



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais

**Efeito da substituição da farinha de peixe por
farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* no
crescimento e nos parâmetros metabólicos da
dourada (*Sparus aurata*)**

Dissertação de mestrado integrado de Engenharia Biológica

SARA ISABEL MENDES BATISTA

Faro

2008



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais



**Efeito da substituição da farinha de peixe por
farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* no
crescimento e nos parâmetros metabólicos da
dourada (*Sparus aurata*)**

Dissertação de mestrado integrado de Engenharia Biológica

Dissertação orientada por: Professora Doutora Deborah Power
Professor Doutor Juan Miguel Mancera

SARA ISABEL MENDES BATISTA

Faro

2008

Declaração

Na presente dissertação apresentam-se resultados para serem alvo de publicação em colaboração com: J. L. Varela, I. Rosa, I. Ruiz-Jarabo, L. Vargas-Chacoff, M.P. Martín del R o e J.M. Mancera.

A autora declara que interveio na concep o e execu o do trabalho experimental e na interpreta o dos resultados.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao **Professor Doutor Juan Miguel Mancera** por me ter aceitado no seu departamento, por me ter mostrado uma das vertentes da biotecnologia que me agradou bastante. Juanmi gracias por todo, por tu apoyo, disponibilidad y orientación Fuiste fantástico, al inicio te llamaba Dr Juan, después Profesor (como llamamos a los profesores en mi universidad), pero tu siempre me pusiste muy cómoda...hasta que empecé a llamarte Juanmi. Me gustó mucho trabajar contigo.

Agradeço a todo o pessoal do laboratório, **Nacho, Varela, Lucho, Yoli e Ivete** por me terem ajudado em tudo desde do alojamento, dúvidas no espanhol e no trabalho laboratorial. A todas as pessoas que conheci em Cádiz que de alguma forma influenciaram o meu trabalho. Obrigada a todos.

Um muito obrigado à **Professora Doutora Deborah Power** que me orientou na escolha do estágio e na elaboração da dissertação. Agradeço a sua disponibilidade, preocupação e simpatia.

Muito obrigado a todos os meus **Amigos**, que me aturaram bastante, nos momentos de alegria e nos de grande nervosismo. Obrigado pela força e preocupação!

A família, **Mãe e Pai** sem vocês não seria possível a realização desta tese, obrigado por me darem esta oportunidade de estudar e de realizar um dos meus objetivos. Obrigado à **mana Cláudia, mano Tiago, Nina, Didi, Manuel Tiago** (próximo elemento da família), à **Avó Paulina e Avô Raúl** por me ajudarem no que precisei.

Abreviaturas

aa	Aminoácido
Abs	Absorvância
ACoD	Acetil-CoA oxidase
ACS	Acetil-CoA sintetase
ADP	Adenosina difosfato
AGS	Aminoglicosidase
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus célsius
cm	centímetro
CoA	Coenzima A
Cód.	código
Cu ⁺ , Cu ²⁺	Ião Cobre
FCR	Índice de transformação do alimento
µg, mg, g, kg	Micrograma, miligrama, grama, quilograma
G	Rotação gravítica
GR	Gracilaria
H ⁺	Hidrogénio
HK	Hexocinase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HSI	Índice hepatossomático
KHCO ₃	Bicarbonato de potássio
µL, mL, dL, L	Micro litro, mililitro, decilitro, litro
mM, M	Milimolar, molar
Mg ²⁺	Ião Magnésio
min.	minuto
Mod.	Modelo

m/v	Massa por volume
MEHA	3-metil-N-etil-N-(β-hidroxi- <i>etil</i>)-anilina
MS	Massa seca
N	Normalidade (equivalente por litro)
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido (forma reduzida)
NEFA	Ácidos gordos não esterificados
nm	Nanómetro
p	Probabilidade estatística
PCA	Ácido perclórico
pf	Peso fresco
PIPES	Ácido piperazinedietano-sulfónico-1,4
POD	Peroxidase
PP _i	Pirofosfato
rpm	Rotação por minuto
SGR	Taxa específica de crescimento
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TRIS	(hidroximetil)aminometano
UL	Ulva
VSI	Índice viscerossomático
v/v	Volume por volume

Efeito da substituição de farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (*Sparus aurata*)

Este estudo foi conduzido com o intuito de investigar o efeito da substituição de farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (*Sparus aurata*). Seis dietas experimentais foram testadas com farinha de alga a diferentes percentagens de substituição: 5, 15 e 25% e uma dieta controlo sem incorporação de algas. A experiência foi levada a cabo num sistema aberto de circulação usando exemplares imaturos de *S. auratus*. Os peixes (n=210) foram divididos em grupos de 15 animais, em tanques duplos de 100 L e alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia, a 3% do seu peso, até que a biomassa duplicasse. O crescimento não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), contudo os peixes alimentados com UL-25 mostraram valores mais elevados comparativamente com os outros tratamentos. A composição lipídica do corpo eviscerado e o HSI foram reduzidos significativamente à medida que a incorporação do nível de alga na dieta aumentava ($p < 0,05$). Os parâmetros metabólicos não foram afectados pela inclusão de algas na dieta. Os resultados obtidos mostraram que o crescimento é similar entre exemplares de *S. auratus* alimentados com as dietas suplementadas com as macroalgas *Gracilaria sp.* (a 5, 15 e 25%) e *U. rigida* (a 5 e 15%) e com a dieta controlo. No entanto, a incorporação de UL-25 na dieta induz um melhor crescimento relativamente ao dos indivíduos alimentados com a dieta controlo. Os resultados indicaram que, é possível uma substituição parcial de farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida*. Devido ao elevado custo da farinha de peixe relativamente à farinha de algas, esta substituição parcial pode induzir a uma redução nos custos de produção de dietas alimentares. Além disso, esta substituição pode conduzir ao desenvolvimento sustentável da aquacultura por redução das necessidades de farinha de peixe nas actividades de pesca.

Palavras-chave: *Gracilaria*, *Ulva rigida*, farinha de algas, dourada, *Sparus aurata*, crescimento, parâmetros metabólicos.

The effect of the replacement of fish meal to algae flour *Gracilaria sp.* and *Ulva rigida* on growth and metabolic parameters in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

The aim of this study was to evaluate the effect of replacement of fish meal with seaweed (*Gracilaria sp.* and *Ulva rigida*) flour on the growth and metabolic parameters in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Six experimental diets were tested with algae flour at different level of replacement: 5, 15 and 25% and one control diet without algal incorporation. The experiment was carried out in a seawater open circulation system using immature specimens of *S. auratus*. Fishes were distributed in groups of 15 animals in 100 L tanks, and were fed with experimental diets twice a day at 3% of biomass, until duplication of biomass. Growth didn't show statistical differences ($p > 0,05$), however fish fed with UL-25 diet showed higher median values in respect to others treatments. Lipid composition of carcass and hepatosomatic index were significantly reduced ($p < 0,05$) as the proportion of seaweed flour in the diet was increased. Plasma, liver and muscle metabolic parameters analysed were not affected by inclusion of algae in the diet. Results indicated that growth of *S. auratus* fed on control or diet supplemented with macroalgae *Gracilaria sp.* (at 5, 15 and 25%) and *U. rigida* (at 5 and 15%) were similar. However incorporation of *U. rigida* at 25% in diet induced higher growth relatively to fish fed control diet.

The results of the study indicate that partial replacement of fish meal with seaweed flour (*Gracilaria sp.* (GR) and *Ulva rigida* (UL)) is possible. Due to high cost of fish meal in comparison to seaweeds flour, this partial replacement would allow a decrease in production costs of diets. In addition, the replacement of fish meal with seaweed flour may contribute to a more sustainable aquaculture industry by decreasing needs of fish meal from fisheries activities.

Keywords: *Gracilaria*, *Ulva rigida*, algae flour, gilthead sea bream, *Sparus aurata*, growth, metabolic parameters.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sparus aurata</i> (Linneo,1758).....	3
Figura 2. Distribuição geográfica de <i>S. auratus</i>	4
Figura 3. Mapa de integração metabólica	6
Figura 4. Representação gráfica dos valores médios de glucose plasmática de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	33
Figura 5. Representação gráfica dos valores médios de lactato plasmático de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	33
Figura 6. Representação gráfica dos valores médios de aminoácidos hepáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	35
Figura7. Representação gráfica dos valores médios de lactato muscular de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de tipos de algas utilizadas para alimentação de diferentes espécies de peixes.....	11
Tabela 2. Composição química das macroalgas <i>Gracilaria sp.</i> e <i>Ulva rigida</i> . (% MS).....	14
Tabela 3. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	15
Tabela 4. Crescimento, índices de transformação do alimento e índices somáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	29
Tabela 5. Composição corporal (% , seca) dos peixes alimentados com as dietas inicial, controlo e experimentais.....	30
Tabela 6. Parâmetros plasmáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	31
Tabela 7. Parâmetros hepáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	34
Tabela 8. Parâmetros musculares de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.....	36

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biotecnologia na Produção Animal	2
1.2. Biologia da dourada <i>Sparus aurata</i>	2
1.3. Modelo experimental.....	4
1.4. Metabolismo intermediário dos peixes teleósteos.....	5
1.4.1. Metabolismo de lípidos.....	6
1.4.2. Metabolismo de proteínas.....	7
1.4.3. Metabolismo de hidratos de carbono.....	7
1.5. Alimentação.....	9
1.6. Objectivos.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Mantimento dos peixes.....	14
2.2. Preparação da alimentação.....	14
2.3. Experiência realizada.....	14
2.4. Obtenção de amostras.....	17
2.5. Técnicas de análise aplicadas ao plasma, fígado e músculo.....	18
2.5.1. Análise metabólica a nível plasmático.....	18
A) Glucose.....	18
B) Lactato.....	19
C) Proteínas totais.....	20
D) Triglicéridos.....	20
E) Ácidos Gordos.....	22
2.5.2. Análise metabólica a nível hepático e muscular.....	23
A) Procedimento de homogeneização.....	23

B) Glucogénio.....	24
C) Aminoácidos livres totais.....	24
D) Glucose, Lactato e Triglicéridos.....	25
2.5.3. Análise de estatística.....	25
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Parâmetros zootécnicos.....	28
3.2. Composição química corporal dos peixes.....	30
3.3. Parâmetros metabólicos a nível plasmático.....	31
3.4. Parâmetros metabólicos a nível hepático.....	34
3.5. Parâmetros metabólicos a nível muscular.....	36
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO.....	46
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biotecnologia na produção animal

A biotecnologia é definida pela Organização das Nações Unidas como “qualquer aplicação que use sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para o desenvolvimento ou modificação de produtos e processos para usos específicos”.

O saber e as técnicas da biotecnologia são usados no melhoramento da produção agrícola de espécies vegetais para consumo humano; na produção de peixe em aquacultura; na recuperação de ambientes degradados, no tratamento de esgotos; nas novas tecnologias da saúde que permitem o desenvolvimento e produção de novos instrumentos de diagnóstico e tratamento de doenças até hoje consideradas incuráveis; está envolvida na reprodução medicamente assistida, na clonagem e em tantas outras áreas, que diz respeito à melhoria da qualidade de vida e do bem-estar do cidadão (www.ordembiologos.pt).

A aplicação da biotecnologia na produção animal centra-se na reprodução, melhoramento genético; saúde animal; alimentação e nutrição; crescimento e produção (FAO, 1991). Nomeadamente, na produção sustentável de peixes, a biotecnologia é uma ferramenta que pode ser utilizada de diversificadas formas. Esta é utilizada no sentido, de melhorar características genéticas dos peixes; de encontrar novas fontes de alimento e de melhorar a composição deste; de melhorar as taxas de crescimento dos peixes; de controlar ciclos reprodutivos, através de terapia hormonal; e de produzir vacinas e desenvolver resistência a doenças nos peixes (www.agwest.sk.ca). A necessidade de produção sustentável da dourada tem conduzido a diversos estudos com este peixe, como por exemplo a nível do seu genoma, utilizando métodos como microarray, marcadores genéticos e mapeamento do genoma (Canário A.V.M. *et al.*, 2008), a nível de osmorregulação (Laiz-Carrión, R. *et al.*, 2002), reprodução (Kara, M.K. *et al.*, 2006) imunologia (Arijo, S. *et al.*, 2004), entre outros. Estes estudos permitem um melhor conhecimento da fisiologia e metabolismo da dourada, contudo existe um factor com grande influência nesse mesmo conhecimento, a alimentação.

1.2. Biologia da dourada *Sparus aurata*

A dourada é um teleósteo pertencente à Classe *Actinopterygii*, Ordem *Perciformes* e à Família *Sparidae*. A dourada é um peixe de corpo ovalado, alto e comprimido lateralmente; cabeça grande com perfil arqueado; olhos pequenos; boca com lábios grossos e carnudos; dentes anteriores fortes e cónicos em número de 6 a 8, os seguintes são pequenos e os últimos agrupam-se em 2/3 séries de dentes molariformes; apresenta

uma barbatana dorsal comprida e única com 11 raios duros e 12/13 raios moles; uma barbatana caudal que contém uma ligeiramente bifurcação; barbatana anal com 3 raios duros e 11/12 moles; e 2 barbatanas pélvicas com um raio duro e 5 moles. Apresenta coloração cinzenta-prateada, com uma mancha escura no início da linha lateral e uma pequena banda vermelha na extremidade superior do opérculo. Em volta dos olhos possui uma banda dourada, rodeada por outras mais escuras, que se tornam amareladas com a idade (Figura 1) (www.fishbase.org; Santos, M. N. *et al.*, 2007).

Este peixe tem, geralmente, um comprimento máximo de 50 cm, no entanto já foram observados exemplares com cerca de 70 cm. Pode pesar cerca de 17 kg e ter uma idade máxima de 11 anos (www.fishbase.org).



Figura 1. *Sparus aurata* (Linneo,1758) (<http://www.fao.org>).

É um peixe que se pode encontrar no Oceano Atlântico, desde das ilhas Britânicas, Estreito de Gibraltar até Cabo Verde, em torno das Ilhas Canárias, e em todo o Mar Mediterrâneo (Figura 2). É uma espécie eminentemente litoral, vivendo em fundos rochosos ou arenosos, geralmente, atingem 30 m de profundidade e os adultos podem atingir cerca de 150 m. A dourada é considerada um peixe sedentário, migra sozinha ou em pequenas agregações desde Espanha até as Ilhas Britânicas, move-se no início da Primavera na direcção das águas costeiras protegidas, com o intuito de encontrar alimento abundante e temperaturas suaves. A dourada é uma espécie euritérmica e eurialina, ou seja, pode tolerar variações significativas de temperatura e de salinidade, respectivamente. Alimenta-se à base de moluscos (bivalves e gastrópodes) e crustáceos. Esporadicamente também se pode alimentar de pequenos peixes, poliquetas e algas (<http://genimpact.imr.no>).



Figura 2. Distribuição geográfica de *S. auratus* (<http://genimpact.imr.no>).

A dourada apresenta um hermafroditismo sequencial, possuindo nas suas gónadas uma zona testicular e ovárica. É um hermafrodita do tipo protândrico, ou seja, na sua primeira época reprodutora, que começa no fim do segundo ano de vida, a dourada actua como macho para posteriormente sofrer um processo de inversão sexual, um ano depois ou ocasionalmente dois anos, e comportar-se na sua segunda etapa como fêmea (Lasserre, 1972).

O ciclo da dourada pode variar consoante as distintas localizações geográficas, no entanto geralmente a maturação das gónadas realiza-se durante os meses de Setembro e Outubro, enquanto, que o período de disovulação tem lugar no fim de Outono. A evolução gonadal é levada a cabo de Janeiro a Abril, deste modo os animais permanecem em repouso sexual desde este último mês até Setembro. Dependendo da etapa do ciclo reprodutivo, os exemplares imaturos migram desde das zonas costeiras até ao mar aberto e vice-versa. Desta maneira, estes começam a penetrar em zonas costeiras no início da primavera, mantendo-se nelas até aos meses de Setembro e Outubro, coincidindo com a sua etapa de maturação gonadal. Posteriormente saem para o mar aberto, localizando-se em todos os fundos costeiros, onde permanecem até ao mês de Fevereiro (Lasserre, 1972; Arias, 1976; Suau e López, 1976; San Felú, 1987).

1.3. Modelo experimental

A dourada é um teleósteo de elevado valor comercial cujo cultivo, levado a cabo maioritariamente na região mediterrânea, tem crescido muito nos últimos anos (Léon *et al.*, 2001). Cerca de 50% da produção de dourada é concebida no sul da península

Ibéria, fundamentalmente na Andaluzia. No geral, apesar das perspectivas gerais de crescimento, o sector tem se encontrado nos últimos anos com problemas de saturação no mercado, que tem conduzido a um declive muito acentuado nos preços (Merca-Madrid, Janeiro 2003). O investimento na investigação e no desenvolvimento tecnológico é sem dúvida uma condição necessária para superar os problemas que está a atravessar o sector, tal como se tem realizado com outras espécies de alto valor comercial e de tradicional consumo, como o salmão (León *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2003).

A dourada, sendo uma espécie carnívora, contém determinadas características metabólicas, no entanto opostas às dos mamíferos. As características que o distinguem são: a utilização de hidratos de carbono de forma precoce, tanto na digestão como no metabolismo e a ausência de regulação de temperatura. A temperatura ambiente possui um papel importante na utilização de hidratos de carbono, a temperaturas baixas os hidratos de carbono são pobremente utilizados, resultando numa acumulação excessiva de glucogénio no fígado (Weatherley e Gill, 1989). Estas espécies requerem dietas ricas em lípidos e maioritariamente em proteínas.

Neste sentido, numa abordagem biotecnológica, a dourada é utilizada como modelo experimental sendo necessário estudar o seu metabolismo e crescimento.

1.4. Metabolismo intermediário dos peixes teleósteos

O metabolismo é o conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos. Transformações que podem ser catabólicas, dizem respeito às vias de degradação das macromoléculas, havendo produção de energia, ou anabólicas, que resultam das reacções de síntese de moléculas complexas a partir de moléculas mais simples, com consumo de ATP. As reacções bioquímicas que constituem estas vias metabólicas ocorrem por acção de substâncias proteicas, as enzimas, que têm funções catalisadoras, ou seja aumentam a velocidade de reacção possibilitando o metabolismo dos seres vivos (Campos *et al.*, 2002). As vias metabólicas dos peixes teleósteos são praticamente as mesmas que as dos mamíferos, no entanto com algumas particularidades (Walton e Cowey, 1982) (Figura 3).

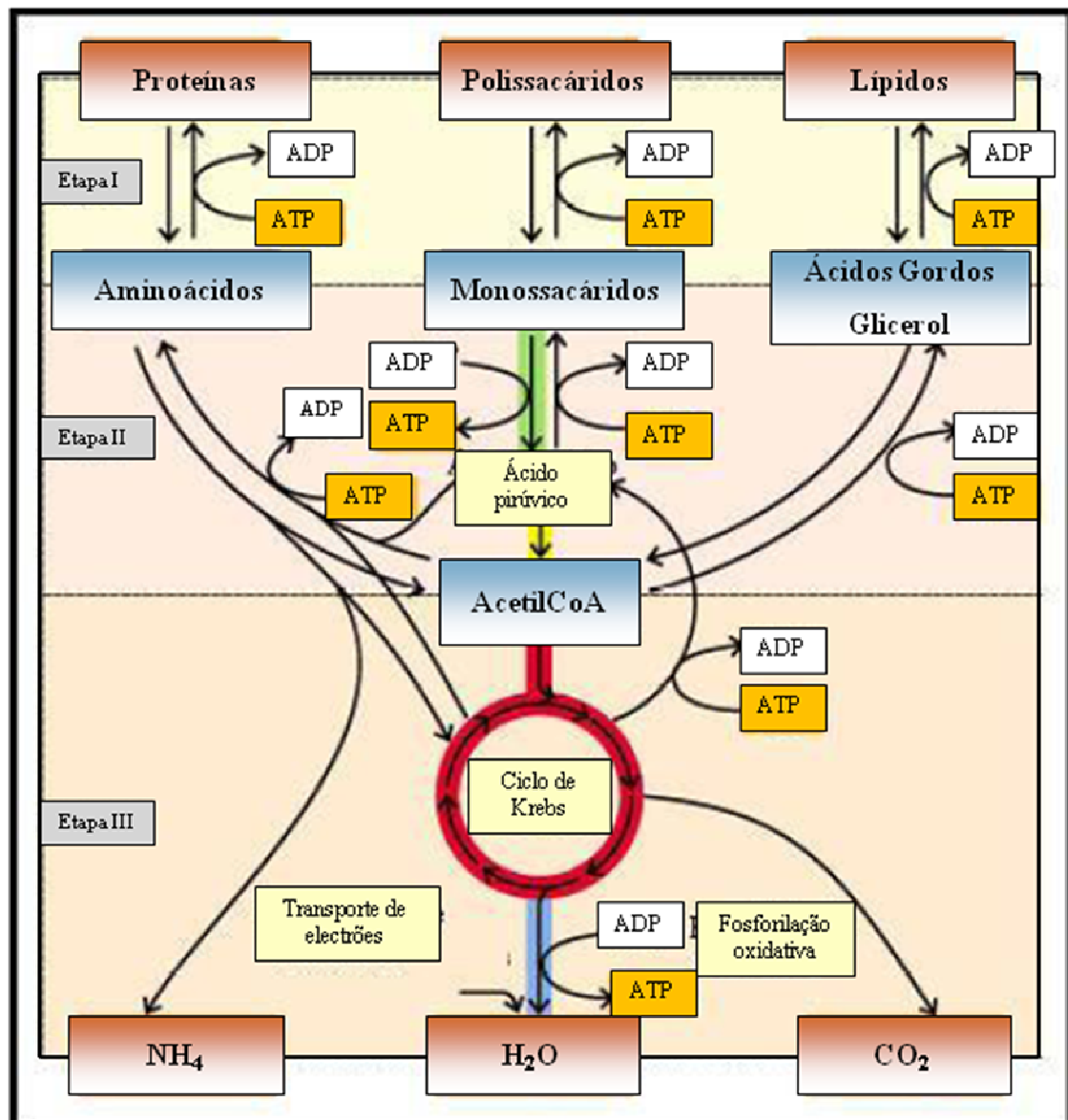


Figura 3. Mapa de integração metabólica (adaptado de www.educa.aragob.es).

1.4.1. Metabolismo de lípidos

Os lípidos, para além de serem uma fonte rica de energia, são também, necessários para manter a estrutura e a função das membranas celulares (Weatherley e Gill, 1989). Os lípidos utilizados no metabolismo energético, armazenam-se principalmente como triglicéridos e a sua oxidação, constitui um processo considerável do metabolismo energético da maioria dos tecidos (Sheridan, 1988; 1994; Weber e Haman, 1996). É um constituinte importante da dieta dos peixes teleósteos e é metabolizado no fígado, a partir do qual uma parte é transportada para o músculo vermelho e gordura mesentérica e a outra, considerada a grande maioria, permanece armazenada no fígado (Sheridan, 1988). Em aquacultura, a nível de nutrição, ao diminuir a relação proteína/energia

(como consequência do aumento dos níveis de lípidos na dieta) obtém-se uma maior utilização de proteína para o crescimento. O aumento do nível de gorduras na dieta provoca um efeito de “poupança” sobre a proteína, pelo qual esta é retida em maior proporção ou se pode reduzir o nível óptimo deste nutriente na dieta. Desta forma, o aumento dos níveis de lípidos na dieta, até a um determinado limite, provoca um incremento de energia metabolizada, uma retenção eficaz de energia e uma melhora na conversão da proteína (Hernández *et al.*, 2001).

1.4.2. Metabolismo de proteínas

Dado que, o componente maioritário da dieta dos peixes é a proteína, o catabolismo proteico nestes animais constitui a principal fonte de energia (Mommsen e Walsh, 1992). Os peixes teleósteos utilizam as proteínas, também, como sustento para a elevada taxa de trocas de proteína muscular, que se reflecte na elevada actividade dos enzimas implicada em processos de descarboxilação e transaminação de aminoácidos (Moon e Johnston, 1981). Elevados níveis de proteína na dieta do peixe exige um aumento do nível de energia necessário para metabolizá-la (Weatherley e Gill, 1989). Todo o animal tem um limite para utilizar a proteína ingerida, o excesso de proteína pode sofrer uma degradação formando íões amónio e ureia, ou depositar-se como lípidos ou hidratos de carbono nos tecidos (Weatherley e Gill, 1989; Cowey e Walton, 1989). Os aminoácidos livres têm múltiplas origens, entre elas, a absorção intestinal de proteínas hidrolizadas ingeridas na dieta, a síntese de *novo* e as interconversões e posterior hidrólise das proteínas endógenas (Cowey e Walton, 1989). Os principais destinos dos aminoácidos são: i) a síntese proteica (Mommsen e Walsh, 1992); ii) a síntese de glucose através de gluconeogénese (Mommsen, 1986; Mommsen *et al.*, 1986); e iii) o uso como fonte de energia no caso do fígado (Mommsen e Plisetskaya, 1991).

1.4.3. Metabolismo de hidratos de carbono

Os hidratos de carbono constituem outra fonte de energia disponível na dieta (Weatherley e Gill, 1989). A utilização de hidratos de carbono está restringida, em alguns peixes, a 25% do seu teor na dieta, talvez devido à capacidade digestiva limitada que apresentam certos peixes para polissacáridos (Ruiz- Amil *et al.*, 1987). A utilização dos hidratos de carbono é pobre no sentido da digestão e do metabolismo, no entanto a alimentação induz uma hiperglicemia prolongada nos peixes, o que reflecte que os peixes teleósteos têm poucos recursos para controlar a homeostasia da glucose

(Weatherley e Gill, 1989; Wilson, 1994; Blasco *et al.*, 1996). Tal como nos mamíferos, o principal lugar de reserva energética dos peixes teleósteos é o fígado, sendo os outros lugares, que armazenam hidratos de carbono, fontes secundárias de reserva energética. Um exemplo de um lugar de reserva secundário é o músculo, o qual contém reservas energéticas que serão utilizadas *in situ* em caso de necessidade (Weber e Haman, 1996). A glucose que circula no sangue provém fundamentalmente de três fontes: i) a dieta (Wilson, 1994; Cowey e Walton, 1989); ii) a degradação de glucogénio, que ocorre sobretudo no fígado (Collins e Anderson, 1997); e iii) a gluconeogénese, que também ocorre no fígado e a menor escala nos rins (Collins e Anderson, 1997; Suárez e Mommsem, 1987).

No metabolismo dos hidratos de carbono existem três processos principais que ajudam a manter constante a glicemia plasmática:

- 1) **Glucogenólise:** o glucogénio é a principal forma de reserva da glucose e encontra-se sobretudo no fígado e em pouca proporção nos outros tecidos (Mommsem e Plisetskaya, 1991, 1993). Durante períodos de plenitude nutricional o excesso de glucose é imediatamente armazenado sob a forma de glucogénio, enquanto que, em condições deficientes em glucose (como durante períodos de jejum), o glucogénio é metabolizado para libertar glucose. Os peixes não mobilizam o glucogénio tão facilmente como os mamíferos e o grau de mobilização varia entre espécies e tecidos. Desta forma, observam-se grandes diferenças entre os teleósteos e os mamíferos já que, em muitas espécies de peixes, os níveis de glucogénio não variam muito durante períodos longos de jejum (Foster e Moon, 1991; Soengas *et al.*, 1996) ou durante esforços intensos (Christiansen e Klungsoyr, 1987). Este processo consiste na degradação do glucogénio para originar glucose, que é utilizada pelo órgão ou é secretada para a corrente sanguínea.
- 2) **Glucólise:** é a principal via metabólica para a obtenção de energia, ATP (adenosina trifosfato), através da conversão de glucose em ácido pirúvico (Campos, 2002). Está presente em todos os tecidos dos peixes, podendo-se ordenar estes de acordo com a sua capacidade glucolítica do seguinte modo: músculo vermelho > músculo branco > coração > rim > fígado > brânquias (Knox *et al.*, 1980; Walton e Cowey, 1982). Em condições aeróbias a glucólise fornece substratos oxidáveis para as mitocôndrias, enquanto que, na ausência de oxigénio a glucose é convertida em lactato, por exemplo no músculo branco (Foster e Moon, 1991; Van Raaij *et al.*,

1996). No fígado a glucólise tem como função fornecer metabolitos intermediários provenientes de outras vias metabólicas, para os processos biossintéticos (Su e Storey, 1993; Pilkis *et al.*, 1988).

- 3) **Gluconeogénese:** Como os peixes teleósteos têm uma dieta pobre em hidratos de carbono, este processo é importante para fornecer uma quantidade de glucose baixa, mas essencial para o funcionamento correcto dos tecidos (Christiansen e Klungsoyr, 1987). O que implica que este processo actue de forma quase permanente nos peixes (Suarez e Mommsem, 1987; Moon, 1988; Pereira *et al.*, 1995), contrariamente com o que sucede com os mamíferos que praticamente só funciona em condições de jejum (Moon, 1988). Esta via metabólica funciona fundamentalmente no fígado e os seus substratos são: i) o lactato, produzido durante a glucólise e a glucogenólise no músculo (Suarez e Mommsem, 1987); ii) os aminoácidos, provenientes das proteínas da dieta ou da degradação de proteínas musculares (Blasco *et al.*, 1996); e iii) o glicerol, proveniente do catabolismo dos triglicéridos (Sheridan, 1988).

O conhecimento geral do metabolismo dos peixes teleósteos é de extrema importância, pelo facto do efeito da dieta alimentar poder ser reflectido no metabolismo da dourada.

1.5. Alimentação

A forma mais comum de aquacultura que se utilizava era o cultivo extensivo, sem a adição de alimento suplementar, em que apenas a produtividade natural sustentava uma baixa densidade de indivíduos, resultando numa baixa eficiência de produção. Com o passar dos tempos, a aquacultura sofreu evoluções progressivas transformando-se em cultivos intensivos, garantido assim, a viabilização económica dos cultivos.

A alimentação tornou-se o factor unitário com maior importância para a administração de cultivos modernos. As espécies de peixes seleccionadas para a cultura são na sua grande maioria carnívoras, devido ao seu elevado valor comercial (FAO, 1994). Estes, requerem uma dieta de elevado conteúdo proteico, como a farinha de peixe, formulada por desperdícios de peixe associados ao processamento de peixe para consumo humano ou por peixe que é usado unicamente para a sua produção (www.fao.org). Esta dieta é considerada como a fonte nutricional ideal para suprir as necessidades proteicas e lipídicas destes peixes. A rápida expansão em aquacultura, pode conduzir a uma dependência na alimentação com o uso de peixes (FAO, 2002). As matérias-primas de

origem marinha representam mais de 50% dos custos de operação em aquacultura intensiva, sendo a proteína a fonte de alimento mais cara (Lovell, 2002). Além disso, estas matérias-primas podem ser consideradas uma fonte potencial de resíduos químicos e metais pesados (Hansen *et al.*, 1976; Hendricks, 2002). A confrontação com tais factos levou à realização de vários estudos, com o intuito de avaliar uma fonte de proteína alternativa na dieta dos peixes, com atenção tanto no aspecto nutricional como de custo. As fontes proteicas alternativas incluem alimentos fabricados a partir de derivados animais, tanto invertebrados (zooplâncton) (Kibria *et al.*, 1999; Plancestia-Jatomea *et al.*, 2002) como vertebrados (sangue, fígado, carne ou osso) (Alexis *et al.*, 1985; Millamena e Golez, 2001), proteínas de organismos unicelulares (fungos ou bactérias) (Oliva-Teles e Gonçalves, 2001, Li e Gatlin III, 2003), sementes (soja, girassol ou algodão) (Kissil *et al.*, 2000; Pereira e Oliva-Teles, 2002), legumes (soja, feijão ou ervilhas) (Nengas *et al.*, 1996; Thiessen *et al.*, 2003) e outros produtos de origem vegetal (glúten de milho, trigo ou concentrados proteicos) (Regost *et al.*, 1999; Burel *et al.*, 1998; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005). No entanto, grande parte destas alternativas apresenta uma série de inconvenientes. Segundo Tacon (1994), a disponibilidade de proteínas provenientes de organismos unicelulares é limitada, dispendiosa e de qualidade variável. O uso de produtos derivados de animais terrestres também é desaconselhável, devido a possíveis contaminações microbianas. Deste modo, a identificação e o uso de proteínas alternativas, com origem nas plantas, é considerado uma prioridade para suportar o crescimento desta actividade (Kaushik *et al.*, 1990; Tacon *et al.*, 1994). As algas com elevado teor em proteínas e elevada taxa de produção estão a receber uma elevada atenção, como novo alimento, com potenciais benefícios nutricionais na dieta dos peixes (Buschmann *et al.*, 2001; Rupérez e Saura-Calixto, 2001). Para além do seu potencial valor nutricional, como substituto de proteínas, as algas podem também dar um contributo importante na dieta dos peixes como fonte de lípidos (Nakagawa *et al.*, 1987). A Tabela 1 refere alguns exemplos de algas que substituem a dieta de peixe em diferentes espécies de peixes.

Tabela 1. Exemplos de tipos de algas utilizadas para alimentação de diferentes espécies de peixes.

Alga	Espécie aplicada	Referência
<i>Ulva rigida</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Diler <i>et al.</i> , 2007
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i> <i>Ulva rigida</i> <i>Gracilaria cornea</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Valente <i>et al.</i> , 2006
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2006
<i>Chorella</i>	<i>Sebastes schlegeli</i>	Bai <i>et al.</i> , 2001
<i>Spirulina platensis</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Nandeesh, <i>et al.</i> , 1998
<i>Spirulina maxima</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Olvera-Novoa <i>et al.</i> , 1998
<i>Ascophyllum</i>	<i>Pagrus major</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 1997
<i>Ulva</i>	<i>Acanthopagrus shlegeli</i>	Nakagawa <i>et al.</i> , 1993

1.6. Objectivos

Na produção de animais, o alimento representa um componente significativo de custo de produção. Neste sentido, uma abordagem biotecnológica é levada a cabo, para avaliar o efeito da substituição de farinha de peixe por farinha de algas na alimentação da dourada. Para tal, utilizar-se-ão duas classes de algas (*Ulva rigida* e *Gracilaria sp.*), que serão avaliadas a três níveis de substituição diferentes (5, 15 e 25%).

O efeito da substituição será avaliado no crescimento e no metabolismo da dourada (*S. aurata*).

Os resultados permitirão determinar se é possível a substituição da farinha de peixe por farinha de algas, assim como, em que proporção. Estes dados serão de grande utilidade para formular dietas de peixes, com uma menor proporção de farinha de peixe e consequentemente, com custos de produção menores.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Mantimento dos peixes

Os peixes empregues nesta experiência foram exemplares de dourada (*S. auratus*) imaturas (14-15 g), os quais foram proporcionados pela empresa CUPIMAR S.A. (San Fernando, Cádiz, Espanha) e transferidos para Planta de Cultivos Marinhos (Universidade de Cádiz, Puerto Real, Cádiz, Espanha). Os peixes (n=220) foram mantidos num sistema de circuito aberto, em tanques de 100 L de capacidade que continha água do mar, com 36 ‰ de salinidade, temperatura constante de 18°C ± 1°C e um fotoperíodo natural. O período de aclimação foi de 2 semanas, durante este tempo a alimentação foi feita com recurso a dietas comerciais, fornecendo 3% do seu peso por dia. Após este período, foram aplicadas diferentes dietas alimentares.

2.2. Preparação da alimentação

As macroalgas utilizadas para esta experiência foram a *Gracilaria sp.* (GR) e a *Ulva rigida* (UL), as quais foram proporcionadas pelo Centro de Biotecnologia Marinha da Universidade das Palmas da Grande Canária. Testaram-se 7 dietas alimentares, das quais 6 são alimentações experimentais, com farinha de macroalgas de 5, 15 e 25% (denominadas GR-5, GR-15, GR-25, UL-5, UL-15 e UL-25) e uma é o controlo (sem algas). A composição química das algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* está presente na tabela 2.

Tabela 2- Composição química das macroalgas *Gracilaria sp* e *Ulva rigida* (% MS).

Macroalgas	Proteínas	Lípidos	Hidratos de carbono	Cinzas	Humidade
<i>Gracilaria sp.</i> (GR)	13,5	0,8	39,8	35,6	10,3
<i>Ulva rigida</i> (UL)	14,9	1,2	50,4	20,7	12,8

2.3. Experiência realizada

Os exemplares de dourada (n=210), previamente medidos e pesados, foram divididos em grupos de 15 animais, em tanques de 100 L, nos quais foram adicionadas condições alimentares distintas: alimentações experimentais, com algas a diferentes percentagens, (denominadas GR-5, GR-15, GR-25, UL-5, UL-15 e UL-25) e alimentação sem algas denominada controlo, existindo dois tanques por cada dieta alimentar. As dietas foram preparadas no Departamento de Biologia Aplicada, na Universidade de Almería. Os

ingredientes e composição química das dietas alimentares estão detalhados na Tabela 3. A duração da experiência foi determinada pelo tempo necessário para duplicar a biomassa inicial dos peixes (45 dias) (Abril-Maio, 2008).

Tabela 3. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg⁻¹ MS)	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Farinha de peixe (LT94)	650	640	620	595	640	620	600
<i>Gracilaria sp.</i>	-	-	-	-	50	150	250
<i>Ulva rígida</i>	-	50	150	250	-	-	-
Azeite óleo de peixe	39	40	41	43	40	41	43
Lectina de soja	10	10	10	10	10	10	10
Dextrina	218	187	116	49	187	116	44
Celulosa	40	30	20	10	30	20	10
Cloreto de colina	8	8	8	8	8	8	8
Vitaminas-minerais	25	25	25	25	25	25	25
Alginato de sódio	10	10	10	10	10	10	10
Composição química							
Matéria seca (% MS)	91,6	91,5	90,3	91,5	92,3	92,3	91,3
Proteínas (% MS)	44,5	44,4	44,3	43,8	44,6	44,1	43,7
Lípidos (% MS)	9,3	9,3	9,2	9,1	9,0	9,4	9,4
Cinzas (% MS)	11,9	13,4	16,1	19,3	13,2	14,8	17,4
Fibras (% MS)	0,4	0,5	1,0	1,6	0,5	0,8	1,3
Hidratos de carbono (% MS)	25,5	23,9	19,7	17,7	24,8	23,2	19,5
Energia (MJ/Kg)	15,2	14,9	14,2	13,7	15,0	14,8	14,1

Antes da iniciação do período experimental propriamente dito, os peixes foram mantidos durante 2 semanas com uma dieta comercial, fornecendo-lhes 3% do seu peso ao dia, distribuído em duas tomas (uma pela manhã e outra pela tarde). Esta mesma orientação foi seguida desde o início da experiência, procedendo-se segundo a seguinte rotina:

- i) Pela manhã efectuou-se a limpeza dos tanques para eliminar as fezes ou qualquer resto de sujidade;

- ii) Repousou-se durante 30 minutos para permitir que os peixes se tranquilizassem. Durante este tempo pesou-se a quantidade de alimento a fornecer a cada tanque (1,5% de biomassa);
- iii) Alimentou-se cada tanque colocando pouco a pouco o alimento, para assegurar que fosse consumido antes de chegar ao fundo do tanque. A alimentação foi mantida até que o alimento pesado se esgotasse, ou até que os peixes deixassem de comer definitivamente e o alimento se depositasse no fundo do tanque sem ser consumido;
- iv) Deixou-se passar uma hora. Revistaram-se os tanques e quando se observava que ficavam depositados grãos de alimentação, estes eram retirados e armazenados num recipiente, identificado com o número do tanque e posteriormente congelado;
- v) No final da experiência, estes grãos foram secos e pesados para serem subtraídos pela quantidade diária de alimento administrada, de modo a avaliar os parâmetros zootécnicos;
- vi) A alimentação foi repetida pela tarde (1,5% restante), procedendo-se da mesma forma que a da manhã;
- vii) Quando se observou que os peixes ficavam com fome aumentou-se o nível de alimentação a 0,5%.
- viii) Em cada 15 dias ajustou-se a quantidade de alimento administrado.

Inicialmente, antes do período experimental foram retirados 10 peixes de um total de 220 para a análise química corporal (humidade, proteínas, lípidos, cinzas e energia). A análise foi determinada a partir de amostras de músculo sem pele do lado pigmentado de uma única amostra, de acordo com os métodos de AOAC (1995).

Após o tempo de aclimação os peixes foram anestesiados, pesados e medidos de 15 em 15 dias. As amostragens foram realizadas no primeiro e no último dia da experiência. Antes de cada amostragem os peixes permaneceram em jejum por um período de 24 horas. Novamente foram retiradas amostras de músculo para analisar a composição química corporal dos peixes. As vísceras e o fígado foram pesados para calcular os parâmetros zootécnicos, os quais foram avaliados para estimar o aproveitamento nutritivo do alimento. Os parâmetros zootécnicos estudados foram:

- 1) o crescimento (SGR), definido como a variação do peso corporal ao longo do tempo (%).

- 2) o índice de transformação do alimento (FCR), definida como a relação entre o peso corporal ganho (g) por alimento seco consumido (g).
- 3) o índice hepatossomático (HSI), consiste na relação percentual entre o peso do fígado (g) e o peso total (g).
- 4) o índice viscerossomático (VSI), calculado como a relação entre o peso das vísceras (g) e o peso total (g), expresso em percentagem.

Relativamente aos parâmetros metabólicos, obtiveram-se as seguintes amostras de material biológico: o plasma (para medir glucose, lactato, proteínas, triglicéridos e ácidos gordos); o fígado e o músculo (para medir glucogénio, aminoácidos livres totais, glucose, lactato e triglicéridos). Todo o trabalho experimental cumpre com as directrizes do Conselho da União Europeia (86/609/EU) e da Universidade de Cádiz para o uso de animais de laboratório.

2.4. Obtenção de amostras

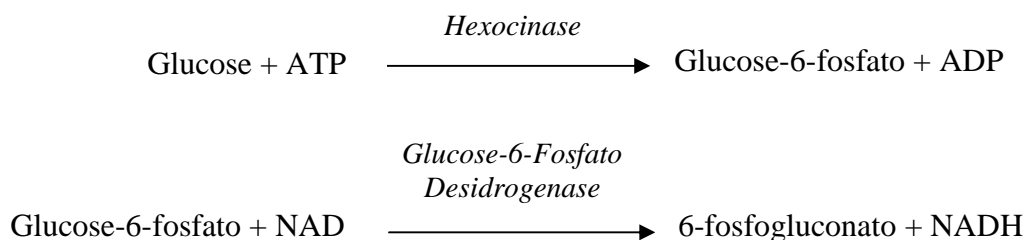
Os peixes foram submetidos a uma anestesia com 2-fenoxietanol (0,1% v/v) (Sigma, P-1126) utilizando uma dose de 0,5 mL/L de água no início da experiência para a obtenção de dados biométricos (comprimento e peso) e uma dose de 1 mL/L de água para a obtenção de amostras biológicas. As amostras de sangue, aproximadamente 0,5 mL, foram obtidas por punção da artéria caudal, utilizando seringas de insulina previamente heparinizadas com heparina amónica (Sigma, H-6279, 25000 unidades/3 mL de solução salina 0,9% de NaCl). Estas amostras foram recolhidas em tubos Eppendorf de 1,5 mL heparinizados e posteriormente centrifugadas (usando a centrífuga ALC, mod. 4204), durante 3 min a 10850 rpm. Obtiveram-se 2 amostras de plasma que, foram congeladas em nitrogénio líquido e armazenadas a -80°C em tubos de Eppendorf de 0,5 mL, até ser efectuada a sua análise. As vísceras foram retiradas para a obtenção do seu peso. As amostras de fígado e músculo foram pesadas, congeladas em nitrogénio líquido e armazenadas a -80°C em tubos Eppendorf de 1,5 mL, para a sua posterior análise.

2.5. Técnicas de análise aplicadas ao plasma, fígado e músculo

2.5.1. Análise metabólica a nível plasmático

A) Glucose

A concentração de glucose plasmática foi medida mediante o kit comercial Spinreact (referência 10001200) adaptado a uma microplaca de 96 poços. A glucose é fosforilada pela adenosina trifosfato (ATP) numa reacção catalizada pela hexocinase (HK). Como resultado desta fosforilação produz-se glucose-6-fosfato, que por sua vez é oxidado a 6-fosfogluconato na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), numa reacção catalisada por glucose-6-fosfato desidrogenase. Durante esta oxidação uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH, que tem a sua máxima absorvância a 340 nm. Por este motivo as variações de absorvância que se produzem a 340 nm serão directamente proporcionais à concentração de glucose. A reacção é realizada da seguinte forma:

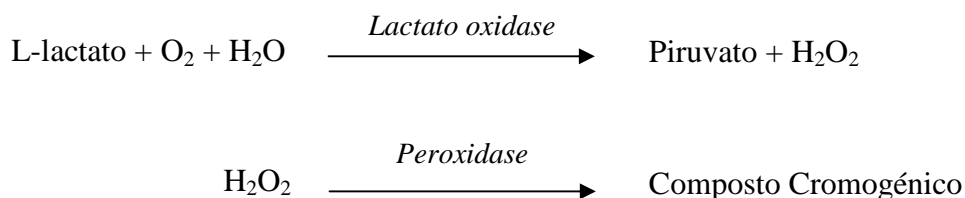


Os standards usados da glucose (20 mM/L) foram concebidos a partir de glucose anidra (Panreac, cód. 1001200) de onde se obtiveram concentrações de 0, 2, 5 e 10 mM/L. A solução reactiva foi preparada dissolvendo os enzimas (NAD⁺ a 2mmol/L, HK a 1000 U/L e glucose-6-fosfato a 1000U/L) no tampão (TRIS pH 7,5 a 4mmol/L, ATP a 2,1 mmol/L e Mg²⁺ a 0,8 mmol/L), seguidamente incubou-se num banho termoestático a 37°C. Nos poços da multiplaca (Costar, Corning Incorporated, #3628) repartiram-se 10 µL de cada amostra, por duplicado e de cada standard por quadruplicado, adicionando a todos estes 200 µL de solução reactiva. A placa foi tapada com parafilme (Parafilm “M”, Laboratory film American CanTM) e incubada a 37°C numa estufa durante 5 minutos. Posteriormente a absorvância foi medida usando duplo comprimento de onda: 340 nm para a leitura e 550 nm como referência. Utilizou-se um leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk, VT, USA) controlado pelo software

DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY). O ensaio foi linear desde 0 a 20 mM/L.

B) Lactato

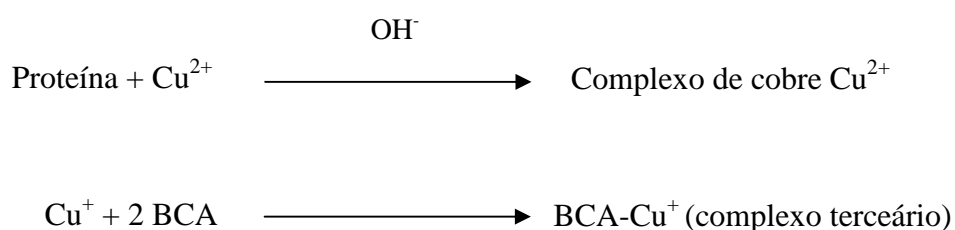
Esta análise foi feita mediante o kit comercial Spinreact (cód. 1001330, 5x10 mL), adaptado à microplaca de 96 poços. O ácido láctico é oxidado a piruvato e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) por meio do lactato oxidase. Na presença do peróxido de hidrogénio, a peroxidase cataliza a condensação oxidativa dos precursores cromogénicos, originando um composto cromogénico que tem um máximo de absorvância a 540 nm. A variação de absorvância a este comprimento de onda é directamente proporcional à concentração de lactato da amostra. A reacção produz-se do seguinte modo:



Os standards (Sigma #826-10) usados foram de 0, 5, 10,15 e 20 mg/dL. Preparou-se a solução reactiva adicionando enzimas (Lactato oxidase a 800 U/L, Peroxidase a 2000 U/L e 4-Aminofenazona a 0,4 mmol/L) em 10 mL de tampão (PIPES pH 7,5 a 50 mmol/L e 4-Clorofenol a 4 mmol/L). A esta solução adicionaram-se 10 mL de solução isotónica (0,9 g NaCl/ 100 mL água destilada). Agitou-se suavemente e colocou-se num banho termoeestático a 37°C. As amostras de plasma foram diluídas na proporção de 1:2 (v/v) com a mesma solução isotónica, repartindo 10 µL em duplicado na microplaca, enquanto, que os standards foram distribuídos com igual volume por quadruplicado. Posteriormente foram adicionados 200 µL de reactivo. A placa foi selada com parafilm (Parafilm “M”. Laboratory film American CanTM. Chicago, IL 60631) e incubada durante 5 minutos, a 37°C na estufa. Seguidamente, foi medida a absorvância utilizando o leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk; VT, USA) controlado pelo software DeltaSoft 3 para a Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), usando o dobro do comprimento de onda: 550 nm para a leitura e 630 nm como referência. O ensaio mostrou-se linear desde 0 até 20 mg/dL.

C) Proteínas totais

A análise foi realizada por intermédio do uso do kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce, P.O. # 2323) (Smith *et al.*, 1985) adaptado à microplaca de 96 poços. A análise de proteínas plasmáticas foi levada a cabo através da redução de Cu^{2+} a Cu^+ , a qual é provocada pelas proteínas num meio alcalino. O íon cobre (Cu^+) por reacção com duas moléculas de ácido bicinconínico (BCA) forma um composto púrpura hidrossolúvel que apresenta uma forte absorvância a 562 nm. A absorvância a este comprimento de onda é directamente proporcional à concentração das proteínas da amostra. A reacção realiza-se da seguinte forma:

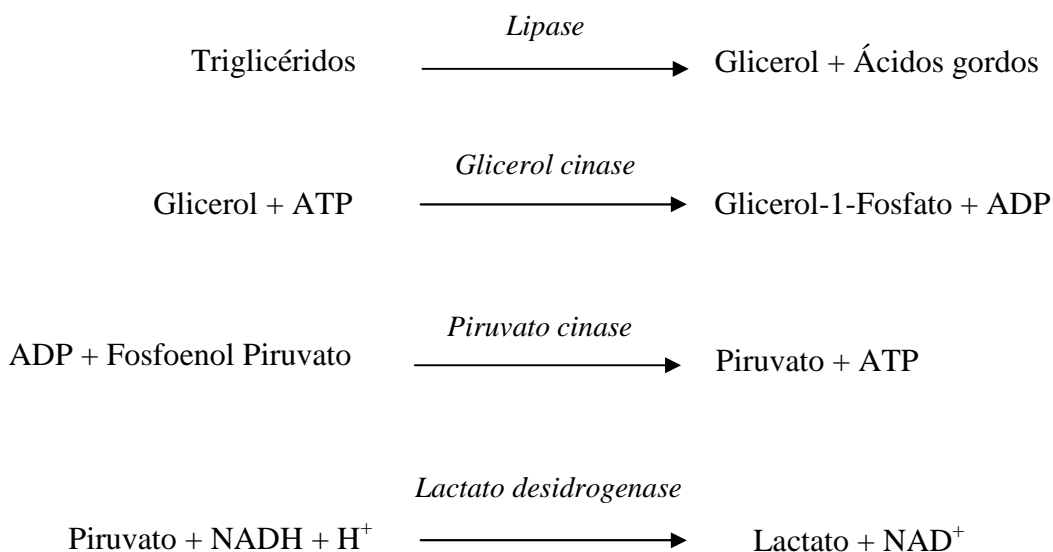


Os standards (Pierce, # 23029) usados foram de 0, 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ a partir do kit comercial BSA (2 mg/mL). A solução reactiva foi concebida a partir de uma mistura de 20 mL de reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio) e 400 μL de reagente B (4% de sulfato de cobre) que, por sua vez foi incubada num banho termoestático a 37°C. Na microplaca repartiram-se 10 μL de plasma, previamente diluídos 1:50 (v/v) com água destilada, por duplicado, ao passo que os standards repartiram-se em igual volume mas por quintuplicado. Posteriormente adicionaram-se 200 μL da solução reactiva por poço. A placa foi tapada com parafilme (Parafilm "M". Laboratory film American CanTM. Chicago, IL 60631) e incubada a 37°C numa estufa, durante 30 minutos na obscuridade. Após a incubação foi medida a absorvância por recurso ao leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk; VT, USA) controlado pelo software DeltaSoft 3 para a Macintosh (BioMetallics, Inc, NY) usando o dobro do comprimento de onda: 550 nm para a leitura e 630 nm como referência. O ensaio mostrou-se linear desde 0 até 20 mg/mL.

D) Triglicéridos

A análise foi feita mediante o kit comercial Spinreact (cod. 1001311, 10x20 mL), adaptado à microplaca de 96 poços. Os triglicéridos são hidrolizados a glicerol e ácidos

gordos por meio da lipase, o glicerol formado é fosforilado pelo ATP produzindo glicerol-1-fosfato e ADP, numa reacção catalisada pelo glicerol cinase. O ATP cataliza-se de novo, junto com o piruvato, ao reagir o ADP anterior com o fosfoenol piruvato, através do piruvato cinase. Finalmente o piruvato é reduzido a lactato, por intermédio de uma oxidação equimolar de NADH, na presença de lactato desidrogenase. O NADH apresenta um máximo de absorvância a 340 nm, assim a variação da absorvância, medida a este comprimento de onda, é directamente proporcional à concentração de triglicéridos da amostra. A reacção será produzida da seguinte forma:



Para obter a solução reactiva de trabalho, dissolveu-se os enzimas (Lipoproteína lipase a 150000 U/L, Glicerol cinase a 500 U/L, Glicerol-3-oxidase a 2500 U/L, Peroxidase a 440 U/L, 4-Aminofenazona a 0,1 mmol/L e ATP a 0,1 mmol/L) no tampão (GOOD pH 7,5 a 50 mmol/L e p-Clorofenol a 2mmol/L). O kit possui um standard de 200 mg/dL que, mediante sucessivas diluições com água destilada, permite a execução da recta padrão: 0, 25, 50, 100 e 200 mg/dL. Por outro lado, foi feita uma solução isotónica misturando 0,9 g de NaCl com 100 mL de água destilada e diluíram-se as amostras plasmáticas 1/6 com a solução. Como controlo usou-se uma solução standard de triglicéridos 200 mg/dL (Sigma, Lot. 012K6046). Na microplaca repartiram-se 10 µL de amostra diluída por duplicado e os standards por quadruplicado. A estes poços adicionaram-se 200 µL de solução reactiva de trabalho, deixando quatro poços vazios para fazer o branco. A placa foi selada com parafilme (Parafilm "M". Laboratory film American CanTM. Chicago, IL 60631) e incubada a 37°C numa estufa, durante 5 minutos. Seguidamente, foi medida a absorvância com auxílio ao leitor de microplacas

automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk; VT, USA) controlado pelo software DeltaSoft 3 para a Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), usando o comprimento de onda simples de 490 nm. O ensaio mostrou-se linear desde 0 até 20 mg/mL.

E) Ácidos Gordos

A análise foi realizada através do kit comercial NEFA C da Wako, este teste consiste num teste colorimétrico enzimático para a determinação quantitativa *in-vitro* dos ácidos gordos livres no plasma. A análise de ácidos gordos foi levada a cabo através de algumas reacções, como passo inicial os ácidos gordos não esterificados (NEFA), ATP, Mg^{++} e CoA são convertidos em acetil-CoA pela acção do enzima acetil-CoA sintetase (ACS). O acetil-CoA derivado reage com o oxigénio, na presença do acetil-CoA oxidase (ACOD), para produzir peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O peróxido de hidrogénio na presença da peroxidase (POD), possibilita a condensação oxidativa do 3-metil-N-etil-N-(β -hidroxietil)-anilina (MEHA) com 4-aminoantipirina, originando um produto roxo que absorve a luz a 550 nm. A intensidade do pigmento roxo é proporcional à concentração de ácidos gordos livres na amostra. O ácido ascórbico é eliminado da amostra mediante o óxido de ascorbato. As reacções estão representadas abaixo:



Prepararam-se duas soluções reactivas, A e B, para a solução reactiva A, dissolveu-se o reagente A (ACS a 0,3 kU/L, AOD a 3 kU/L, CoA a 0,6 g/L, ATP a 5 mM, 4-Aminoantipirina a 1,5 mM e Aziduro de sódio a 1,4%) com 10 mL de solvente A (tampão fosfato pH 6,9 a 50 mM, Cloreto de magnésio a 3 mM, Surfactante e Estabilizador) e misturou-se, para a preparação da solução reactiva B, dissolveu-se o reagente B (ACOD a 6,6 kU/L e POD a 7,5 kU/L) em 20 mL de solvente B (MEHA a

1,2 mM e Surfactante) e agitou-se bem. Os standards foram preparados por duplicado na placa, e são os seguintes:

1. Standard 1 a 1,0 mM - 50 μ L de Standard 1 (NEFA standard, ácido oléico 282 mg/dL)
2. Standard 2 a 0,5 mM - 50 μ L de standard 1 + 50 μ L de água destilada
3. Standard 3 a 0,25 mM - 50 μ L de standard 2 + 50 μ L de água destilada
4. Standard 4 a 0,125 mM - 50 μ L de standard 3 + 50 μ L de água destilada
5. Standard 5 a 0,0625 mM - 50 μ L de standard 4 + 50 μ L de água destilada
6. Standard 6 a 0,03125 mM - 50 μ L de standard 5 + 50 μ L de água destilada

Na microplaca repartiram-se 20 μ L de amostra, standards e água destilada (branco) por duplicado. A estes poços adicionaram-se 60 μ L de solução reactiva A. A placa foi selada com parafilme (Parafilm "M". Laboratory film American CanTM. Chicago, IL 60631) e incubada a 25°C, durante 15 minutos, com movimento oscilatório e na obscuridade. Seguidamente à incubação, adicionou-se a cada poço da microplaca 120 μ L de solução reactiva B, voltou-se a selar com parafilme e procedeu-se à incubação nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, a absorvância foi medida usando o comprimento de onda de 550 nm como referência. Utilizou-se um leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winoosk, VT, USA) controlado pelo software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NY).

2.5.2. Análise metabólica a nível hepático e muscular

No sentido de se analisarem os parâmetros metabólicos (glucogénio, aminoácidos livres totais, glucose, lactato e triglicéridos) a nível tecidual, foi necessário efectuar homogeneizados dos tecidos.

A) Procedimento de homogenização

Pesar uma porção de tecido, introduzir-la em tubos de propileno e adicionar um volume de ácido perclórico (composto por 96 mL de água miliQ + 4 mL PCA 0,6 N) em microlitros igual ao produto da multiplicação do peso do tecido (em gramas) por 7500 obtendo um factor de diluição 1/15 (m/v). O ácido perclórico desproteinizará a amostra, facilitando assim a sua homogenização. Sonicar durante 30 segundos num sonicador (Ultra-Turrax, T-25 basic, IKA-Werke) mantendo as amostras no frio. Adicionar

posteriormente um volume de solução de bicarbonato de potássio (composto por 100 mL de água miliQ + 10,01 g de KHCO_3) igual ao volume do ácido perclórico adicionado. Centrifugar os tubos de propileno a 10.000-13.000 G, durante 30 minutos a 4°C, o modelo de centrífuga usado foi o eppendorf 5810 R. Distribuir o sobrenadante em tubos eppendorf de 1,5 mL e guardar a -80°C até à sua posterior análise.

B) Glucogénio

A técnica tem como princípio a hidrólise do glucogénio em glucose por acção da aminoglucosidase (AGS) de acordo com o método Keppler e Decker (1974). A glucose produzida é determinada mediante o kit comercial Spinreact (cod. 1001200) (Stein, 1963), adaptado à microplaca de 96 poços (ver 2.5.1. A) glucose). O kit produz uma reacção aparecendo um composto cromogénico, o qual é directamente proporcional à quantidade de glucogénio presente na amostra.

Para avaliar este parâmetro centrifugaram-se as amostras homogeneizadas (diluídas 1:15) a 10.000-13.000 G, durante 3 minutos e retirou-se o sobrenadante. Prepararam-se duas soluções de incubação, cada uma delas composta por 240 μL de ácido acético, 0,81 g de acetato de sódio (trihidratado) e 50ml de água miliQ. Numa das soluções adicionou-se amiloglucosidase (AGS, Sigma A7420) a 0,7451 unidades de AGS/ μg de tecido. Prepararam-se dois conjuntos de tubos, num conjunto adicionou-se 200 μL de solução de incubação com AGS, noutra 200 μL de solução de incubação sem AGS e 100 μL de amostra em ambos os conjuntos, para a análise do músculo. Para o fígado, adicionou-se 1 mL de cada solução incubadora para cada conjunto de tubos e 100 μL de amostra, sendo necessário uma diluição prévia da amostra de 1:30. Colocaram-se os tubos numa incubadora com agitação, durante 2 horas, a 40°C. Paralelamente, preparou-se a curva de calibração da glucose, de igual forma ao protocolo de determinação de glucose no plasma, mas utilizando 50 μL de amostra. Numa placa de 96 poços, colocou-se 50 μL de amostra + 250 μL de reagente spinreact. Incubou-se a 37°C, durante 5 minutos e leu-se a absorvência a 340 nm. Usou-se a recta de calibração de glucose para estimar o glucogénio em mg de glucose, em forma de glucogénio por gramas de peso fresco de tecido.

C) Aminoácidos livres totais

A determinação dos aminoácidos totais livres realiza-se por análise colorimétrica com ninhidrina (Sigma N7285). A partir das amostras homogeneizadas (diluídas 1:15),

centrifugou-se as amostras a 10.000-13.000 G, durante 3 minutos. Diluiu-se o sobrenadante 50 vezes, diluindo 20 µL de sobrenadante em 980 µL de água miliQ, obtendo-se assim uma diluição final de 1:750. Numa placa de 96 poços adicionou-se: 140 µL de amostra diluída, 80 µL de acetato de cianeto e 80 µL de nihidrina (volume final de 300 µL/poço). Incubou-se a 100°C, durante 15 minutos em seco e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Mediu-se 590 nm utilizando o leitor de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winooski; VT, USA) controlado pelo software DeltaSoft 3 para a Macintosh (BioMetallics, Inc, NY), usando o comprimento de onda simples de 590 nm.

Para a determinação de aminoácidos livres totais, construiu-se uma recta padrão de L-alanina (Sigma A7469-25G) que segue a seguinte equação: $Abs = a [AA \text{ totais}] + b$.

As concentrações para a recta padrão são as seguintes:

1. Dissolução de L-alanina 0,01 M (50 mL água miliQ + 0,0445 g L-alanina)
2. Dissolução de L-alanina 0,25 mM (125 µL solução mãe + 4875 µL água miliQ)
3. Dissolução L-alanina 0,125 mM (2500 µL solução 2 + 2500 µL água miliQ)
4. Dissolução L-alanina 0,0625 mM (2500 µL solução 3 + 2500 µL água miliQ)
5. Dissolução L-alanina 0,03125 mM (2500 µL solução 4 + 2500 µL água miliQ)
6. Dissolução L-alanina 0,01563 mM (2500 µL solução 5 + 2500 µL água miliQ)
7. Dissolução L-alanina 0,00781 mM (2500 µL solução 6 + 2500 µL água miliQ)

Para expressar os resultados por µmoles de aa x g tecido⁻¹, utilizou-se a recta obtida e multiplicaram-se os resultados obtidos por 750 (factores de diluição).

D) Glucose, lactato e triglicéridos

Após a homogeneização, centrifugaram-se as amostras a 10.000-13.000 G, durante 3 minutos, a 4°C e retirou-se o sobrenadante. Os parâmetros metabólicos foram medidos consoante a metodologia descrita anteriormente na secção 2.5.1.

2.5.3. Análise de estatística

Os dados dos parâmetros zootécnicos (taxa específica de crescimento SGR, índice de transformação do alimento FCR, índice hepatossomático HSI e índice viscerossomático VSI) da composição química corporal (humidade, proteínas, lípidos, cinzas e energia) e dos parâmetros metabólicos a nível plasmático (glucose, lactato, proteínas, triglicéridos

e ácidos gordos); hepático (lactato, glucose, glucogénio, triglicéridos e aminoácidos) e muscular (glucose, glucogénio, lactato, triglicéridos e aminoácidos) foram submetidos ao teste one-way ANOVA usando o programa SPSS. As comparações *Post-hoc* (Controlo, UL-5, UL-15, UL-25, GR-5, GR-15 e GR-25) foram feitas mediante o teste *Tukey*, os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros zootécnicos

A Tabela 4 inclui os resultados da evolução de parâmetros zootécnicos das dietas alimentares. Em geral, para o peso final, excepto no caso de UL-15 e UL-25, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos. Os peixes obtiveram um peso significativamente mais elevado, quando alimentados com UL-25 ($p < 0,05$) relativamente aos outros grupos. O comprimento é um parâmetro que apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (resultados não mostrados). Na percentagem de peso ganho (WG) comprova-se uma tendência similar ao descrito para o peso final, embora sem mostrar diferenças estatisticamente significativas. A taxa específica de crescimento (SGR) não apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), apresentando valores médios mais elevados no caso de UL-25, comparativamente com os outros tratamentos. O índice de transformação do alimento (FCR) foi significativamente mais elevado para o tratamento GR-25 ($p < 0,05$), curiosamente o grupo alimentado com o tratamento UL-25 não evidenciou um aumento significativo. Os restantes tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles. Para o índice hepatossomático (HSI) encontrou-se, nos tratamentos com algas, uma redução estatisticamente significativa, conforme se aumenta o nível de inclusão de alga na dieta. Para o índice viscerossomático (VSI), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4. Crescimento, índices de transformação do alimento e índices somáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.

	Tratamento						
	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Peso inicial (g)	13,9±0,2	13,6±0,5	13,9±0,8	14,7±0,3	13,3±0,1	13,9±0,3	14,9±0,1
Peso final (g)	28,7±0,3 ^{ab}	26,6±0,3 ^{ab}	25,6±2,3 ^b	31,2±1,1 ^a	26,6±0,3 ^{ab}	27,7±0,1 ^{ab}	27,8±1,2 ^{ab}
WG (%)	106,2±0,1	95,9±9,5	83,9±6,4	112,3±11,4	99,0±20,1	99,2±5,3	85,1±8,1
SGR (%)	1,13±0,01	1,05±0,08	0,95±0,05	1,17±0,08	1,07±0,16	1,08±0,04	0,96±0,07
FCR	1,60±0,06 ^a	1,73±0,21 ^{ab}	1,90±0,05 ^{ab}	1,81±0,28 ^{ab}	1,99±0,51 ^{ab}	1,87±0,10 ^{ab}	2,13±0,18 ^b
HSI (%)	1,79±0,24 ^a	1,57±0,18 ^b	1,34±0,26 ^c	1,17±0,17 ^d	1,55±0,20 ^b	1,33±0,17 ^c	1,16±0,18 ^d
VSI (%)	6,79±0,94	6,35±1,21	6,34±0,63	5,88±0,83	6,72±1,13	6,44±0,78	6,13±0,62

Valores são a média por tratamento (n=30) ± erro médio padrão. Na mesma linha, os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$), WG – incremento de peso (%); SGR – taxa específica de crescimento (% dia⁻¹); FCR – Índice de transformação do alimento; HSI – índice hepatossomático (%); VSI – índice viscerossomático (%).

3.2. Composição química corporal dos peixes

A composição química corporal dos peixes, alimentados com as dietas inicial, controlo e experimentais está presente na Tabela 5. De forma geral, todos os peixes independentemente do regime alimentar, mostraram um conteúdo similar de humidade, proteínas e cinzas. Porém, o conteúdo lipídico apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. As dietas suplementadas com *Ulva* comprovaram uma diminuição do valor médio do conteúdo gordo do corpo eviscerado, em comparação com o valor da dieta controlo, sendo este significativamente mais baixo para UL-25 ($p < 0,05$). No caso das dietas suplementadas com *Gracilaria* não foram encontradas diferenças com o controlo, excepto no tratamento com GR-25, que apresentou um valor médio menor.

Tabela 5. Composição corporal (% , seca) dos peixes alimentados com as dietas inicial, controlo e experimentais.

Composição química	Inicial	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Humidade (%)	69,5 ± 0,7	68,5 ± 0,8	68,3 ± 1,1	68,4 ± 1,4	68,5 ± 0,8	68,8 ± 1,3	68,2 ± 1,1	69,5 ± 0,9
Proteína (% MS)	55,2 ± 0,2	54,3 ± 1,5	54,2 ± 1,3	53,9 ± 1,4	53 ± 1,8	55,6 ± 0,6	54,1 ± 1,4	55,5 ± 0,5
Lípidos (% MS)	26,5 ± 1,6	27,5 ± 1,3 ^a	24,3 ± 1,6 ^{ab}	24,2 ± 0,9 ^{ab}	21,3 ± 0,8 ^b	28,5 ± 2,3 ^a	27,6 ± 1,7 ^a	24,8 ± 1,1 ^{ab}
Cinzas (% MS)	13,8 ± 0,4	12,8 ± 0,6	13,6 ± 0,1	12,5 ± 0,4	12,6 ± 0,3	12,3 ± 0,2	13,1 ± 0,5	12,2 ± 0,3
Energia (KJ g⁻¹) *	19,2	19,4	18,2	18,1	16,9	20,0	19,5	18,6

Valores são a média por tratamento (n=30) ± erro médio padrão. Na mesma linha, os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

*A energia bruta foi calculada a partir do conteúdo médio da composição de proteínas, lípidos e hidratos de carbono das amostras.

3.3. Parâmetros metabólicos a nível plasmático

Os parâmetros plasmáticos analisados estão apresentados na Tabela 6. Estes parâmetros (glucose, lactato, proteínas, triglicéridos e ácidos gordos) encontram-se no plasma em concentrações normais (Laiz-Carrion *et al.*, 2003; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003,2005) As proteínas, triglicéridos e ácidos gordos não apresentaram alterações no plasma. No entanto, a glucose e o lactato evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ao longo dos tratamentos, valores apresentados em formato gráfico (Figura 4 e 5, respectivamente).

As proteínas plasmáticas apresentaram variações nos seus valores, sem se observar uma tendência definida. O valor médio de ácidos gordos plasmáticos aumentou em cada tratamento, embora não se observam diferenças estatisticamente significativas nas dietas experimentais (UL-5, UL-15, GR-5, GR-15 e GR-25). Os valores de triglicéridos plasmáticos (UL-5, UL-25, GR-5, GR-15 e GR-25) apresentaram uma situação similar.

Tabela 6. Parâmetros plasmáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.

	Tratamento						
	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Glucose (mM)	3,39 ± 0,15 ^a	2,79 ± 0,21 ^{ab}	2,42 ± 0,16 ^b	2,52 ± 0,20 ^b	3,04 ± 0,15 ^{ab}	2,80 ± 0,34 ^{ab}	2,39 ± 0,09 ^b
Lactato (mM)	0,75 ± 0,13 ^{ab}	0,62 ± 0,08 ^b	0,57 ± 0,12 ^b	0,85 ± 0,06 ^{ac}	0,97 ± 0,11 ^c	0,77 ± 0,08 ^{ac}	1,02 ± 0,08 ^c
Proteínas (g/dL)	33,03 ± 1,38	31,70 ± 0,76	37,04 ± 1,31	33,45 ± 1,94	36,75 ± 1,49	35,26 ± 1,35	34,21 ± 2,33
Triglicéridos (mM)	2,17 ± 0,17	2,36 ± 0,27	2,06 ± 0,19	2,87 ± 0,64	2,21 ± 0,14	2,25 ± 0,26	2,87 ± 0,38
Ácidos gordos (mM)	0,28 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,24	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,02

Valores são a média por tratamento (n=10) ± erro médio padrão. Na mesma linha, os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos (p < 0,05).

Por observação da Figura 4, verificou-se que tanto os grupos alimentados com *Ulva* e *Gracilaria* apresentaram valores de glucose plasmática com diferenças significativas, comparativamente ao grupo controlo ($p < 0,05$). Contudo, os níveis de glucose não apresentaram alterações significativas entre os grupos de peixes alimentados com algas. Os valores de glucose plasmática diminuem estatisticamente nos grupos de peixes alimentados com UL-15, UL-25 e GR-25. Dos quais, os dois últimos grupos de peixes obtiveram o melhor crescimento e o melhor índice de transformação do alimento, respectivamente. No entanto, a glucose aumenta ligeiramente nos peixes alimentados com dietas com menor proporção de alga (UL-5, GR-5 e GR-15).

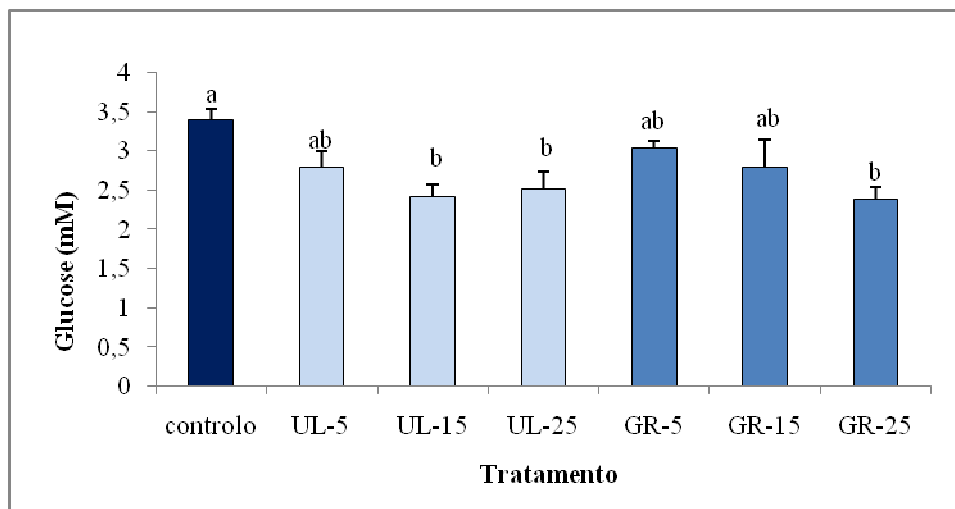


Figura 4. Representação gráfica dos valores médios de glucose plasmática de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais. Valores são a média por tratamento ($n=10$) \pm erro médio padrão. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Como se verifica na Figura 5, os valores de lactato no plasma não evidenciam uma tendência definida. Os valores de lactato plasmático diminuem significativamente nos peixes alimentados com UL-5 e UL-15, comparativamente com UL-25 e com o tratamento com *Gracilaria*. Apenas os peixes alimentados com GR-5 e GR-25, evidenciaram valores de lactato no plasma significativamente mais elevados, do que o grupo controlo.

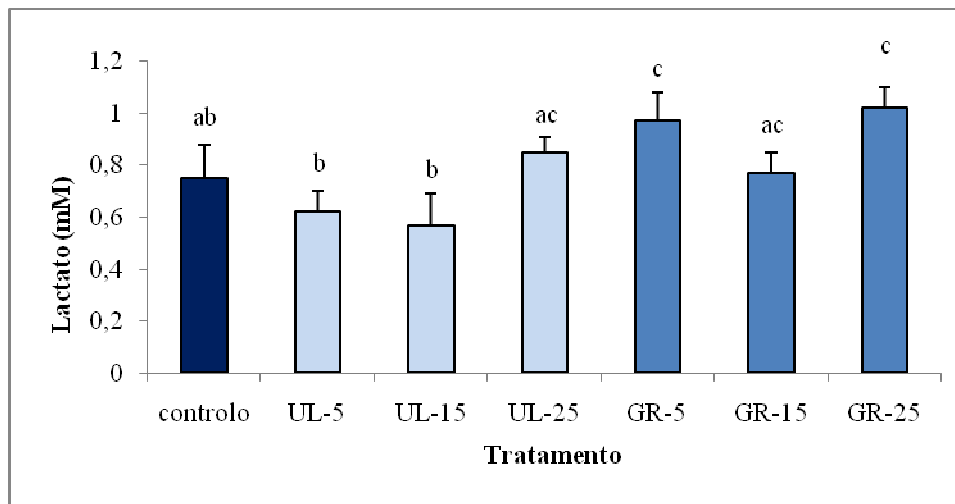


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios de lactato plasmático de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais. Valores são a média por tratamento (n=10) \pm erro médio padrão. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

3.4. Parâmetros metabólicos a nível hepático

Os parâmetros hepáticos analisados (glucogénio, glucose, triglicéridos e aminoácidos) encontram-se na Tabela 7. A concentração de lactato não foi determinada devido à sua baixa concentração no fígado (Laiz-Carrion *et al.*, 2003; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003,2005). A concentração de glucogénio e glucose hepática apresentaram variações nos seus valores, sem ser observada uma tendência definida. No entanto, os valores de glucose foram mais elevados nos exemplares alimentados com dietas experimentais, mas sem apresentar diferenças estatisticamente diferentes. Os valores de triglicéridos apresentaram uma tendência crescente, à medida que aumentava a concentração das algas *Ulva* e *Gracilaria* na dieta, no entanto as diferenças não foram significativamente diferentes. Os aminoácidos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), entre os tratamentos, como se observa na Figura 6.

Tabela 7. Parâmetros hepáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.

	Tratamento						
	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Glucógeno (mg/g pf)	15,67 ± 1,06	16,18 ± 1,40	14,18 ± 0,69	17,36 ± 2,66	15,58 ± 1,79	11,50 ± 1,52	16,18 ± 2,04
Glucose (mg/ g pf)	14,25 ± 0,52	17,18 ± 1,07	16,85 ± 0,27	17,23 ± 0,90	17,19 ± 1,19	16,22 ± 0,20	16,87 ± 0,85
Triglicéridos (mg/g pf)	4,20 ± 0,23	4,23 ± 0,43	5,04 ± 0,88	5,57 ± 0,65	4,57 ± 0,20	6,38 ± 0,83	6,02 ± 0,57
Aminoácidos (µM/g pf)	64,2 ± 5,6 ^{ab}	54,4 ± 5,0 ^b	58,7 ± 5,4 ^b	63,7 ± 7,8 ^{ab}	64,8 ± 11,2 ^{ab}	92,3 ± 7,2 ^a	71,9 ± 6,0 ^{ab}

Valores são a média por tratamento (n=10) ± erro médio padrão. Na mesma linha, os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Os peixes alimentados com algas *Ulva* e *Gracilaria* não apresentaram alterações significativas nos valores médios de aminoácidos, comparativamente com os alimentados com a dieta controlo (Figura 6). A dieta suplementada com a alga *Gracilaria* aumentou ligeiramente os valores de aminoácidos, relativamente ao controlo, enquanto que, a *Ulva* diminuiu estes. O conteúdo em aminoácidos mostrou uma diminuição significativa nos peixes alimentados com as dietas experimentais UL-5 e UL-15, relativamente aos alimentados com GR-15 ($p < 0,05$).

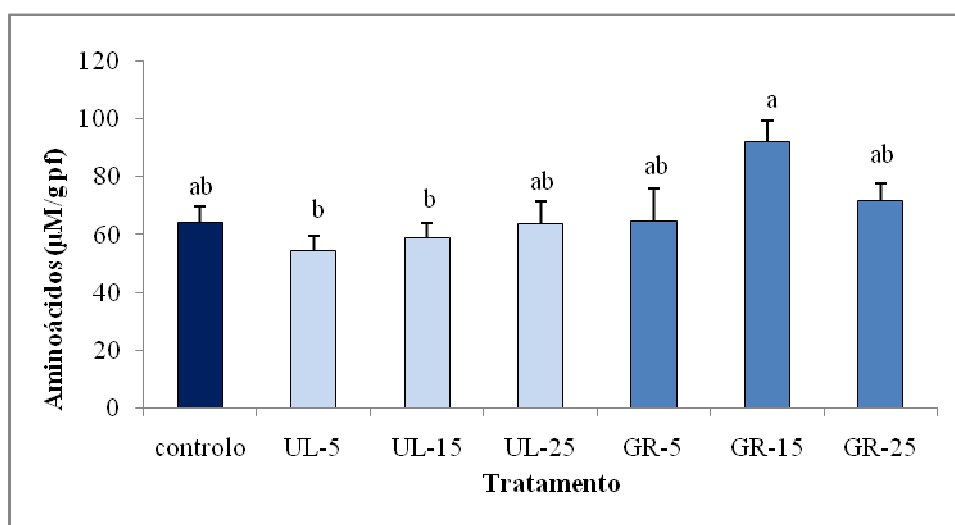


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios de aminoácidos hepáticos de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais. Valores são a média por tratamento ($n=10$) \pm erro médio padrão. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

3.5. Parâmetros metabólicos a nível muscular

Os parâmetros musculares analisados (aminoácidos, lactato e triglicéridos) estão apresentados na Tabela 8. A concentração de glucose e glucogénio não foi determinada pelo facto de estas apresentarem valores muito baixos no músculo (Laiz-Carrion *et al.*, 2003; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003,2005; Polakof *et al.*, 2006) Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos para o conteúdo em aminoácidos e triglicéridos. Contudo, os valores de lactato apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), ao longo dos tratamentos, como se evidencia na Figura 7.

Tabela 8. Parâmetros musculares de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais.

	Tratamento						
	Controlo	UL-5	UL-15	UL-25	GR-5	GR-15	GR-25
Aminoácidos ($\mu\text{M/g pf}$)	70,0 \pm 3,27	69,82 \pm 4,91	73,68 \pm 3,94	75,75 \pm 4,92	67,67 \pm 5,86	69,40 \pm 6,29	68,00 \pm 3,65
Lactato (mg/g pf)	2,83 \pm 0,19 ^a	2,80 \pm 0,27 ^a	1,93 \pm 0,24 ^b	1,85 \pm 0,22 ^b	2,67 \pm 0,25 ^{ab}	1,55 \pm 0,09 ^b	1,87 \pm 0,13 ^b
Triglicéridos (mg/g pf)	2,08 \pm 0,47	2,27 \pm 0,49	1,93 \pm 0,39	1,82 \pm 0,32	1,55 \pm 0,30	1,78 \pm 0,24	1,88 \pm 0,25

Valores são a média por tratamento (n=10) \pm erro médio padrão. Na mesma linha, os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Por observação da Figura 7, o lactato apresentou uma redução significativa no músculo dos peixes alimentados com UL-15 e UL-25, relativamente aos peixes alimentados com UL-5 e com a dieta controlo. Da mesma forma, os peixes alimentados com GR-15 e GR-25 obtiveram valores de lactato significativamente mais baixos, em relação aos mesmos grupos de peixes. O conteúdo de lactato no músculo da dourada tende a diminuir, à medida que aumenta a concentração de alga *Ulva* na dieta (UL-5 > UL-15 > UL-25). O mesmo se observou com a alga *Gracilaria*, embora as diferenças não tenham sido significativas.

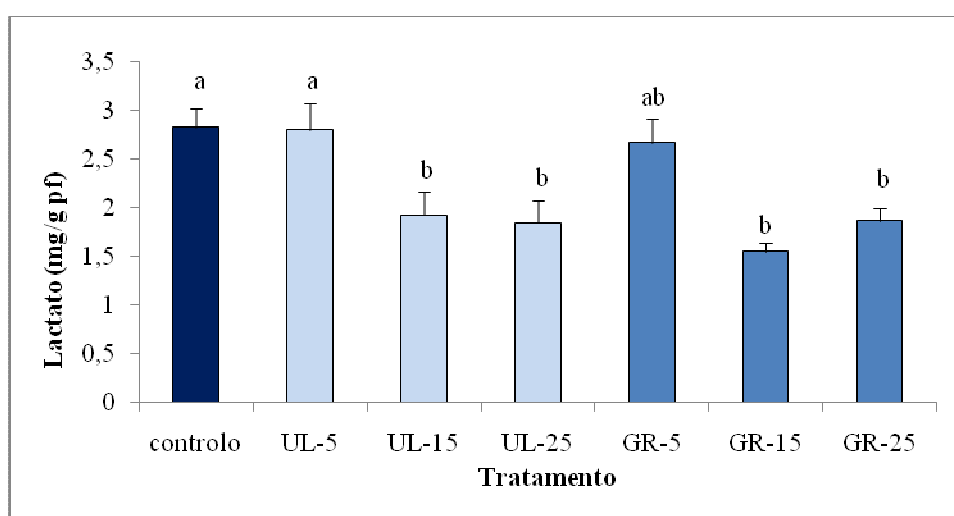


Figura 7. Representação gráfica dos valores médios de lactato muscular de douradas jovens alimentadas com as dietas experimentais. Valores são a média por tratamento (n=10) ± erro médio padrão. Os valores com diferentes expoentes apresentam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Mediante a análise dos parâmetros zootécnicos, as douradas alimentadas com a dieta com 25% de incorporação de *Ulva*, obtiveram um aumento no seu peso e um crescimento maior, no entanto sem diferenças significativas. Os peixes alimentados com a dieta que contém a alga *Gracilaria* a 25%, tiveram um melhor aproveitamento do alimento, verificado pelo aumento significativo do índice de transformação do alimento (FCR), relativamente ao controlo ($p < 0,05$). No entanto, não se verificou uma alteração na taxa específica de crescimento. O índice hepatossomático (HSI) foi reduzido significativamente, à medida que o nível de inclusão de alga na dieta aumentava ($p < 0,05$), comparativamente com o controlo. Para o índice viscerossomático (VSI)

observou-se a mesma tendência mas sem diferenças significativas. No geral, a composição química corporal das douradas não variou muito, excepto o conteúdo lipídico que apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), comparativamente com o controlo. Verificando-se uma diminuição do conteúdo lipídico do corpo eviscerado, dos peixes alimentados com dietas suplementadas com *Ulva*, sendo este significativamente mais baixo para UL-25.

O plasma foi a amostra biológica que sofreu mais alterações com a incorporação de alga na dieta. A glucose diminuiu significativamente nos grupos de peixes alimentados com *Ulva* a 15 e 25% e *Gracilaria* a 25% comparativamente com a dieta controlo ($p < 0,05$). As dietas suplementadas com *Gracilaria* a 5 e 25% aumentaram significativamente o lactato no plasma, em relação à dieta controlo ($p < 0,05$). A nível hepático, a dieta suplementada com a alga *Gracilaria* aumentou ligeiramente os valores de aminoácidos, relativamente ao controlo, enquanto que, a alga *Ulva* diminuiu-os. No músculo, o conteúdo de lactato tende a diminuir, à medida que a concentração de alga *Ulva* na dieta aumenta (UL-5 > UL-15 > UL-25), sendo significativamente menor, que o controlo, para *Ulva* a 25% ($p < 0,05$).

As dietas alimentares suplementadas com *Ulva* a 25% e *Gracilaria* a 25% conduziram a um maior proporção de alterações significativas, nos parâmetros zootécnicos, na composição do corpo eviscerado, no plasma, fígado e músculo.

4. DISCUSSÃO

A biotecnologia é uma ferramenta muito poderosa utilizada na produção animal, nomeadamente na produção de peixes. Esta pode ser aplicada na melhoria da genética, alimentação, crescimento, reprodução e saúde dos peixes (www.agwest.sk.ca).

A alimentação tem vindo a ser de grande interesse para estudo, tornando-se o componente com grande importância na produção de peixes. As principais espécies de peixes produzidas são carnívoras, devido ao seu elevado valor comercial, como a dourada. Estas espécies utilizam pobremente os hidratos de carbono na digestão e no metabolismo, não regulam a temperatura e requerem dietas ricas em proteínas, como a farinha de peixe (Weatherley e Gill, 1987, Wilson, 1994; Hemre *et al.*, 2002; Stone, 2003).

Actualmente, verifica-se uma grande procura de farinhas e óleos de peixe, com tendência a aumentar (Mundheim *et al.*, 2004). De facto, a proporção de farinha de peixe destinado a aquacultura passou de 10% em 1988 para 17% em 1994 (Naylor *et al.*, 2000) e alcançou 35% no ano 2003, prevendo-se que atinja 48% em 2010. Deste modo, esta actividade não pode estar unicamente dependente das reservas finitas de peixe, principalmente pelo facto de muitas delas se encontrarem totalmente exploradas, sobrexploradas e esgotadas (NRC, 1999; FAO, 2004). O preço da farinha de peixe é também um factor limitante. Este tem vindo a aumentar ao longo dos anos e tudo indica que continuará, se a procura destes produtos prosseguir a aumentar (Barlow, 2000).

Neste contexto, a identificação e o uso de fontes proteicas alternativas, são necessários para suportar o crescimento desta actividade. Assim, para que seja possível um desenvolvimento sustentável de produção de peixes, é útil que exista um conhecimento básico sobre as consequências fisiológicas e metabólicas, provocadas pela substituição parcial ou total de farinha de peixe por fontes proteicas alternativas. Neste sentido, as algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* têm vindo a ser estudadas como possíveis fontes proteicas alternativas, tendo a *Ulva rigida* uma grande relevância que tem vindo a ser demonstrada ao longo dos anos (Wassef *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2006; Diler *et al.*, 2007).

Parâmetros zootécnicos- Crescimento

No presente estudo, a crescente incorporação das algas *Ulva rigida* e *Gracilaria sp.* nas dietas alimentares, não afectou significativamente o crescimento da dourada ($p > 0,05$). Estes resultados concordam com Kissil *et al.* (1992) que do mesmo modo, não observou um efeito significativo da alga *Ulva* no crescimento deste peixe. Trabalhos com outras

plantas, de Regost *et al.*, (1999) em *Psetta maxima* com glúten de milho e de Pereira e Oliva-Teles (2002) em dourada com sementes de ervilha levaram a resultados semelhantes. No entanto é de salientar, que o grupo de peixes alimentados com *Ulva rigida* a 25% evidenciou um crescimento ligeiramente superior ao grupo controlo, que é reflectido na percentagem de peso ganho e na taxa específica de crescimento (Tabela 4). Estudos anteriores com *Dicentrarchus labrax* mostraram que a incorporação a 10% de *Gracilaria bursa-pastoris*, na dieta alimentar, resultou num aumento do crescimento e do peso ganho, mas o mesmo nível de *Ulva rigida* e de *Gracilaria cornea* apresentaram valores mais baixos (Valente *et al.*, 2006). Noutro estudo, Wassef *et al.* (2001) avaliou a influência da alga *Ulva sp.* no crescimento e na utilização do alimento do *Mugil cephalus* e concluiu que, a alga afectou significativamente o seu crescimento e o nível óptimo de incorporação da alga na dieta foi de 20%. Por sua vez, Diler *et al.* (2007) demonstrou que o uso da macroalga *Ulva rigida*, numa percentagem baixa (5%), como ingrediente da dieta do peixe *Cyprinus carpio* conduziu ao melhor crescimento deste. Por comparação com estes estudos verifica-se que, a resposta do peixe à incorporação de algas ou outras plantas na dieta depende da espécie de peixe, da proporção e do valor nutritivo das diferentes espécies de plantas na dieta. A ausência de diferenças significativas no crescimento, entre os diferentes tratamentos, indica que, durante o período experimental (45 dias), os exemplares de *S. auratus* receberam os nutrientes necessários e que é possível a substituição parcial de farinha de peixe por farinha de algas, durante a fase de alimentação de *S. auratus*.

Parâmetros zootécnicos- Índice de transformação do alimento

O índice de transformação do alimento foi melhor no grupo de peixes alimentados com algas, comparativamente com o grupo controlo, nomeadamente com *Gracilaria* a 25% ($p < 0,05$), havendo assim um melhor aproveitamento do alimento consumido (Tabela 4). No entanto, não foram fornecidos os nutrientes necessários para o crescimento dos peixes alimentados com esta dieta, pelo facto de não se verificar alterações na taxa específica de crescimento. Similarmente, Azaza *et al.* (2008) estudou o crescimento do *Oreochromis niloticus* alimentado com níveis graduais de alga *Ulva rigida* e obteve um melhor índice de transformação do alimento nos animais alimentados com as algas, do que com o controlo. No entanto, outro estudo demonstrou que a incorporação da alga *Spirulina plantesis* na dieta do *Cyprinus carpio* diminui este índice, mas sem diferenças significativas (Nandeeshha *et al.*, 1998). Pereira e Oliva-Teles (2002) demonstraram que

a incorporação de sementes de ervilha na dieta da dourada não tem influência no índice de transformação do alimento. De novo, estes resultados são específicos de espécie para espécie, pois indicam que os peixes aproveitam melhor a dieta conforme a sua espécie e a espécie da alga ou planta incorporada na dieta.

Composição química corporal

A composição química corporal da dourada não apresentou uma relação clara com o conteúdo de alga na dieta alimentar. Apenas o teor em lípidos foi afectado, tendo sido diminuído significativamente, à medida que a incorporação do nível de *Ulva* na dieta aumentava, em comparação com a dieta controlo (Tabela 5). O teor de lípidos foi significativamente mais baixo para os peixes alimentados com *Ulva* a 25% ($p < 0,05$). A incorporação de plantas nas dietas tem efeitos controversos na composição química corporal dos peixes. Resultados semelhantes foram obtidos por Azaza *et al.* (2008), que observou uma redução significativa na composição lipídica do corpo eviscerado do *Oreochromis niloticus*, após ter sido alimentado com dietas contendo níveis graduais de *Ulva rigida*. Contudo, Valente *et al.* (2006) avaliou a inclusão de três algas *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* e *Gracilaria cornea* como ingredientes das dietas do *Dicentrarchus labrax* e demonstrou que não existem variações significativas, entre os tratamentos, na composição lipídica deste peixe. Pereira e Oliva-Teles (2003) relataram que o conteúdo lipídico da dourada aumentou com a crescente inclusão de glúten de milho nas dietas. Nengas *et al.* (1996) descobriu que não existem diferenças na composição do corpo eviscerado da dourada pela substituição de dieta de peixe por dieta de plantas (feijão). Robaina *et al.* (1995) observou que o conteúdo lipídico e protéico do corpo eviscerado da dourada foram significativamente afectados pelo tipo e nível de incorporação da planta (feijão e glúten de tremçoço) usados nas dietas. Kissil *et al.* (2000) não obteve diferenças significativas no teor de proteínas, no entanto os teores em lípidos e energia foram significativamente baixos na dourada alimentada com dietas com elevada incorporação de plantas (soja ou concentrados protéicos de colza).

Parâmetros zootécnicos- Índices somáticos

A redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos índices hepatossomáticos (Tabela 4), verificada com o aumento do nível de inclusão de alga na dieta, pode ser explicada pela redução da deposição de lípidos, que consequentemente diminui o tamanho do fígado. Os índices viscerossomáticos não apresentaram diferenças

significativas ($p > 0,05$), havendo apenas uma ligeira diminuição comparativamente ao tratamento controlo (Tabela 4). Este facto está relacionado com a diminuição do peso do fígado, relevado pelo índice hepatossomático ou pela diminuição dos níveis de gordura visceral (observada durante a amostragem). Estes resultados sugerem que os exemplares de *S. auratus* estudados utilizaram as dietas suplementadas com algas de forma mais eficaz comparativamente à dieta controlo, diminuindo assim a acumulação de gorduras tanto no tracto intestinal como no músculo. Possivelmente, a dieta controlo induz maior acumulação de gorduras no peixe, do que uma dieta suplementada com algas. Em termos comerciais, a deposição excessiva de lípidos no peixe pode ser indesejável, conduzindo a problemas de armazenamento (autooxidação), marketing (sabor do peixe) e saúde humana (muitos compostos químicos tóxicos são dissolvidos e acumulados na fracção lipídica do peixe) (Weatherley e Gill, 1987), sugerindo assim, que a dieta controlo, ou seja a dieta que contém farinha de peixe, pode ser desfavorável comparativamente com a dieta suplementada com algas.

Metabolismo – Parâmetros Plasmáticos

Pela análise do plasma das douradas, verificou-se que os níveis de glucose e lactato plasmático foram influenciados pela incorporação de alga na dieta (Tabela 6). Com o aumento da incorporação de alga na dieta, observou-se uma tendência decrescente dos níveis de glucose no plasma, sendo significativamente menores nos grupos alimentados com *Ulva* a 15 e 25% e *Gracilaria* a 25% ($p < 0,05$), comparativamente com o controlo (Figura 4). Esta tendência pode ser explicada pela redução da quantidade de hidratos de carbono verificada nas dietas, à medida que o nível de incorporação de alga aumenta (Tabela 3). Os resultados evidenciam uma hipoglicemia, resultante do aumento da glucogénese (que confere o armazenamento de glucose em glucogénio, especialmente no fígado), da aceleração da lipogénese e do requerimento de energia pela glucólise, existindo assim uma diminuição da gluconeogénese (Hemre *et al.*, 2002). A aceleração da lipogénese e a influência da gluconeogénese indicam que a “glucose loading” pode conduzir a mudanças em todo o metabolismo energético do peixe (Hemre *et al.*, 2002). Relativamente ao lactato, não existe um padrão claro e tendo em conta que este pode variar com o processo de amostragem, os resultados não são considerados significativos de um ponto de vista bioquímico.

No geral, observou-se que os parâmetros plasmáticos das douradas alimentadas com algas não variam significativamente, indicando que o “status metabólico” destes animais não foi alterado pela substituição de farinha de peixe por farinha de algas.

Metabolismo – Parâmetros Hepáticos

O fígado, que tem um papel essencial na actividade metabólica, no armazenamento e na distribuição de reservas de energia (Collins e Anderson, 1997) não evidenciou alterações na sua composição quando os peixes foram alimentados com as dietas suplementadas com as algas *Gracilaria* e *Ulva rigida*, com excepção nos aminoácidos (Tabela 7). A dieta suplementada com a alga *Gracilaria* aumentou ligeiramente os valores de aminoácidos, relativamente ao controlo, enquanto que, a alga *Ulva* diminuiu-os (Figura 6). A diminuição da concentração de aminoácidos no fígado pode sugerir que estes foram utilizados como fonte de energia neste tecido, ou foram utilizados para a síntese de glucose através da gluconeogénese, a glucose por sua vez se for libertada para a corrente sanguínea poderá ser oxidada a dióxido de carbono em todos os órgãos (Mommensen e Plisetskaya, 1991). Relativamente ao aumento dos valores de aminoácidos não foi encontrada bibliografia. A nível hepático, não foram observadas grandes alterações metabólicas nos peixes alimentados com farinha de algas, comparativamente com os peixes alimentados com farinha de peixe.

Metabolismo – Parâmetros Musculares

A análise metabólica do músculo da dourada relevou apenas, uma diminuição significativa do teor de lactato ($p < 0,05$), à medida que a incorporação da alga *Ulva* nas dietas aumenta (Tabela 8). O lactato é um metabolito produzido durante a glucólise e a glucogenólise no músculo (Suarez e Mommsem, 1987). A diminuição do teor de lactato no músculo da dourada pode ser atribuída ao movimento do ácido láctico produzido neste tecido para a corrente sanguínea (Black *et al.*, 1962). Os parâmetros metabólicos estudados a nível muscular, não apresentaram muitas diferenças significativas entre os tratamentos, constatando-se que os exemplares de dourada adaptaram-se à incorporação dos três níveis de algas, sem ser praticamente, afectado o crescimento muscular.

Apreciação Global

A análise de todos os parâmetros avaliados demonstrou que, as algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida*, têm potencial para substituir a farinha de peixe da dieta alimentar da dourada, sem efeitos negativos no crescimento, composição química corporal e parâmetros metabólicos, pelo menos nos níveis de substituição estudados (5, 15 e 25%). A incorporação da *Ulva* a 25% na dieta demonstrou ser a mais eficiente, pois permitiu o melhor crescimento da dourada, substituindo desta forma, a farinha de peixe.

Consequentemente, de um ponto de vista económico, a substituição de farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* é vantajosa, no sentido de existir uma poupança, nos custos referentes à alimentação de peixes em aquacultura, sendo este facto justificado pelo baixo custo da farinha de algas. Deste modo, os objectivos do trabalho experimental foram atingidos, sendo possível e mais vantajoso formular dietas de peixes com uma menor proporção de farinha de peixe.

No entanto, estudos adicionais serão necessários para clarificar os efeitos da dieta suplementada com *Ulva rigida* e *Gracilaria* e o nível óptimo de inclusão de alga na dieta alimentar. Neste sentido, seria pertinente analisar:

- a digestibilidade das dietas (Nandeeshia *et al.*, 1998);
- a actividade enzimática digestiva (Nandeeshia *et al.*, 1998);
- a inclusão de aminoácidos sintéticos e de potenciadores de sabor na dieta (Gomes *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1997; Tacon, 1997);
- os tratamentos para eliminar diferentes factores anti-nutricionais (Gomes *et al.*, 1995; Dias *et al.*, 1997; Tacon, 1997);
- os efeitos no sistema imunológico (Brandsen *et al.*, 2001);
- os efeitos sobre a qualidade do produto final (Brandsen *et al.*, 2001).

5. CONCLUSÃO

- 1) O crescimento dos exemplares de *S. auratus* alimentados com as dietas suplementadas com as macroalgas *Gracilaria sp.* (a 5, 15 e 25%) e *Ulva rigida* (a 5 e 15%) é similar ao dos indivíduos alimentados com a dieta controle.
- 2) A incorporação de 25% da alga *Ulva rigida* na dieta, induz um melhor crescimento em relação ao dos indivíduos alimentados com a dieta controle.
- 3) As algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* não produzem efeitos adversos nos parâmetros metabólicos a nível plasmático, hepático e muscular.
- 4) A substituição da farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria sp.* e *Ulva rigida* pode conduzir a uma redução dos custos de produção das dietas alimentares, como consequência da diminuição do preço do alimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexis M.N., Papaparaskev-Papoutsoglou E. Theochari V. 1985. Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-producted and certain plant by-products. *Aquaculture* 50: 61-73
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 16th edn, vol. I, Cunnif, P. (ed.) Washintong, DC USA, 1234
- Arias A. 1976. Sobre la biologia de la dorada, *Sparus aurata* L., de los esteros de la provincia de Cádiz. *Inv. Pesquera* 40 (1): 201-222
- Arijo S., Balebona C., Martinez-Manzanares E., Morinigo M.A. 2004. Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) to antigens from photobacterium domselae subsp. Piscida. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 65-70
- Azaza M.S., Mensi F., Ksouri J., Dhraief M.N., Brini B., Abdelmouleh A., Kraiem M.M. 2008. Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia. *Journal of Applied Ichthyology*. 24: 202-207
- Bai S.C., Koo J-W., Kim K-W, Kim S-K 2001. Effects of *Chlorella* powder as a feed additive on growth performance in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*. 32: 92-98
- Barlow S. 2000. Fish meal and fish oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds. *The Global Aquaculture Advocate*. 4: 85-88
- Black E.C., Robertson A., Conner K., Lam K.C. e Chiu W.G. 1962. Changes in glycogen, pyruvate and lactate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during and following muscular activity. *Journal of Fisheries Research Board Canada* 19:409-436.
- Blasco J., Fernández-Borrás J., Marimón I., Requena A. 1996. Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *Journal of Comparative Physiology. B*. 165: 534-541
- Brandsen M.P., Carter C.G., Nowak B.F. 2001. Alternative protein sources for farmed salmon. *Feed Mix*. 9: 18-21
- Burel C., Boujard T., Corraze G., Kaushik S.J., Boeuf G., Mol K.A., Van der Geyten S. Kuhn E.R. 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture*. 163: 325-345
- Buschmann A.H., Correa J.A., Westermeier R., Hernández-González M., Norambuena R. 2001. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*. 194: 203-220
- Campos L. 2002. Entender a Bioquímica. 3ª Edição. Escolar Editora. 270
- Canário A.V.M., Bargelloni L., Volckaert F., Houston R.D., Massault C., Guiguen Y. 2008. Genomics Toolbox for Farmed Fish. *Reviews in Fisheries Sciences*, 16(S1): 3-15
- Chistiansen D.C., Klungsoyr L. 1987. Metabolic utilization of nutrients and the effect of insulin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 88B: 701-711
- Collins A.L., Anderson T.A. 1997. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. *The Journal of Fish Biology*. 50: 1158-1165
- Cowey C.B., Walton M.J. 1989. Intermediary metabolism. In *Fish nutrition*. J.Halver, editor. Academic Press, New York. 259-329
- Dias J., Gomes E.F., Kaushik S.J. 1997. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European sea bass fed plant-protein rich diets. *Aquatic Living Resources*. 10: 385-389
- Diler I., Tekinay A.A., Guroy D., Guroy B., Soyuturk M. 2007. Effects of *Ulva rigida* on the growth feed intake and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Biological Sciences*. 7: 305-308
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 1991. *The state of the World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, Rome, Italy
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 1994. *The state of the World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, Rome, Italy
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2002. *The state of the World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, Rome, Italy
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) 2004. *The state of the World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, Rome, Italy.
- Foster G.D., Moon T.W. 1991. Hypometabolism with fasting in the yellow perch: a study of enzymes hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol. Zool*. 64: 259-275

- Gomes E.F., Rema P., Kaushik S.J. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*. 130: 177-186
- Hansen L.G., Wiekhorst W.B., Simon J. 1976. Effects of dietary Aroclor 1242 on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and the selective accumulation of PCB components. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 33: 1343-1352
- Hemre G-I., Mommsen T.P., Krogdahl A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*. 8: 175-194
- Hendricks J.D. 2002. Adventitious toxins. Em: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego. 10: 601-649
- Hernández J., León M., León, C. 2003. Optimización dinámica en la gestión del cultivo de dorada en región mediterránea y Canarias. Documento de trabajo conjunto ULL-ULPGC. Facultades de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad de Las Palmas de Gran Canarias.
- Hernández M.D., Egea M.A., Rueda F.M., Aguado F., Martínez F.J., García B. 2001. Effects of commercial diets with different *P/E* ratios on sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth and nutrient utilization. *Aquaculture*. 195: 321-329
- Kara M.K., Faure E., Quignand Chaqui C. 2006. Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellan lagoon (North-Eastern Algeria)
- Kaushik S.J. 1990. Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. Em: Flos, R., Tort, L., Torres, P. (Eds.), *Mediterranean Aquaculture*. Ellis Horwood, UK. 125-138
- Keppler D., Decker K. 1974. Glycogen. Determination with amyloglucosidase. Em: *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmyer HU. New York: Academic Press. 1127-1131
- Kibria G., Nugegoda D., Fairclough R., Lam P., Bradley A. 1999. Utilization of wastewater-grown zooplankton: Nutritional quality of zooplankton and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell 1838) (Teraponidae) fed on wastewater-grown zooplankton. *Aquaculture Nutrition*. 5: 221-227

- Kissil G.W., Lupatsch I., Neori A. 1992. Approaches to fish feed in Israeli mariculture as a result of environmental constraints. Proceedings of the US-Israel Workshop on Mariculture and the Environment, Eilat, Israel. 74-84
- Kissil G.W., Lupatsch I., Higgs D.A., Hardy R.W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquaculture Resource. 31: 595-601
- Knox D., Walton M.J., Cowey, C.B. 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissue. Marine Biology. 56: 7-10
- Laiz-Carrión R., Sangiao-Alvarellos S., Guzmán J. M., Martín del Río M.P., Soengas J. L., Mancera J. M. 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiology and Biochemistry*. 27: 179-188
- Laiz-Carrión R., Martín del Río M.P., Miguez J.M., Mancera J.M., Soengas J.L. 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. Journal Experimental Zoology 298A: 105-118
- Lasserre G. 1972. Le coefficient de condition chez la daurada *Sparus aurata*, L. 1758 de la région de Sète en 1971-1972. Travaux du Laboratoire de Biologie Halieutique, Université de Rennes. 6: 141-150
- León C.J., Hernández J.M., Gasca-Leyva, E. 2001. Cost optimization and input substitution in the production of gilthead seabream. Aqua. Econom. Manag. 5(3-4): 147-170
- Li P., Gatlin III D.M. 2003. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). Aquaculture 219: 681-692
- Lovell R.T. 2002. Diet and fish husbandry. In: Halver. J.E., Hardy, R.W. (Eds), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego. 703-754
- Millamena O.M., Golez N.V. 2001. Evaluation of processed meat soluble as replacement for fish meal in diet for juvenile grouper *Epinephelus coiodes* (Hamilton). Aquaculture. Res. 32: 281-287
- Mommsen T.P. 1986. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. Can. Journal of zoology. 64: 1110-1115

- Mommsen T.P., Plisetskaya E.M. 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Reviews in Aquatic Sciences*. 4: 225-259
- Mommsen T.P., Plisetskaya E.M. 1993. Metabolic and endocrine function of glucagons-like peptides - evolutionary and biochemical perspectives. *Fish Physiology and Biochemistry*. 11: 429-438
- Mommsen T.P., Walsh P.J. 1992. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. *Experientia*. 48: 583-593
- Mommsen T.P., Walsh P.J., Moon T.W. 1985. Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of atlantic salmon. *Molecular Physiology*. 8: 89-100
- Moon T.W. (1988). Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Canadian Journal of Zoology*. 66: 1059-1068
- Moon T.W., Johnston I.A. 1981. Amino acid transport and interconversions in tissue of freshly caught and food-deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L.J. *Comparative Physiology*. 136: 31-38
- Mundheim H., Aksnes A., Hope B. 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture*. 237: 315-331
- Nakagawa H., Kasahara S., Sugiyama T. 1987. Effect of Ulva meal supplementation on lipid metabolism of black sea bream, *Acanthopagrus sclegeli* (Bleeker). *Aquaculture*. 62: 109-121
- Nakagawa H., Nematipour G. R., Yamamoto M. 1993. Optimum level of Ulva meal diet supplement to minimize weight loss during wintering in black sea bream *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker). *Asian Fisheries Science*. 6: 139-148
- Nakagawa H., Umino T., Tasaka Y. 1997. Usefulness of Ascophyllum meal as a feed additive for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 151: 275-281
- Nandeesh M.C., Gangadhar B., Varghese T.J., Keshavanath P. 1998. Effect of feeding *Spirulina plantesis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*. 29: 305-312
- National Research Council (NRC) 1999. *Sustaining Marine Fisheries*. National Academy Press, Washington, DC. 124

- Naylor R.L., Goldburg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H., Troell M. 2000. Effects of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 405: 1017-1024
- Nengas I., Alexis M.N., Davies S.J. 1996. Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diet for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Aquaculture Research*. 27: 147-156
- Oliva-Teles A., Gonçalves P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. 202: 269-278
- Olvera-Novoa M.A., Domínguez-Cen L.J., Olivera-Castillo L. 1998. Effect of the use of the icrolaga *Spirulina máxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*. 29: 709-715
- Pereira C., Vijayan M.M., Moon T.W. 1995. In vitro hepatocytes metabolism of alanine and glucose and the response to insulin in fed and fasted rainbow trout. *Journal of Experimental Zoology*. 271: 425-431
- Pereira T.G., Oliva-Teles A. 2002. Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture Research*. 33: 1183-1189
- Pereira T.G., Oliva-Teles A. 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research*. 34: 1111-1117
- Pilkis S.J., Raafat El-Maghrabi M.E., Caus T.H. 1988. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Biochemistry*. 57: 755-783
- Plancestia-Jatomea M., Olvera-Novoa M.A., Arredondo-Figueroa J.L., Hall G.M., Shirai K., 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 753-759
- Polakof S., Arjona F.J., Sangiao-Alvarellos S., Martín del Río M.P., Mancera J.M., Soengas J.L. 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology B*. 176: 441-452

- Regost C.J., Arzel J., Kaushik S.J. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*. 180: 99-117
- Robaina L., Izquierdo M.S., Moyano F.J., Socorro J., Vergara J.M., Montero D., Fernández-Palacios H. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*. 130: 219-233
- Ruiz- Amil M., Soler-Grau G., Garrido A.P. 1987. Metabolismo glucídico y lipídico en especies acuáticas. *In: Espinosa de los Monteros, J. y Lasarte, U (Eds.), Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura (PEUGA). Nutrición en Acuicultura, Vol. I.* 197-224
- Rupérez P., Saura-Calixto F. 2001. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*. 212: 349-354
- San Felú J.M. 1987. La acuicultura Marina en la Comunidad Valenciana. (Excm. Ayto. Castellón de la Plana, Eds.). 145-166
- Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Guzmán J.M., Martín del Río M.P., Miguez J.M., Soengas J.L. 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R897-R907
- Sangiao-Alvarellos S., Arjona F.J., Martín del Río M.P., Miguez J.M., Mancera J.M., Soengas J.L. 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *Journal Experimental Biology* 208: 291-4304
- Santos M. N., Erzini K., Díaz A., Manzano E. 2007. C. Catálogo de espécies de peixes de interesse comercial da costa sul atlântica da Península Ibérica. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Innovación, Ciencia y empresa. Consejería de Agricultura y Pesca. 110
- Sheridan M.A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90B: 679-690
- Sheridan M.A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107B: 495-508
- Sitjà-Bobadilla A., Peña-Llopis S., Gómez-Requeni P., Médale F., Kaushik S. e Pérez-Sánchez J. 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-

- specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 249: 387-400
- Smith O.K., Krohon R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochemistry*. 150: 76-85
- Soengas J.L., Strong E.F, Fuentes J., Veira J.A.R., Andrés M.D. 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmon salar*. Effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*. 15: 491-511
- Su J.Y Storey K.B. 1993. Phosphofructokinase from liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 302: 49-55
- Stein M.W. 1963. D- Glucose, determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Em: Bergemeyer, H.U. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York. 117
- Suárez R.K., Mommsem. T.P. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Canadian Journal of Zoology*. 65: 1869-1882
- Suau P., López J. 1976. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L. *Investigación Pesquera*. 40 (1): 169-199
- Tacon A.G.J. 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fishmeal and other fishery resources. *FAO Fisheries Circular*, no. 881, FAO, Roma. 35
- Tacon A.G.J. 1997. Fishmeal replacers. Review of antinutrients within oilseeds and pulses- a limited factor for the aquafeed green revolution? In: Tacon A., Basurco B. (Eds.), *Feeding Tomorrow's Fish. Cahiers Options Méditerranéennes*. 22: 153-182
- Thiessen D.L., Campbell G.L., Adelizi P.D. 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition*. 9: 67-75
- Valente L.M.P., Gouveia A., Rema P., Matos J., Gomes E.F., Pinto I.S. 2006. Evaluation of tree seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture*. 252: 85-91

- Van Raaij M.T.M., Van den Thillart G.E.E.J.M., Vianen G.P., Pit D.S.S., Balm P.H.M., Steffens A.B. 1996. Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) during deep hypoxia and subsequent recovery. *Journal of Comparative Physiology*. 166B: 443-452
- Walton M.J., Cowey C.B. 1982. Aspect of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 73B: 59-79
- Wassef E.A., El Masry M.H., Mikhail F.R. 2001. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research*. 32: 315-322
- Wassef E.A., El-Sayed A.F.M., Kandeel K.M., Sakr E.M. 2005. Evaluation of *Pterocladia* and *Ulva* meals as additives to gilthead sea bream *Sparus aurata* diets. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 31: 321-332
- Weatherley A.H., Gill H.S. 1989. *The Biology of the Fish Growth*. Academic Press. 27-44
- Weber J.M., F. Haman. 1996. Pathways for metabolic fuels and oxygen in high performance fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 113A: 33-38
- Wilson R.P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*. 124: 67-80
- Zhao M., Xie S., Zhu X., Yang Y., Gan L., Song L. 2006. Effect of inclusion of blue-green algae meal on growth and accumulation of microcystins in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 72-78

Websites consultados:

<http://www.ordembilogos.pt>

<http://www.agwest.sk.ca>

<http://www.fishbase.org>

<http://www.fao.org>

<http://genimpact.imr.no>