,53 ± 0,02	0,52 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,196
16:0	2,21 ± 0,05 ^b	2,05 ± 0,02 ^a	2,13 ± 0,03 ^{ab}	2,41 ± 0,03 ^c	0,002
18:0	0,64 ± 0,02 ^a	0,64 ± 0,00 ^a	0,74 ± 0,01 ^b	0,92 ± 0,02 ^c	0,001
Total SFA	3,53 ± 0,11 ^a	3,36 ± 0,03 ^a	3,54 ± 0,05 ^a	4,03 ± 0,05 ^b	0,002
16:1*	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,1
18:1**	4,18 ± 0,25	3,94 ± 0,02	3,91 ± 0,04	3,95 ± 0,06	0,266
20:1n-9	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,22 ± 0,00 ^b	0,002
Total MUFA	4,53 ± 0,25	4,27 ± 0,02	4,26 ± 0,04	4,30 ± 0,06	0,271
18:2n-6	3,37 ± 0,11 ^d	2,76 ± 0,02 ^c	1,93 ± 0,03 ^b	1,49 ± 0,01 ^a	0,001
20:4n-6	0,37 ± 0,02 ^a	0,75 ± 0,00 ^b	1,51 ± 0,02 ^c	3,00 ± 0,04 ^d	0,001
Total n-6 PUFA	3,80 ± 0,16 ^a	3,60 ± 0,02 ^a	3,58 ± 0,05 ^a	4,71 ± 0,02 ^b	0,001
18:3n-3	1,39 ± 0,04 ^c	1,13 ± 0,00 ^b	1,10 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,00 ^a	0,001
18:4n-3	0,15 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,00 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,00 ^a	0,007
20:4n-3	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,179
20:5n-3	2,02 ± 0,03 ^b	1,87 ± 0,01 ^a	1,79 ± 0,04 ^a	1,84 ± 0,02 ^a	0,003
22:6n-3	2,69 ± 0,08	2,65 ± 0,00	2,58 ± 0,03	2,67 ± 0,01	0,194
Total n-3 PUFA	6,33 ± 0,21 ^c	5,91 ± 0,01 ^{bc}	5,72 ± 0,09 ^b	4,85 ± 0,03 ^a	0,001
n-3/n-6	0,17 ± 0,00 ^c	0,16 ± 0,00 ^{bc}	0,16 ± 0,00 ^b	0,10 ± 0,00 ^a	0,001
TOTAL PUFA	10,16 ± 0,37	9,54 ± 0,01	9,34 ± 0,14	9,60 ± 0,01	0,052
HUFA n-3	4,75 ± 0,15	4,58 ± 0,01	4,44 ± 0,06	4,54 ± 0,01	0,078
DHA/EPA	1,33 ± 0,02 ^a	1,41 ± 0,01 ^b	1,44 ± 0,01 ^b	1,46 ± 0,01 ^b	0,004
EPA/ARA	5,44 ± 0,23 ^d	2,49 ± 0,01 ^c	1,19 ± 0,01 ^b	0,61 ± 0,00 ^a	0,001
DHA/ARA	7,26 ± 0,19 ^d	3,53 ± 0,01 ^c	1,71 ± 0,01 ^b	0,89 ± 0,01 ^a	0,001

Valores representam a média ± desvio padrão dos ácidos gordos presentes nos lípidos totais das dietas;

* Soma dos isómeros 16:1n-7 e 16:1n-9; ** Soma dos isómeros 18:1n-7 e 18:1n-9.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$);

FAME, éster metílico de ácido gordo; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; HUFA, ácidos gordos altamente insaturados

3.4. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DAS LARVAS

Em termos gerais, o perfil em ácidos gordos dos lípidos totais das larvas de dourada reflectiu o perfil das dietas experimentais, anteriormente descrito. A composição lipídica das larvas está descrita na Tabela 5, em termos de percentagens individuais de ácidos gordos e FAME totais.

O aumento gradual dos níveis de ARA nas dietas não provocou alterações no valor total de SFA, MUFA e PUFA. Para os HUFA n-3 e PUFA n-3, verificou-se um decréscimo significativo dos valores com a inclusão gradual de ARA nas dietas, sendo menos pronunciada a diferença entre os tratamentos ARA0,8 e ARA1,5. No caso dos PUFA n-6 apenas o tratamento ARA3,0 registou um valor mais elevado comparativamente aos restantes tratamentos.

Numa observação mais detalhada, constatou-se que as larvas apresentaram um aumento dos níveis de 20:4n-6 (ARA) entre os tratamentos ARA0,4 e ARA3,0 embora este não tenha sido estatisticamente significativo entre os grupos ARA0,4 e ARA0,8. A concentração dos ácidos gordos 18:2n-6 (LA) e 18:3n-3 (ALA) diminuiu com o aumento de ARA nas dietas, contudo para o ALA o tratamento ARA0,8 não provocou diferenças acentuadas.

A percentagem de 20:5n-3 (EPA) nas larvas foi mais elevada com os tratamentos ARA0,4 e ARA0,8 do que nos grupos alimentados com níveis superiores de ácido araquidónico (ARA1,5 e ARA3,0). Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para os ácidos gordos 18:1n-9 (OA), 22:5n-3 (DPA) e 22:6n-3 (DHA).

A razão DHA/EPA mostrou ser mais elevada para o tratamento ARA3,0 e a razão EPA/ARA diminuiu com o aumento de ARA nas dietas, não sendo significativa a diferença entre ARA1,5 e ARA3,0. O aumento da inclusão de ARA até ao tratamento ARA1,5 provocou um decréscimo dos valores da razão DHA/ARA.

Tabela 5: Total de FAME (mg g⁻¹ de amostra) e perfil em ácidos gordos (% AGT) nos lípidos totais das larvas de dourada, 34 DAE, alimentadas com as microdietas experimentais

Tratamento	ARA 0,4	ARA 0,8	ARA 1,5	ARA 3,0	p
Total FAME (mg g⁻¹)	71,09 ± 1,316	70,31 ± 12,84	71,08 ± 2,06	65,34 ± 1,98	0,580
Ácidos gordos					
14:0	0,87 ± 0,02	0,88 ± 0,11	0,84 ± 0,01	0,83 ± 0,14	0,942
15:0	0,10 ± 0,14	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,12 ± 0,10	0,430
16:0	17,75 ± 0,93	17,02 ± 1,39	17,38 ± 0,45	17,40 ± 0,44	0,833
17:0	0,48 ± 0,08	0,61 ± 0,17	0,50 ± 0,06	0,52 ± 0,07	0,564
18:0	10,06 ± 0,32	9,62 ± 0,42	10,12 ± 0,18	10,41 ± 0,54	0,276
20:0	0,40 ± 0,06 ^b	0,27 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,02 ^{ab}	0,36 ± 0,01 ^{ab}	0,040
TOTAL SFA	30,08 ± 0,96	29,31 ± 1,49	29,94 ± 0,54	30,22 ± 0,87	0,754
16:1*	1,04 ± 0,31	1,51 ± 0,63	1,08 ± 0,33	1,11 ± 0,42	0,665
18:1n-7	1,93 ± 0,24	2,60 ± 0,75	1,92 ± 0,31	1,90 ± 0,39	0,343
18:1n-9	13,33 ± 0,07	13,41 ± 0,35	13,18 ± 0,08	12,67 ± 0,32	0,043
20:1n-9	0,78 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,79 ± 0,01	0,82 ± 0,02	0,238
TOTAL MUFA	17,08 ± 0,46	18,31 ± 1,76	16,98 ± 0,70	16,50 ± 1,13	0,394
18:2n-6	7,54 ± 0,03 ^d	6,27 ± 0,33 ^c	4,57 ± 0,20 ^b	3,39 ± 0,24 ^a	0,001
18:3n-6	0,14 ± 0,19	0,32 ± 0,08	0,34 ± 0,04	0,42 ± 0,02	0,066
20:2n-6	nd	nd	0,11 ± 0,10	0,31 ± 0,20	0,100
20:4n-6	4,25 ± 0,19 ^a	5,50 ± 0,82 ^a	8,70 ± 0,68 ^b	11,64 ± 1,23 ^c	0,001
22:4n-6	0,51 ± 0,06	0,80 ± 0,16	0,64 ± 0,19	0,43 ± 0,06	0,094
TOTAL n-6 PUFA	12,43 ± 0,09 ^a	12,88 ± 1,23 ^a	14,36 ± 0,64 ^{ab}	16,20 ± 0,72 ^b	0,005
16:2n-4	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,00	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,088
16:3n-3	nd	nd	0,11 ± 0,1 ^a	0,26 ± 0,09 ^b	0,026
16:4n-3	0,46 ± 0,02	0,42 ± 0,07	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,366
18:3n-3	1,27 ± 0,04 ^c	1,12 ± 0,02 ^{bc}	1,02 ± 0,06 ^b	0,19 ± 0,08 ^a	0,001
18:4n-3	0,29 ± 0,12 ^a	0,26 ± 0,03 ^a	0,39 ± 0,04 ^{ab}	0,51 ± 0,06 ^b	0,020
20:3n-3	0,09 ± 0,12	0,10 ± 0,14	0,10 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,547
20:4n-3	0,44 ± 0,05	0,41 ± 0,10	0,45 ± 0,06	0,39 ± 0,05	0,734
20:5n-3	5,71 ± 0,06 ^b	5,20 ± 0,23 ^b	4,17 ± 0,08 ^a	3,42 ± 0,44 ^a	0,001
22:5n-3	0,87 ± 0,07	0,94 ± 0,22	0,83 ± 0,06	0,73 ± 0,11	0,319
22:6n-3	28,57 ± 1,01	27,12 ± 0,94	27,17 ± 0,37	26,77 ± 0,87	0,181
TOTAL n-3 PUFA	37,69 ± 0,77 ^c	35,56 ± 0,49 ^b	34,68 ± 0,41 ^b	32,68 ± 0,26 ^a	0,001
n-3/n-6	3,03 ± 0,09 ^c	2,77 ± 0,23 ^{bc}	2,42 ± 0,08 ^b	2,02 ± 0,08 ^a	0,001
TOTAL PUFA	50,44 ± 0,71	48,72 ± 1,71	49,37 ± 1,01	49,17 ± 1,00	0,509
HUFA n-3	35,14 ± 0,88 ^c	33,26 ± 0,50 ^b	32,17 ± 0,38 ^{ab}	30,92 ± 0,33 ^a	0,001
DHA/EPA	5,01 ± 0,07 ^a	5,23 ± 0,18 ^a	6,51 ± 0,04 ^{ab}	7,94 ± 0,07 ^b	0,014
EPA/ARA	1,35 ± 0,23 ^c	0,96 ± 0,41 ^b	0,48 ± 0,07 ^a	0,30 ± 1,21 ^a	0,001
DHA/ARA	6,73 ± 0,06 ^c	4,98 ± 0,57 ^b	3,14 ± 0,22 ^a	2,31 ± 0,18 ^a	0,001

Valores representam a média ± desvio padrão; * Soma dos isómeros 16:1n-7 e 16:1n-9.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p < 0,05);

FAME, éster metílico de ácido gordo; AGT, ácidos gordos totais; SFA, ácidos gordos saturados; MUFA, ácidos gordos monoinsaturados; PUFA, ácidos gordos polinsaturados; HUFA, ácidos gordos altamente insaturados; nd, não foi detectado.

Com base na correlação de Pearson, foi testado o grau de relação entre a concentração de ácidos gordos nas dietas e a concentração de ácidos gordos nos lípidos totais das larvas. Os ácidos gordos foram seleccionados com base no nível em que se encontravam nas larvas e na sua importância relativamente à constituição usual dos fosfolípidos, com excepção do 22:5n-3. A Tabela 6 mostra os valores obtidos para o coeficiente de correlação (r) e para o declive da recta de regressão. Verificou-se que para os ácidos gordos 18:1n-9 (OA), 18:2n-6 (LA), 20:4n-6 (ARA), 18:3n-3 (ALA) e 20:5n-3 (EPA) existiu uma correlação linear forte e positiva para $p < 0,05$. Estes resultados mostraram que a concentração destes ácidos gordos nas microdietas estava linearmente relacionada com a sua concentração nas larvas. No entanto, nos casos onde existiu correlação, o valor do declive das rectas de regressão é diferente para cada ácido gordo, mostrando que apesar da correlação ser forte, a variação do ácido gordo nas dietas reflecte-se com diferentes intensidades nas larvas.

Tabela 6: Valores de coeficiente de correlação (r) e declive das regressões lineares entre conteúdo em ácidos gordos nas microdietas e nas larvas com 34 DAE (% AGT); Diferença (Δ) entre o valor de ácidos gordos nas larvas e nas dietas (em % AGT), para cada um dos quatro tratamentos

Ácido gordo	r	declive	Δ ARA 0,4	Δ ARA 0,8	Δ ARA 1,5	Δ ARA 3,0
16:0	0,2412	0,13	5,77	5,33	5,35	4,44
18:0	0,7593	0,39	6,57	5,94	5,93	5,50
18:1 n-9	0,9775	0,52	-8,41	-8,16	-8,06	-7,68
18:2 n-6	0,9981	0,39	-10,77	-9,48	-6,36	-4,60
20:4 n-6	0,9884	0,53	2,23	1,21	0,16	-4,48
18:3 n-3	0,9984	0,16	-6,27	-5,36	-5,22	-0,52
20:5 n-3	0,9965	2,04	-5,26	-5,49	-5,97	-6,45
22:5 n-3	0,6994	9,75	0,53	0,59	0,49	0,39
22:6 n-3	0,0412	0,10	13,95	12,00	12,55	12,41

Na Tabela 6 está também representada a diferença (Δ) entre a concentração do ácido gordo nas larvas (%AGT) e a concentração do mesmo ácido gordo nas microdietas experimentais (%AGT; valores não apresentados sob a forma de tabela). Valores negativos indicam que nas larvas a concentração do ácido gordo é mais baixa que aquela presente nas

microdietas, enquanto que valores positivos indicam uma maior concentração do ácido gordo nos tecidos das larvas do que nas microdietas. Por outro lado, os valores resultantes destas diferenças sugerem o tipo de utilização feita por parte das larvas, de cada um dos ácidos gordos, durante o período de crescimento. Assim, valores negativos indicam que ocorreu metabolismo preferencial dos ácidos gordos e valores positivos mostram que ocorreu deposição (acumulação) preferencial nos tecidos das larvas.

Pela leitura da Tabela 6 verifica-se que para os dois ácidos gordos saturados, 16:0 (PA) e o esteárico (SA, 18:0), ocorreu uma deposição preferencial nos tecidos das larvas. No caso dos ácidos gordos 18:1n-9 (OA), 18:2n-6 (LA), 18:3n-3 (ALA) e 20:5n-3 (EPA) ocorreu um metabolismo preferencial, independentemente do nível de inclusão de ARA nas dietas. Foi possível constatar que os níveis de LA, ALA e EPA, presentes tanto nas larvas como nas dietas, foram inversamente proporcionais ao aumento de ARA nas microdietas, não se verificando o mesmo para o OA. Não obstante, é de referir que tanto para o EPA como para o OA foram encontradas poucas ou nenhuma diferença significativa no perfil das dietas, como referido anteriormente. Assim, quaisquer diferenças nos níveis destes ácidos gordos nas larvas são devidas a outros factores que não as dietas.

Os níveis de 22:6n-3 (DHA) apresentaram uma fraca correlação entre larvas e dietas ($r=0,041$), e mesmo alterando a concentração de ARA o DHA conservou o seu valor percentual nos tecidos das larvas, sendo preferencialmente depositado (Tabela 6).

Uma análise mais detalhada sobre o ácido araquidónico (ARA) pode ser feita através da Figura 9, onde está representada graficamente a relação entre concentração de ARA nas microdietas e nas larvas. Uma linha de igualdade foi adicionada ao gráfico, permitindo inferir sobre o destino metabólico do ácido gordo (valores abaixo e acima da linha significam metabolismo ou deposição preferencial, respectivamente).

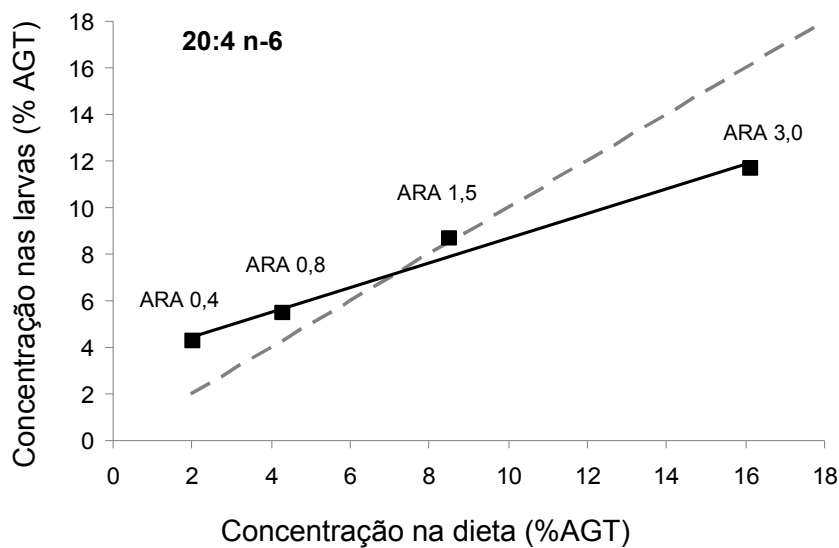


Figura 9: Relação entre conteúdo de ácido araquidónico (20:4n-6) nas microdietas e nas larvas de dourada (% AGT) alimentadas com as microdietas experimentais. A tracejado está representada uma linha de igualdade. Valores médios.

Foi encontrada uma forte correlação entre os níveis de ARA nas dietas e nas larvas ($r=0,988$). Um aumento progressivo de ARA nas microdietas conduziu a um aumento da concentração nos tecidos das larvas. Nos tratamentos ARA0,4 e ARA0,8 observou-se uma deposição preferencial de ARA nos tecidos das larvas enquanto que no tratamento ARA3,0 as larvas passaram a metabolizar o ácido gordo. Para o tratamento ARA1,5 existiu uma deposição muito reduzida como se pode verificar, tanto pelo valor da diferença (Δ) na Tabela 6, como pela posição do ponto correspondente a esta dieta muito próximo da linha de igualdade (Figura 9).

As razões EPA/ARA e DHA/ARA estavam fortemente relacionadas entre as dietas e as larvas, com valores de $r = 0,96$ e $0,98$, respectivamente (Figura 10). Verificou-se que a razão EPA/ARA foi sempre mais baixa para as larvas do que para as dietas experimentais, o que reflecte o metabolismo preferencial de EPA nos tecidos das larvas. Por outro lado, foi possível verificar, mais uma vez, que a inclusão de ARA nas dietas provocou um decréscimo no valor desta razão. Quanto à razão DHA/ARA esta foi mais elevada nas larvas do que nas dietas, embora no tratamento ARA0,4 esta razão tenha sido bastante semelhante entre as larvas e as dietas (Figura 10).

Novamente se verificou a elevada incorporação de DHA pelas larvas, o que reforça a sua importância biológica. Uma vez que o ARA (denominador) aumentou e o DHA (numerador) foi praticamente constante, esta razão diminuiu do tratamento ARA0,4 até ao ARA3,0.

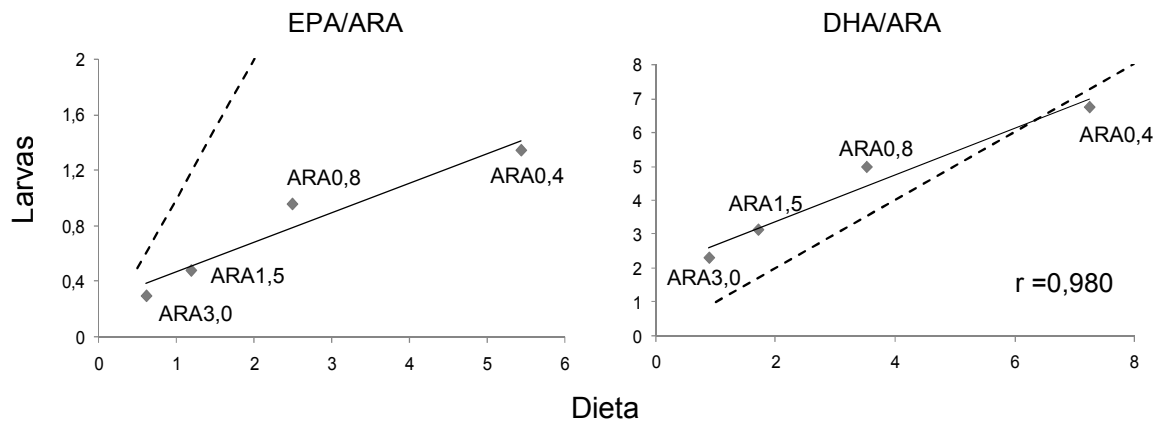


Figura 10: Relação entre os valores de EPA/ARA e DHA/ARA das dietas e das larvas; Valores médios.

Testou-se o grau de correlação entre os níveis de ARA e EPA presentes nas larvas de dourada com 34 DAE, verificando-se que existe uma correlação negativa muito forte ($r=-0,9967$) entre os níveis dos ácidos gordos (Figura 11). A concentração de EPA decresceu com o aumento da concentração de ARA nos lípidos totais das larvas, que reflectiu a inclusão gradual de ARA nas dietas experimentais.

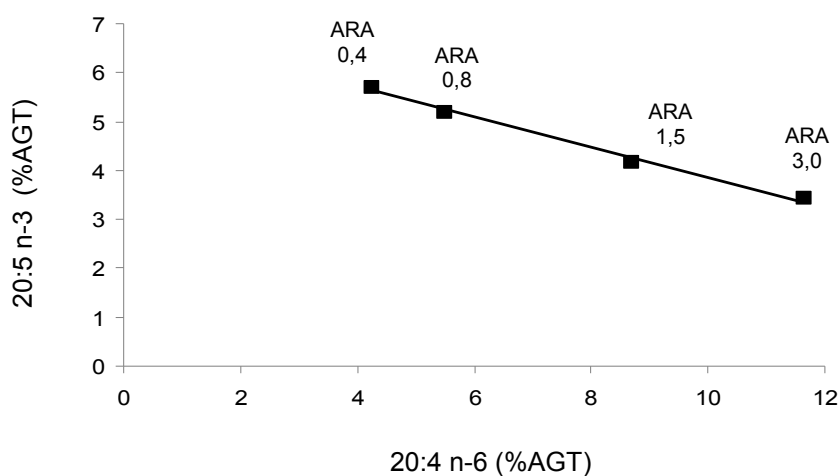


Figura 11: Relação entre as concentrações de 20:4n-6 (ARA) e 20:5n-3 (EPA) nas larvas de dourada, alimentadas com as microdietas experimentais; Valores médios.

4. DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE LARVAR

Neste trabalho experimental, a performance das larvas de dourada foi avaliada com base no peso seco, biomassa, taxa de crescimento relativo e sobrevivência. Apesar de nenhum dos parâmetros estudados mostrar diferenças significativas entre os tratamentos de microdietas no final da experiência, foi possível detectar alterações dos valores ao longo do cultivo larvar.

Os pesos secos das larvas aos 16 DAE (66 a 84 μg) foram superiores aos pesos obtidos por Robin & Peron (2004) para larvas com 17 DAE alimentadas, exclusivamente, com microdietas (49 a 54 μg). Estes resultados evidenciam a vantagem em utilizar um regime de co-alimentação com alimento vivo no cultivo larvar das douradas (Fernandez-Diaz & Yúfera, 1997). Quando as larvas são alimentadas somente com rotíferos, o aumento de peso é mais pronunciado, podendo atingir entre 80 a 97 μg após 15 dias (Rodriguez *et al.*, 1998; Yúfera *et al.*, 2005). Os resultados de peso seco das larvas com 34 DAE (159 a 196 μg) estão de acordo com Bessonart *et al.* (1999) para larvas com 31 DAE (110 a 124 μg) e larvas com 37 DAE (302 a 318 μg) cultivadas segundo um plano alimentar semelhante ao do presente trabalho.

As microdietas produzidas através do método de microencapsulação por gelificação interna mostraram ser apropriadas como primeiro alimento para dourada e linguado, apresentando uma boa ingestão e digestibilidade pelas larvas (Yúfera *et al.*, 2005). Estes autores registaram um peso seco médio de 87 μg para larvas de dourada com 15 DAE em regime de co-alimentação com rotíferos, resultados que se assemelham aos obtidos neste trabalho.

Os valores da TCR entre os dias 16 e 34 após a eclosão foram menores em comparação com a TCR entre 3 a 16 DAE. Provavelmente, com a passagem para uma fase de adaptação ao alimento inerte, onde se forneceram menos rotíferos, as larvas reduziram a sua taxa de ingestão de alimento, o que viria a causar um crescimento menos acentuado (Koven, 2002). As taxas de sobrevivência (método 1 e método 2) obtidas para este cultivo larvar foram

bastante reduzidas, variando o valor real entre 2,5% e 5,8%. Robin & Vincent (2003) ao estudarem o efeito de um gradiente de Algamac® nas dietas para dourada verificaram que a dieta com concentração intermédia conduziu a uma fraca sobrevivência das larvas (9%) em relação à sobrevivência das outras dietas (14 e 25%) com níveis inferiores e superiores de Algamac®. Os autores concluíram que a fraca sobrevivência pode ter sido devida a um factor não alimentar. Para o presente trabalho pode ser colocada uma hipótese semelhante, de que a sobrevivência não foi afectada pelo tratamento com ARA. O alimento vivo utilizado na alimentação das larvas (rotíferos) é considerado como potencial transmissor de doenças (Skjeremo & Vadstein, 1999), podendo ter despoletado um incidente patológico nos tanques de cultivo. Do mesmo modo, o excesso de dieta não consumida e acumulada nos tanques, pode ter proporcionado um maior desenvolvimento microbiano. No período próximo do final da experiência observou-se um desenvolvimento notório de bactérias filamentosas que cobriam o fundo dos tanques (cone), tal como ocorreu para Robin & Peron (2004). Estes autores reportaram um decréscimo do nível de oxigénio nos tanques e o colmatar dos filtros, contudo no presente estudo, não se registaram estas situações tendo sido apenas observado um aumento na mortalidade das larvas durante a última semana de cultivo. Mesmo com a intensificação da limpeza dos tanques, deve-se ter em conta um cuidado especial em futuros delineamentos experimentais.

Outras hipóteses podem ser igualmente colocadas de modo a justificar os resultados obtidos nesta experiência. A alimentação exógena condiciona toda a performance dos peixes, principalmente nos estados larvares. Talvez a alimentação das larvas tenha sido limitada, por uma questão intrínseca às próprias larvas ou por uma restrição de alimento disponível na coluna de água. Outros estudos com larvas de dourada referem a utilização de uma dose de microdieta entre 1,5 a 2g 100L⁻¹ dia⁻¹, para cultivos a uma densidade de 30 larvas L⁻¹ (Bessonart *et al.*, 1999) ou de 5,7g 100L⁻¹ dia⁻¹, para densidades de 165 larvas L⁻¹ (Robin & Peron, 2004). Izquierdo *et al.* (2008) forneceram uma quantidade relativamente alta de dieta, cerca de 2,6g 100L⁻¹ dia⁻¹ para uma densidade de 10 larvas L⁻¹, demonstrando que estas doses não comprometem a sobrevivência das larvas. No presente estudo, o máximo de microdieta administrada foi de 1g 100L⁻¹ dia⁻¹, para uma densidade de 100 larvas L⁻¹, o

que comparativamente aos estudos referidos é uma dose reduzida. No entanto, por observações directas foi possível detectar restos de alimento inerte no fundo dos tanques ao longo das 24h de distribuição, podendo ser um indício de que a dose diária utilizada seria suficiente.

Se compararmos os valores do crescimento e sobrevivência, com base nas Figuras 5 e 7, verificamos que existe uma tendência inversa em que os melhores resultados obtidos para um parâmetro correspondiam aos piores valores para o outro. Como tal, nos tratamentos ARA0,4 e ARA3,0 registou-se um maior crescimento e uma menor sobrevivência. Nestas condições é provável que tenha ocorrido um fenómeno de morte selectiva. Caso esta situação tenha sucedido, o resultado da sobrevivência é explicado pela morte de um número elevado de larvas com tamanho reduzido, talvez numa fase mais inicial da experiência. Deste modo, as larvas sobreviventes usufruíram de maior disponibilidade de alimento, o que pode ter proporcionado um crescimento mais acentuado. Para os tratamentos ARA0,8 e ARA1,5 a situação seria a inversa, com menor mortalidade, as larvas sobreviventes teriam menor quantidade de alimento disponível para o crescimento. No entanto, os resultados indicam que não existe nenhuma relação significativa entre as duas variáveis, o que faz com que esta hipótese seja menos provável.

As microdietas experimentais mostraram ser adequadas para o cumprimento dos requisitos nutricionais das larvas de douradas, especialmente para os ácidos gordos essenciais. Os requisitos em HUFA foram determinados para as larvas de dourada para uma alimentação com rotíferos enriquecidos (Rodriguez *et al.*, 1998) ou com microdietas (Salhi *et al.*, 1999). Segundo estes, um valor de 1,5% é o necessário para cobrir as necessidades desta espécie logo, as microdietas utilizadas neste estudo foram capazes de cumprir com este requisito, tendo mais de 4% de HUFA n-3.

A incorporação mínima de DHA nas dietas para larvas de dourada foi recomendada em 0,8% (m.s.) (Rodriguez *et al.*, 1998), sendo que até 5% se observaram melhorias em termos de sobrevivência e crescimento (Liu *et al.*, 2002). As microdietas utilizadas apresentaram um nível de 3% de DHA, o que contribuiu para um bom desenvolvimento das larvas. Os níveis de EPA estiveram acima do mínimo de 0,8% recomendado por Salhi *et al.* (1999), em todas as microdietas experimentais. Em relação ao ARA, foi aconselhado como

nível óptimo, uma inclusão até 1% (Bessonart *et al.* 1999; Izquierdo, 2005) mas no presente trabalho procurou-se testar concentrações superiores, sendo que duas das microdietas utilizadas apresentavam níveis superiores a 1%.

Para uma avaliação mais detalhada da performance das larvas de dourada, dever-se-ia ter realizado um maior número de amostragens ao longo da experiência. Contudo, o número de larvas existente em cada tanque era limitado, o que condicionava o número de amostragens a realizar. Assim sendo, as fases mais relevantes seriam na abertura da boca (4DAE), entre o dia 16, altura onde se acentuou a transição para alimento inerte e o final da experiência.

Em futuros trabalhos semelhantes a este, seria desejável a utilização de tanques com maior capacidade, a fim de aumentar o número de larvas cultivadas sem alterar as densidades utilizadas, na perspectiva de minimizar as limitações em termos quantitativos durante as amostragens.

4.2. REQUISITOS DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Vários estudos referem a importância que o ácido araquidónico (ARA) desempenha na fisiologia dos peixes marinhos, desde o período larvar até à fase adulta, evidenciando a sua acção como promotor de crescimento, metamorfose e sobrevivência assim como regulador do sistema imunológico e de resposta a stress (Sargent *et al.*, 1999b; Bell & Sargent, 2003; Fountoulaki *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2003; Izquierdo, 2005).

Os resultados deste trabalho demonstraram que o aumento da concentração de ARA nas dietas, de 0,4% a 3,0% (m.s.), não provocou diferenças no crescimento das larvas durante o período de cultivo. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores realizados com larvas (Koven *et al.*, 2001; Koven *et al.*, 2003; Robin & Peron, 2004) e juvenis de dourada (Fountoulaki *et al.*, 2003; Van Anholt *et al.*, 2004), bem como em larvas de outras espécies como carta-de-verão, *Paralichthys dentatus* (Willey *et al.*, 2003); bacalhau, *Gadus morhua* (Bransden *et al.*, 2005); linguado senegalês, *Solea senegalensis* (Villalta *et al.*, 2008) e pregado, *Scophthalmus maximus*

(Estévez *et al.*, 1999). Por outro lado, em ensaios realizados com juvenis de pregado, Castell *et al.* (1994) obtiveram melhor crescimento para a dieta que tinha ARA como único HUFA, em comparação com outras dietas que continham uma mistura de DHA e ARA. Também Bessonart *et al.* (1999) demonstraram que um incremento até 1% (m.s) de ARA nas microdietas promove o crescimento de larvas de dourada, apenas quando a alimentação com dieta se mantém por três semanas (neste caso até aos 37 DAE). Fica evidente que, quando se realizam trabalhos com larvas de peixes, a duração da experiência é um ponto crucial para a obtenção de resultados. Logo, o período experimental neste trabalho foi, provavelmente, insuficiente para se compreenderem as possíveis alterações no crescimento das larvas provocadas pelas dietas, particularmente pelo nível de ARA, devendo ter sido prolongada a fase de alimentação exclusiva com dieta.

Actualmente, a razão pela qual o aumento de ARA nas dietas pode proporcionar um aumento no crescimento não se encontra ainda bem definida (Bell & Sargent, 2003). Estudos realizados por Rodemann *et al.* (1982) em mamíferos revelaram que existe uma inibição da síntese de fibras musculares provocada pela acção de ARA e das prostaglandinas PGH e PGE₂, ao passo que a síntese proteica é estimulada pela prostaglandina PGF_{2α}, podendo desta forma existir um mecanismo de modelação do crescimento com base na interacção entre estas moléculas.

A sobrevivência parece ser um dos parâmetros mais afectados com o incremento dos níveis alimentares de ARA (Bell & Sargent, 2003). O facto de se terem utilizado dois métodos para o cálculo da sobrevivência permitiu não subestimar o valor real que se poderia obter, caso a amostragem realizada no dia 16 não tivesse ocorrido. No presente estudo, após um cultivo de 34 dias, a sobrevivência das larvas variou entre 2,5% e 5,8%, não se registando diferenças significativas entre os tratamentos experimentais, embora haja uma tendência para os valores serem mais elevados no tratamento ARA0,8 e ARA1,5. Estes resultados não estão de acordo com outros estudos realizados em larvas de dourada, onde o aumento de ARA conduziu a uma melhor sobrevivência. Segundo Bessonart *et al.* (1999) a suplementação de ARA nas dietas até 1,8% (m.s.) proporcionou um aumento significativo na sobrevivência das larvas com 31 DAE. No estudo de Robin & Peron (2004), quando foram

fornecidas microdietas como primeiro alimento às larvas de dourada, a sobrevivência foi mais elevada para a dieta que continha 0,25% ARA (m.s.) do que para as dietas sem ARA ou com níveis residuais (0,02% m.s.). Portanto, é evidente a importância de ARA nas microdietas utilizadas como primeiro alimento. Também o alimento vivo, rotíferos e *Artemia* sp, enriquecido com níveis elevados de ARA é capaz de melhorar a sobrevivência após testes de tolerância a stress, em larvas de dourada (Koven *et al.*, 2001) e em larvas de carta-de-verão (Willey *et al.*, 2003).

A relação complexa entre níveis de ARA, sobrevivência das larvas e stress pode estar relacionada com o envolvimento de ARA na síntese de eicosanóides, como algumas prostaglandinas. Estes metabolitos são responsáveis por regular várias funções fisiológicas tais como respostas imunológicas, neurológicas, reprodutivas, vasculares e a factores de stress (Koven *et al.*, 2001, Toucher, 2003). Talvez a introdução de factores stressantes nesta experiência conduzisse a valores significativos para a sobrevivência das larvas. Como foi demonstrado anteriormente, um suplemento de ARA nas dietas permitiu aumentar a sobrevivência das larvas quando estas foram sujeitas a uma situação de stress agudo (Koven *et al.*, 2001). Paralelamente ao presente trabalho, foi realizado um teste de stress agudo (agitação) às larvas dos quatro tratamentos, o qual não conduziu a diferenças significativas na sobrevivência. Provavelmente, o teste efectuado não foi selectivo para as condições testadas, talvez devido à dificuldade inerente a estes tipos de testes em recriar condições padronizadas.

No entanto, Koven *et al.* (2003) demonstraram que a resistência proporcionada pelo aumento de ARA nas dietas depende da natureza do stress e da sua duração. Para estes autores, uma alimentação suplementada com ARA proporciona melhor sobrevivência em condições de stress agudo (manuseamento) mas em condições de stress crónico (variação de salinidade) pode causar nas larvas elevada mortalidade.

Embora não seja evidente no presente estudo, a generalidade da bibliografia sugere que um aumento do gradiente de ARA na alimentação pode influenciar o desenvolvimento e sobrevivência das larvas de várias espécies de peixes marinhos. Todavia, os estudos realizados em larvas de dourada, remetem a utilização de ARA nas dietas e alimento vivo a uma gama pouco

ampla, que raramente excedeu o nível de 1%. Desta forma, tornou-se difícil comparar, ou mesmo prever neste estudo os resultados que uma concentração de ARA até 3% poderia provocar no crescimento e sobrevivência das larvas. É conhecido um efeito negativo provocado por níveis elevados de ARA na alimentação. Vários autores reportaram que larvas de peixes planos como, pregado, limanda, linguado legítimo e senegalês desenvolveram uma pigmentação anormal para dietas com concentrações elevadas de ARA (Estévez *et al.*, 1999; Copeman *et al.*, 2002; Bell & Sargent, 2003; Lund *et al.*, 2008; Villalta *et al.*, 2008). Sargent *et al.* (1999b) propuseram que este efeito seja devido a um stress bioquimicamente induzido pela produção excessiva de eicosanóides nas larvas de peixes planos.

Deste modo as larvas obtiveram, ao longo da experiência, um crescimento e sobrevivência semelhantes, independentemente do tipo de tratamento a que foram submetidas. O período durante o qual decorreu a alimentação com as microdietas pode ter sido insuficiente para se detectarem alterações na performance das larvas, induzidas pelo aumento gradual de ARA nas dietas. A sobrevivência é o parâmetro mais afectado pela acção de ARA, principalmente quando as larvas são submetidas a situações de stress agudo. Não obstante, os resultados estão dependentes da natureza e duração do factor stressante. Para este trabalho, a ausência de diferenças na sobrevivência pode dever-se à inexistência de factores stressantes durante o período de cultivo. Foi possível verificar que as larvas de dourada toleraram uma ampla gama de concentrações de ARA nas microdietas.

4.3. INTERACÇÕES ENTRE ÁCIDOS GORDOS ESSENCIAIS

Grande parte dos estudos sobre nutrição de lípidos enfatiza os requisitos de HUFA n-3, atribuindo menor importância à função do ARA como ácido gordo essencial nas dietas (Sargent *et al.*, 1999b). Por outro lado, é necessário considerar as interações entre os três ácidos gordos essenciais mais importantes: DHA, EPA e ARA. Não só os valores absolutos destes

ácidos gordos devem ser tidos em conta como também as razões em que se encontram nas dietas, uma vez que ambos os factores irão afectar o grau de incorporação nos tecidos (Izquierdo, 2005).

A composição e variações quantitativas dos ácidos gordos presentes nas microdietas experimentais foram reflectidas no perfil de ácidos gordos das larvas, reforçando a importância da incorporação de AGE nas dietas.

A razão DHA/EPA foi 1,4 em todas as microdietas experimentais, estando próxima do valor óptimo de 1,2 determinado para larvas de dourada (Rodríguez *et al.*, 1997). Deve-se evitar que esta razão seja inferior ao valor recomendado, pois um défice ou um incorrecto balanceamento entre DHA e EPA impedem o bom desenvolvimento das larvas, causando interpretações erradas do tratamento experimental aplicado (Koven *et al.*, 2001), que neste trabalho seria o efeito de suplementação de ARA. Por outro lado, sabe-se que os requisitos de ARA nas dietas são mínimos, provavelmente devido à natureza do seu papel fisiológico, o que está em contraste com os de níveis elevados de DHA e EPA necessários para as larvas. É possível que, ao variar as concentrações de ARA, que são sempre reduzidas, este efeito seja mascarado pelo valor de DHA e EPA presente nas dietas (Bessonart *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001).

Em relação às razões EPA/ARA e DHA/ARA, as duas variaram entre os tratamentos, diminuindo o seu valor com o aumento da concentração de ARA nas dietas. Esta diminuição ocorreu tanto nas dietas como nas larvas, reflectindo diferentes graus de incorporação dos ácidos gordos nos tecidos (Figura 10). Mas, os resultados mostraram que as variações das razões EPA/ARA e DHA/ARA não causaram diferenças na performance das larvas de dourada, o que leva a crer que as larvas toleraram bem o gradiente de ARA a que foram sujeitas. Contudo, outros autores obtiveram alterações significativas no desenvolvimento das larvas de dourada quando as razões entre os principais HUFA se alteraram nas dietas. É o caso de Bessonart *et al.* (1999) que obtiveram maior crescimento quando nas dietas a razão EPA/ARA decresceu de 8,0 para 0,8 e o valor de DHA/EPA se manteve constante a 1,8.

O incremento dos níveis de HUFA n-3 e n-6 nas dietas deve ter em consideração os valores de ácidos gordos saturados e monoinsaturados, uma vez que estes representam uma fonte de energia importante nas dietas

(Sargent *et al.*, 1999b; 2002). As microdietas experimentais de cada tratamento não apresentaram variações entre os níveis totais de MUFA, PUFA e HUFA n-3, tendo apenas uma mínima variação de 1,13% para os SFA. Podemos considerar que, o perfil em ácidos gordos das microdietas não seria limitante em termos energéticos bem como para os requisitos de ácidos gordos essenciais.

A determinação do destino metabólico preferencial de cada ácido gordo nas larvas de dourada revelou ser uma boa ferramenta na compreensão do papel biológico que determinados ácidos gordos representam durante a fase larvar. Neste trabalho, foi possível verificar se um ácido gordo foi preferencialmente depositado nos tecidos ou metabolizado pela larva, partindo do princípio que os peixes são capazes de digerir e assimilar eficazmente os lípidos, tal como se verifica para os mamíferos (Tocher, 2003). Contudo, o tipo de metabolismo envolvido, β -oxidação (catabolismo) ou conversão em outro ácido gordo (anabolismo), não foi determinado visto não ser um dos objectivos desta experiência. As correlações obtidas neste âmbito (Tabela 6) apresentam uma componente prática de grande utilidade, no sentido de permitirem realizar previsões caso o perfil de ácidos gordos das dietas se modifique (Bell *et al.*, 2001).

O DHA foi, preferencialmente, depositado nos tecidos das larvas e a sua incorporação não foi afectada pela variação de ARA nas dietas. Estes resultados evidenciam a importância biológica do DHA como ácido gordo essencial, na constituição de tecidos neurológicos especialmente das membranas celulares (Sargent *et al.*, 1999a; 2002; Tocher, 2003). Por outro lado, é conhecida a fraca afinidade do DHA como substracto para a β -oxidação mitocondrial (Bell *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2002).

O aumento dos níveis de ARA nas dietas, de 0,8% a 3,0% (m.s.) provocou um aumento nos níveis de ARA presentes nos lípidos totais das larvas de dourada, estando estes resultados em conformidade com os trabalhos de vários autores, realizados em larvas de dourada e de outras espécies (Bessonart *et al.*, 1999; Estévez *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001; Bransden *et al.*, 2005). Este ácido gordo mostrou ser depositado selectivamente nos tecidos quando em níveis reduzidos na dieta, passando a ser menos acumulado com o aumento de ARA até 1,5% (m.s.). Estes

resultados de deposição selectiva estão em conformidade com estudos anteriores (Fountoulaki *et al.*, 2003; Montero *et al.*, 2003; Robin & Vincent, 2003; Ganga *et al.*, 2005), denotando a importância do ARA para uma correcta funcionalidade celular e, possivelmente, para a manutenção da integridade membranar. Outro estudo mostrou que numa situação de ausência de ARA e HUFA n-3 e n-6 nas dietas, as larvas de dourada continuaram a reter ARA nos seus tecidos (Robin & Peron, 2004), o que reforça a sua importância biológica.

Por outro lado, as larvas que receberam o tratamento ARA3,0 mostraram um metabolismo preferencial de ARA, o que pode ser um indício de que as larvas teriam alcançado os níveis máximos de incorporação deste ácido gordo, sob as condições testadas. Nos estudos com larvas de dourada, anteriormente mencionados, foram utilizadas gamas mais reduzidas de ARA nas dietas, para as quais se verificou sempre a ocorrência de deposição preferencial deste ácido gordo nos tecidos das larvas. Assim tornou-se difícil proceder a uma comparação em termos de metabolismo de ARA, contudo, os resultados obtidos (Figura 9) permitem prever que concentrações superiores a 3% nas dietas conduzem a um metabolismo preferencial nas larvas de dourada.

Os níveis de EPA nas microdietas foram semelhantes entre si, mesmo com uma ligeira variação de cerca de 1% no tratamento ARA0,4. Contudo, a sua incorporação nos tecidos das larvas diminuiu significativamente a partir do tratamento ARA0,8. A análise da correlação negativa entre EPA e ARA nas larvas (Figura 11) também reforçou a ideia de que as dietas não foram responsáveis pela menor incorporação de EPA nos tecidos. Uma explicação possível pode estar numa interacção competitiva entre EPA e ARA das dietas na composição dos tecidos das larvas. Foi descrito que, os níveis de ARA bem como de EPA, aumentam nos lípidos polares de larvas de dourada quando os níveis destes ácidos gordos também aumentam nas dietas (Bell *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 2002). Deste modo, é possível que tenha ocorrido uma competição entre EPA e ARA durante a esterificação dos fosfolípidos, particularmente do fosfatidilinositol, para o qual estes dois ácidos gordos são constituintes principais (Bell *et al.*, 1995). É reconhecida a fraca afinidade que as enzimas responsáveis por esta esterificação apresentam para cada ácido gordo em particular, podendo a composição lipídica dos tecidos estar

dependente em parte dos níveis de cada ácido gordo disponível (Sargent *et al.*, 1999b). Deste modo, um PUFA, como ARA, em excesso nas dietas pode resultar numa maior incorporação pelas larvas. Este tipo de competição provoca um desequilíbrio entre os níveis de HUFA n-3 e n-6, que pode alterar a integridade funcional das membranas celulares e ainda induzir diferenças na síntese de eicosanóides (Bell *et al.*, 1995; Sargent *et al.*, 1999a). Verificou-se ainda que o EPA foi, preferencialmente, metabolizado em todos os tratamentos experimentais, o que sugeriu a sua utilização como fonte de energia por β -oxidação (Bell *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 2002). Este metabolismo foi mais acentuado nas larvas do tratamento ARA3,0 o que indica que, na presença de elevadas concentrações de ARA, o EPA possa estar mais disponível para processos de oxidação/ metabolismo, visto que os níveis diminuíram nas larvas apesar da suplementação de EPA ser idêntica nas dietas. A relação entre EPA/ARA nas dietas e nas larvas apoiou a hipótese de metabolismo preferencial de EPA.

O papel que os ácidos gordos saturados e de cadeia C₁₈ desempenham foi também neste trabalho evidenciado. Os ácidos gordos saturados 16:0 (PA) e 18:0 (SA) foram, predominantemente, depositados pelas larvas, o que pode reflectir a sua importância como fonte de energia, uma vez que os peixes são capazes de os biosintetizar e desnaturar para produzir 16:1n-7 (ácido palmitoleico) e 18:1n-9 (OA) (Sargent *et al.*, 2002). Também estão presentes nas membranas celulares, estando o 16:0 geralmente localizado na posição *sn*-1 dos fosfolípidos, enquanto que o 18:0 é um menor constituinte membranar, presente em elevadas concentrações no fosfatidilinositol (Sargent *et al.*, 2002; Tocher, 2003). Os ácidos gordos insaturados de cadeia C₁₈, como o 18:1n-9 (OA) e 18:2n-6 (LA) são geralmente catabolizados nos peixes para fins energéticos, sendo fornecidos em grandes quantidades a peixes de aquacultura quando em fase de crescimento (Sargent *et al.*, 1999a; 2002). No presente trabalho, também se verificou um metabolismo preferencial destes ácidos gordos insaturados.

A optimização dos conteúdos em ácidos gordos essenciais nas dietas permanece em fase de estudo devido, principalmente, à dificuldade em se compreender todas as interacções bioquímicas e fisiológicas que se

estabelecem entre eles. As razões entre DHA, EPA e ARA assim como os níveis de cada um em termos absolutos devem ser considerados em simultâneo, de modo a proporcionarem o bom desenvolvimento das larvas de peixes marinhos. A importância biológica dos HUFA n-3 e n-6 foi evidenciada pela sua utilização preferencial, metabolismo ou deposição, por parte das larvas. No caso do ARA, mediante a sua concentração nas dietas, o grau de incorporação nos tecidos pode ser afectado. Outros ácidos gordos como os SFA e MUFA também devem ser tidos em conta por se mostrarem particularmente importantes em termos energéticos.

5. CONCLUSÕES

Os níveis de ARA testados neste trabalho não conduziram a diferenças significativas na sobrevivência ou no crescimento das larvas de dourada com 34 DAE, alimentadas com microdietas. Os resultados para o crescimento estão em conformidade com outros estudos realizados para larvas de dourada e de outras espécies marinhas, não se verificando o mesmo em relação à sobrevivência. O facto da variação em ARA nas dietas não ter provocado diferenças na sobrevivência das larvas pode dever-se à ausência de factores de stress durante o cultivo larvar, uma vez que as condições de cultivo se mantiveram sempre optimizadas. Outra justificação possível pode dever-se ao período de alimentação com microdieta ter sido insuficiente para se detectarem os efeitos de ARA na performance das larvas.

As microdietas experimentais mostraram ser adequadas quer em termos energéticos quer no cumprimento de requisitos nutricionais, particularmente de AGE. Foi possível verificar que a composição lipídica do tecido larvar, em especial os ácidos gordos, revelou o perfil lipídico das dietas. O ARA sofreu um aumento significativo entre os tratamentos, sendo preferencialmente depositado nos tecidos até uma concentração de 1,5% (m.s.). Valores superiores nas dietas (3%) conduziram ao metabolismo preferencial deste ácido gordo. Os níveis de DHA nas larvas mantiveram-se inalteráveis, ocorrendo sempre uma conservação preferencial independentemente do tratamento aplicado. O EPA sofreu um decréscimo dos níveis nos tecidos consoante ocorreu a subida de ARA. Uma vez que a concentração de EPA nas dietas sofreu poucas variações, o decréscimo dos níveis nos tecidos das larvas pode estar relacionado com uma competição entre ácidos gordos da mesma cadeia – ARA e EPA. Os resultados deste trabalho suportam ainda a ideia de que os ácidos gordos saturados e monoinsaturados têm um papel crucial na obtenção de energia metabólica.

O estudo dos requisitos dos principais AGE, o DHA, EPA e ARA deve ser feito em simultâneo, de modo a ponderar a interacção entre cada um e, paralelamente, devem ser tidos em consideração os níveis de SFA, MUFA, e

outros PUFA presentes nas dietas, para um correcto equilíbrio em termos de essenciais e energéticos.

Este trabalho contribuiu para evidenciar a capacidade de tolerância que as larvas de dourada apresentam relativamente a uma gama ampla de ARA nas dietas, porém não foram detectados efeitos benéficos na sua performance. O ARA tem vindo a demonstrar ser um requisito importante a ter em consideração na formulação de dietas destinadas à aquacultura intensiva, sendo de grande interesse continuar e aprofundar o estudo sobre o papel do ARA em mecanismos fisiológicos, como a resposta a condições de stress, de modo a otimizar o cultivo de larvas de peixes marinhos.

6. REFERÊNCIAS

Bell, J.G., Castell, J., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish. Physiol. Biochem.* 14, 139–151.

Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131,1535–1543.

Bell, J.G., Sargent, J.R., 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491–499.

Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M., Fernandez-Palacios, H., 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture* 179, 265–275.

Bransden, M.P., Butterfield, G.M., Walden, J., McEvoy, L.A and Bell, J.G. 2005. Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 250,328–340.

Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 128, 315–333.

Cohen, Z., Von Shak, A., Richmond, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.* 24, 328–332.

Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture* 180, 321–343.

FAO, Fisheries and Aquaculture Department, 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme: *Sparus aurata*. in: FAO, Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en

FAO, Fisheries and Aquaculture Department, 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture – 2008. FAO, Rome.

Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1997. Detecting growth in gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae fed microcapsules. *Aquaculture* 153, 93–102.

Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robana, 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.

Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 225, 309–323.

Ganga, R., Bell, J.G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J. and Izquierdo, M.S. 2005. Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 142, 410–418.

Guillard, R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L and Chanley, M.H. (Eds), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Publishing. NewYork. pp 29–60.

Horowitz, W. (Ed.). 2006. Official methods of analysis of AOAC International, eighteenth ed. AOAC International, Maryland.

INE & DGPA, 2008. Estatísticas da Pesca – 2007. Instituto Nacional das Pescas e Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura. Lisboa.

Izquierdo, M.S., 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cah. Opt. Médit.* 63, 91–102.

Izquierdo, M.S., Robaina, L., Juárez, E., Oliva, R., Hernández-Cruz, C.M., Afonso, J.M., 2008. Regulation of growth, fatty acid composition and delta 6 desaturase expression by dietary lipids in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 34, 117-127.

Koven, W., 2002. Gilt-head Sea Bream, *Sparus aurata*, in: Webster, C.D., Lim, C.E. (Eds.) Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing, UK, pp. 64–78.

Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107–122.

Koven, W.M., Van Anholt, R.D., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 307–320.

Liu, J., Caballero, M.J., Izquierdo, M., El-Sayed Ali, T., Hernández-Cruz, C.M., Valencia, A., Fernández-Palacios, H., 2002. Necessity of dietary lecithin and eicosapentaenoic acid for growth, survival, stress resistance and lipoprotein formation in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish. Sci.* 68, 1165–1172.

Lubzens, E., Zmora, O., 2003. Production and Nutritional Value of Rotifers, in: Strottrup, J.G., MacEvoy, L.A. (Eds.), Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Publishing, UK, pp. 17–52.

Lund, I., Steinfeldt, S.J., Banta, G., Hansen, B.W., 2008. The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 276, 143–153.

Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 270–353.

Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, volume 1. FAO, Rome.

Muller-Feuga, A., Robert, R., Cahu, C., Robin, J., Divanach, P., 2003. Uses of Microalgae in Aquaculture, in: Strottrup, J.G., MacEvoy, L.A. (Eds.), Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Publishing, UK, pp. 253–288.

Planas, M., Cunha, I., 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* 177, 171–190.

Pousão-Ferreira, P., Morais, S., Dores, E., Narciso, L., 1999. Eggs of gilthead seabream *Sparus aurata* L. as a potential enrichment product of *Brachionus* sp. in the larval rearing of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquacult. Res.* 30, 751–758.

Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103–115.

Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171, 293–308.

Robin, J.H., Peron, A., 2004. Consumption vs. deposition of essential fatty acids in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae fed semi-purified diets. *Aquaculture* 238, 283–294.

Robin, J.H., Vincent, B., 2003. Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225, 463–474.

Rodemann H.P, Waxman, L., Goldberg, A.L., 1982. The stimulation of protein degradation in muscle by Ca^{2+} is mediated by prostaglandin E_2 and does not require the calcium-activated protease. *J. Biol. Chem.* 257, 8716–8723.

Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Hernández, A.L., 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169, 9–23.

Rodríguez, C., Pérez, J.A., Díaz, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Lorenzo, A., 1997. Influence of the EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture* 150, 77–89.

Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., 1999. Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on gut and liver histological structure of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 179, 1–4.

Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999a. 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., 1999b. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.

Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, G., 2002. The Lipids, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press. USA, pp.181–257.

Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture* 200, 55–88.

Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343.

Southgate, P.C., 2003. Feeds and Feed Production, in: Lucas, J.S., Southgate, P.C. (Eds.), *Aquaculture – Farming Aquatic Animals and Plants*. Blackwell Publishing. UK ,pp. 172–197.

Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 2, 107–184.

Van Anholt, R.D., Spanings, F.A., Koven, W.M., Nixon, O., Bonga, S.E., 2004. Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *J. Exp. Biol.* 207, 3419–3430.

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.C., 2008. Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*), *Aquacult. Nutr.* 14, 120–128.

Willey, S., Bengtson, D.A., Harel, M., 2003. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquac. Int.* 11, 131–149.

Yúfera, M., Fernandez-Díaz, C., Pascual, E., 2005. Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture* 248, 253–262.

Zar, J. H., 1998. *Biostatistical analysis*, fourth ed. Prentice Hall. New Jersey

ANEXO I

Plano detalhado das renovações (renov.) diárias da água de cada um dos sistemas de recirculação utilizados durante a experiência.

Data	DAE	Recirculação		Água do sistema de recirculação geral	
		Interna	Externa	Renv./ dia	Litros / dia
		Renov./dia	Renov./ dia		
05-02-09	1	2	0,5	-	-
06-02-09	2	2	0,5	-	-
07-02-09	3	2	0,5	-	-
08-02-09	4	2	0,5	-	-
09-02-09	5	2	0,5	-	-
10-02-09	6	2	0,5	-	-
11-02-09	7	2	1	-	-
12-02-09	8	4	1	-	-
13-02-09	9	4	1	-	-
14-02-09	10	4	1	-	-
15-02-09	11	4	3	-	-
16-02-09	12	4	3	0,5	720 L/ dia
17-02-09	13	4	3	1	1440 L/ dia
18-02-09	14	4	5	2	2880 L/ dia
19-02-09	15	4	5	2	2880 L/ dia
20-02-09	16	4	8	2	2880 L/ dia
21-02-09	17	4	8	2	2880 L/ dia
22-02-09	18	4	8	2	2880 L/ dia
23-02-09	19	4	8	2	2880 L/ dia
24-02-09	20	4	8	2	2880 L/ dia
25-02-09	21	4	8	2	2880 L/ dia
26-02-09	22	4	8	2	2880 L/ dia
27-02-09	23	4	8	2	2880 L/ dia
28-02-09	24	4	8	2	2880 L/ dia
01-03-09	25	4	8	2	2880 L/ dia
02-03-09	26	4	8	2	2880 L/ dia
03-03-09	27	4	8	2	2880 L/ dia
04-03-09	28	4	8	2	2880 L/ dia
05-03-09	29	4	8	2	2880 L/ dia
06-03-09	30	4	8	2	2880 L/ dia
07-03-09	31	4	8	2	2880 L/ dia
08-03-09	32	4	8	2	2880 L/ dia
09-03-09	33	4	8	2	2880 L/ dia
10-03-09	34	4	8	2	2881 L/ dia

ANEXO II

Plano detalhado do regime alimentar das larvas de dourada, utilizado durante a experiência.

Data	DAE	Rotíferos (rots/ml)	Alga (L / tanque)		Ração (g / tanque)	
			<i>T. chuii</i>	<i>I. galbana</i>	< 200 μ	200 μ - 400 μ
05-02-09	1	-	0,25	0,25	-	-
06-02-09	2	-	0,25	0,25	-	-
07-02-09	3	-	0,25	0,25	-	-
08-02-09	4	7 (E)	0,5	0,5	-	-
09-02-09	5	9 (E)	0,5	0,5	-	-
10-02-09	6	11 (E)	0,5	0,5	-	-
11-02-09	7	3 (E)	0,5	0,5	-	-
12-02-09	8	4,5 (E)	0,5	0,5	-	-
13-02-09	9	8 (E)	0,5	0,5	0,5	-
14-02-09	10	8 (E)	0,5	0,5	0,17	-
15-02-09	11	9,5 (E)	0,5	0,5	0,17	-
16-02-09	12	5 (E)	0,5	0,5	0,17	-
17-02-09	13	3,5 (E) + 1,5 (NE)	0,5	0,5	0,17	-
18-02-09	14	9,5 (E)	0,5	0,5	0,17	-
19-02-09	15	0,8 (E)	1	1	0,5	-
20-02-09	16	1 (E)	1	1	0,5	-
21-02-09	17	0,5 (E) + 0,5 (NE)	1	1	0,8	-
22-02-09	18	0,1 (E) + 0,5 (NE)	1	1	0,4	0,5
23-02-09	19	0,5 (NE)	1	1	0,5	0,5
24-02-09	20	0,5 (NE)	1	1	0,5	0,5
25-02-09	21	0,5 (NE)	0,5	0,5	0,5	0,5
26-02-09	22	0,5 (NE)	0,5	0,5	0,5	0,5
27-02-09	23	0,5 (NE)	0,5	0,5	0,5	0,5
28-02-09	24	0,5 (NE)	0,5	0,5	0,5	0,5
01-03-09	25	0,5 (NE)	0,5	0,5	0,5	0,5
02-03-09	26	-	-	-	-	1
03-03-09	27	-	-	-	-	1
04-03-09	28	-	-	-	-	0,9
05-03-09	29	-	-	-	-	0,8
06-03-09	30	-	-	-	-	0,8
07-03-09	31	-	-	-	-	0,8
08-03-09	32	-	-	-	-	0,8
09-03-09	33	-	-	-	-	0,8
10-03-09	34	Amostragem				

Nota: As siglas utilizadas na coluna dos rotíferos significam enriquecidos (E) e não enriquecidos (NE).