



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Avaliação da inclusão de EVOCOL em dietas
formuladas para juvenis de Linguado (*Solea
senegalensis*, Kaup 1858).

Lúcia de Jesus Gonçalves Peixoto

Mestrado em Biologia Marinha

Especialização Pescas e Aquacultura

2010



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Avaliação da inclusão de EVOCOL em dietas formuladas para juvenis de Linguado
(*Solea senegalensis*, Kaup 1858).

Lúcia de Jesus Gonçalves Peixoto

Mestrado em Biologia Marinha
Especialização Aquacultura e Pescas

2010

A supervisão da tese ficou a cargo de:

Coordenador Interno: Professora Doutora Maria Teresa Dinis
(Universidade do Algarve)

Coordenador externo: Prof. Doutor Mariano Lastra
(Professor Titular Universidade de Vigo)

Este trabalho realizou-se dentro do Projecto de Investigação subordinado ao tema: “Aquisost - Aquicultura sostenible” financiado pelo Ministerio de Ciencia e Innovacion (C.D.T.I.), Governo de Espanha.

Para a realização deste trabalho à aluna Lúcia de Jesus Gonçalves Peixoto foi-lhe atribuída uma bolsa do programa ERASMUS (Fevereiro 2009- Junho 2009).

Agradecimentos:

À Professora Maria Teresa Dinis por ter aceite ser minha orientadora, pela disponibilidade que demonstrou ao longo deste trabalho.

Ao Doutor Mariano Lastra por ter estado sempre optimista, pela preocupação, pela disponibilidade na planificação e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Académico Pedro Toledo e à Doutora Maria Teresa Viana pela sua disponibilidade e pela sua contribuição para este trabalho.

À Doutora Ana Matus pela sua ajuda, paciência e preocupação com o desenho experimental deste trabalho.

Ao Doutor Luís Conceição por ter esclarecido as minhas dúvidas e por estar sempre disponível.

Aos meus colegas, à Lucía por me ter ensinado tanta coisa, por me ter passado dados importantes para a realização do trabalho, e especialmente por ser como é. Ao Jorge por me ter ajudado com os tubos, com os tanques, e com a estatística. Ao Marcelo por ser tão espontâneo, e pelas suas sugestões. Aos três por me terem feito sentir em casa desde o primeiro dia de trabalho.

Ao pessoal técnico da ECIMAT por terem estado sempre disponíveis para transmitir conhecimentos, por me terem recebido tão bem e por encontrarem sempre motivos para estar contentes.

Aos meus amigos pelo apoio, pela preocupação e pela motivação. Agradeço especialmente à Inês por ser a pessoa fantástica que é e por estar sempre presente quando mais me faz falta.

Aos meus pais e aos meus avós. Às minhas tias e às minhas primas por estarem sempre lá, por me demonstrarem que confiam em mim e que eu posso contar com elas. Ao Esteban por ter sempre algo divertido para fazer e para dizer.

Resumo

O EVOCOL (EVO) é uma vinhaça resultante da destilação do melaço de beterraba para a obtenção de etanol. Este produto devido às suas propriedades nutricionais torna-se interessante para ser incluído em dieta formuladas em aquacultura. O presente estudo realizou-se para avaliar o efeito da inclusão de EVO em dietas formuladas para juvenis de linguado (*Solea senegalensis*). Para tal avaliou-se o crescimento e o comportamento quando alimentados com as diferentes dietas experimentais.

Um total de 450 juvenis de linguado ($6,95 \pm 1,65$ gramas) foi alimentado com as diferentes dietas experimentais, para calcular o crescimento. A experiência de crescimento decorreu durante um período de 30 dias. As dietas experimentais testadas foram: a dieta controlo (EVO 0%), EVO 5%, EVO10%, EVO15%, sendo todas iso-proteicas e iso-energéticas. O trabalho experimental iniciou-se após 30 dias de aclimação às condições laboratoriais. Durante a fase de aclimação os juvenis foram alimentados com a dieta experimental controlo.

Após a experiência de crescimento formulou-se uma dieta de recuperação, com um nível proteico superior e lípidos provenientes de óleo de peixe. Com esta dieta alimentou-se os juvenis de linguado durante duas semanas. Esta dieta utilizou-se para melhorar a condição dos indivíduos submetidos às dietas experimentais, e posteriormente avaliar o seu comportamento alimentar perante as diferentes dietas oferecidas. Para além das dietas experimentais utilizadas durante a experiência de crescimento testou-se também uma dieta comercial. O comportamento alimentar foi gravado em vídeo para posterior análise.

Os resultados de crescimento demonstram que o EVOCOL pode ser incluído em dietas para juvenis de linguado sem prejudicar o seu crescimento, mas sem qualquer vantagem em termos de taxa de crescimento. Quanto ao comportamento verificou-se que a ingestão voluntária do alimento (VFI) da dieta experimental controlo é significativamente (<0.05) inferior quando comparada com os valores das dietas com inclusão de EVOCOL, embora esta diferença não se reflecta no ganho em peso. Os índices hepatosomático e visceral aumentam quando os juvenis são alimentados com a dieta controlo, durante a aclimação, o que pode sugerir que esta dieta não é a mais adequada para juvenis de linguado (*S. senegalensis*). As dietas EVO 10% e EVO 15% são aquelas que apresentam valores de IA (Índice de Aceitação) e IGA (Índice Global de Aceitação) mais elevados. A dieta EVO 15% apresenta valores de IGA superiores à dieta comercial.

As vinhaças podem ganhar um valor adicional ao serem incluídas em dietas para peixes, devido às suas propriedades nutricionais e por poder actuar como um ingrediente estimulante do apetite, evitando assim a contaminação e o desperdício de alimento.

Palavras-chave: *Solea senegalensis*, crescimento, nutrição, vinhaças de beterraba, estimulantes de apetite.

Abstract:

EVOCOL (EVO) is a condensed soluble molasses resulting from the beet distillation for ethanol production. Such product has good nutritional properties and was used in some diet formulations in aquaculture. This study aimed to evaluate the EVO inclusion effects in diets for sole juveniles (*Solea senegalensis*), assessing its growth and feed behaviour when offered different formulated diets.

A total of 450 sole juveniles (6.95 ± 1.65 grams) were handled in order to assess growth rates. The growth study lasted 30 days. The tested formulated diets were: a control diet (EVO 0%), and three other with different percentages of EVOCOL: EVO 5%, EVO 10% and EVO 15%. All diets were isonitrogenous and isoenergetic. The experimental work started after 30 days of acclimatization, to ensure the adaptation of the animals to laboratory conditions. During acclimatization the juveniles were fed with the control diet.

A diet without EVO and with a higher protein level than the experimental ones, was offered to the juveniles during two weeks after the growth study. This was utilized to improve animal's condition, to be utilized on the feeding behaviours experiments. In addition of the above mentioned diets a commercial diet was also tested. The feeding behaviour and whether some diet gives more stimuli to feed, some videotapes were recorded.

The growth results show that EVO can be included in diets for sole juvenile without negative effects in its growth but without any advantage. When comparing voluntary feed intake (VFI), the control diet is significantly (<0.05) lower than diets with EVO included. In contrast, the control diet showed no strictly differences (>0.05) in protein efficiency rate. However, the hepatosomatic and visceral indices increased when juveniles were fed with control diet, at least during the acclimatization period. This result may suggest that this diet is not the appropriate for sole juveniles (*S. senegalensis*).

The diet of EVO 10 and EVO 15% were those that showed the highest values of acceptance index (IA) and global acceptance index (IGA). From our results, the EVO 15% diet presented IGA values higher than the obtained to commercial diet.

Our results showed that EVOCOL can be applied in diet formulation for fishes. Mainly, because of their nutritional properties, and stimulant effect in the fish feeding behaviour.

Key words: *Solea senegalensis*, growth, nutrition, condensed soluble molasses, feed stimulant.

Índice

1. Introdução	1
Inclusão de novos ingredientes em dietas	1
Vinhaças de melaço de beterraba	2
Aromas para dietas em aquacultura	3
Desencadeamento do comportamento alimentar	3
<i>Solea senegalensis</i> , importância da espécie para a aquacultura	4
Objectivos do trabalho	4
2. Material e Métodos	5
Condições Experimentais	5
Experiencia crescimento	5
Dietas experimentais	6
Experiência comportamento	9
Procedimentos analíticos	11
Porcentagem de humidade	11
Porcentagem de cinzas	11
Lípidos totais em farinhas	12
Análise estatística	13
3. Resultados	14
Experiência de crescimento	14
Índices nutricionais	14
Crescimento e sobrevivência dos juvenis <i>S. senegalensis</i>	15
Experiência de comportamento	17
Índice de Aceitação (IA) e Índice de Aceitação Global das dietas	17
4. Discussão	18
Crescimento	18
Influência das dietas nos índices nutricionais	19
Viabilidade da inclusão de EVOCOL em dietas	20
Comportamento	22
Índice de Aceitação Global das dietas	22
Considerações Finais	23
5. Referências	25

1. Introdução

A aquacultura na Europa sofreu um grande desenvolvimento nos últimos anos, adquirindo este sector cada vez mais importância devido à escassez dos recursos pesqueiros no ambiente natural.

A maioria das dietas comerciais utilizadas actualmente em aquacultura, têm por base farinha e óleos de peixe. Este facto torna as dietas dispendiosas e insustentáveis (FAO, 2006), provocando o aumento da pressão exercida sobre os recursos naturais (Naylor *et al.*, 2000).

Uma possível solução seria a diversificação dos ingredientes utilizados na formulação das dietas, sendo os ingredientes de origem vegetal uma boa opção. Embora alguns ingredientes de origem vegetal sejam uma boa fonte de proteína, também têm as suas limitações, tais como os factores “antinutricionais”. Além disso, o seu perfil nutricional não é o mais semelhante aos requisitos nutricionais dos peixes nomeadamente a ausência de ácidos gordos da cadeia omega 3 (Gatlin *et al.*, 2007). A dieta deve fornecer todos os nutrientes essenciais e energia em concordância com as necessidades fisiológicas dos indivíduos, tais como, o crescimento e o bem-estar do animal (Robaina and Izquierdo, 1999).

A proteína é o nutriente que mais afecta o crescimento dos peixes, isto é, o principal factor limitante do crescimento. É importante formular dietas com as quantidades adequadas de proteína para maximizar o crescimento, mas sempre tentando minimizar os seus custos e o impacto ambiental (Sá *et al.*, 2006).

Os níveis de substituição proteica podem variar muito em função da espécie e da composição da dieta (Gatlin *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009).

Os subprodutos da indústria alimentar podem ser ingredientes interessantes para incluir em dietas devido à sua elevada disponibilidade e ao seu baixo custo. A produção de açúcar a partir da beterraba gera vários subprodutos entre eles a vinhaça de beterraba.

A vinhaça de beterraba resulta da fermentação do melado de beterraba para a produção de álcool. Este produto tem um elevado conteúdo em matéria orgânica e torna-se um

problema pelo facto de já não ser interessante para ser reutilizado. Actualmente este ingrediente utiliza-se para a alimentação de gado, em pequenas quantidades, (Karalazos and Swan, 1977; Weigand and Kirchgessner, 1980; Fernández *et al.*, 2009), tendo também sido realizados estudos da sua possível inclusão em dietas para peixes, como uma fonte alternativa de proteína (Chien *et al.*, 2005). Além disso outros sub-produtos da indústria açucareira foram testados na alimentação de carpa dando bons resultados, devido ao seu conteúdo em hidratos de carbono (Singh *et al.*, 1999). O interesse das vinhaças de beterraba não reside apenas nas suas qualidades nutricionais, mas também nas suas propriedades ligantes, bem como para melhorar a aparência do alimento manufacturado (Maertens *et al.*, 1994; Waliszewski *et al.*, 1997).

O EVOCOL é uma vinhaça de beterraba, com composição variável, dependendo da matéria-prima e do lote a que pertence, no entanto possui um elevado conteúdo em azoto, principalmente na forma de aminoácidos livres e betaína (Weigand and Kirchgessner, 1980). A análise do EVOCOL utilizado nesta experiência apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1- Análise proximal do EVOCOL utilizado na formulação das dietas de juvenis de linguado.

%Humidade	%Cinza	%Proteína	%Lípidos	%Hidratos de Carbono	Energía (Kj/g)
35.72	24.80	27.75	1.756	45.68	15.09

A betaína é um atraente e um estimulante do apetite para todos os peixes, principalmente nas primeiras fases de vida (Sanz *et al.*, 2000; Reig *et al.*, 2003) desta forma torna-se interessante avaliar a inclusão de EVOCOL em dietas para linguado.

Embora os linguados respondam bem a dietas formuladas com farinha de peixe e sem qualquer aroma atractivo (Reig *et al.*, 2003), quase todas as dietas para linguado têm algum aroma para que estas sejam melhor aceites pelos animais, pelo que normalmente se utiliza aroma de poliquetas, de mexilhão, betaína, entre outros.

O linguado devido aos seus hábitos alimentares torna-se ideal para estudar o efeito da inclusão de novos ingredientes para dietas com propriedades atraentes, pois este recorre à quimiorrecepção para a captura das suas presas. A introdução de ingredientes que sejam atraentes pode afectar a taxa de ingestão das dietas, aumentar o crescimento e diminuir a necessidade de incluir grandes quantidades de farinha e óleo de peixe. Os atraentes melhoram as qualidades organolépticas das dietas o que leva a uma melhor aceitação destas pelos peixes (Sanz *et al.*, 2000).

A engorda de juvenis de linguado nem sempre é bem sucedida, pois não existe informação disponível que nos indique se as dietas comerciais utilizadas actualmente se adequam às necessidades nutricionais dos juvenis de linguado, daí que normalmente estes sejam alimentados com dietas formuladas para outras espécies como por exemplo, pregado (*Psetta maxima*) e dourada (*Sparus aurata*) (Rema *et al.*, 2008). Uma vez que os requisitos nutricionais para esta espécie ainda não estão determinados, é prática comum utilizar os requisitos de espécies próximas cujas necessidades nutricionais estão mais estudadas (Kaushik, 1999).

Para que o linguado se alimente, é necessário que exista uma motivação que é gerada por factores internos e externos. Em aquacultura é imprescindível garantir que o alimento é ingerido, para deste modo garantir os objectivos de produção e de rendimentos. Quando é possível aumentar a taxa de ingestão do alimento consegue-se também benefícios para o meio ambiente, uma vez que se reduz a produção de resíduos, causada pelos desperdícios alimentares. Em situações de cultivo, muitos factores estão controlados, por este facto oferecer um alimento que seja bem aceite e que desencadeie uma reacção positiva por parte dos indivíduos, torna assim uma maior importância. (Reig *et al.*, 2003).

O linguado (*S. senegalensis*) é uma clara opção quando se fala na diversificação das espécies cultivadas (Basurco and Abellán, 1999), pois existe uma grande quantidade de trabalho de investigação realizado com esta espécie, no que diz respeito às primeiras fases de vida, diferentes estratégias de desmame, capacidades digestivas, requisitos nutricionais, (Rønnestad *et al.*, 2000; Conceição *et al.*, 2003; Aragão *et al.*, 2004; Conceição *et al.*, 2007;

Morais *et al.*, 2007; Villalta *et al.*, 2008), entre outros, o que é muito útil para estudos a serem realizados.

É uma espécie com um elevado valor comercial nos mercados da Península Ibérica, sendo importante para diversificar a oferta dada pelos peixes de aquacultura, podendo assim melhorar o valor comercial das espécies de aquacultura (Dinis *et al.*, 1999; Cañavate, 2005).

O linguado (*S. senegalensis*) por ter uma boa taxa de crescimento parece ser uma boa opção quando comparado com *Solea spp* (Howell, 1997; Imsland *et al.*, 2003; Rodríguez and Souto, 2003).

Objectivos:

Este trabalho teve como principal objectivo a avaliação do efeito da inclusão de EVOCOL em dietas equilibradas para alimentação de juvenis de linguado, a nível do crescimento e a nível da taxa de ingestão.

A segunda parte do trabalho teve como fim testar o comportamento dos juvenis de linguado perante o alimento e assim determinar se este ingrediente tem a capacidade de actuar como atraente em dietas para esta espécie.

2. Material e Métodos:

Condições experimentais:

A experiência de crescimento foi realizada com juvenis de linguado (*S. senegalensis*) adquiridos na empresa Solt Sea Farm, Muxia (Espanha), tendo decorrido nas instalações da “Estacion de Ciencias Mariñas de Toralla (ECIMAT)”, Universidade de Vigo (Espanha).

Aclimação dos juvenis

Um total de 450 indivíduos com peso médio aproximado de 6 g, foram distribuídos pelos tanques em circuito aberto para se adaptarem às novas condições de cultivo. Inicialmente foram alimentados *ad libitum*, e nos 5 primeiros dias aplicaram-se banhos de formol, numa concentração de 200 ml/m³, como medida profilática e a fim de garantir a eliminação de

parasitas, bactérias e fungos, bem como para desinfetar possíveis feridas causadas pelo transporte. Após este procedimento procedeu-se à amostragem de indivíduos para recolha de amostras de vísceras e de músculo, sendo este momento de amostragem designado por Ti. Durante este período os indivíduos foram alimentados com uma dieta experimental controlo (ver capítulo Dietas experimentais). Os mesmos estiveram expostos a um fotoperíodo de 8 horas de luz e 16 de escuridão.

Distribuição

Após a aclimação, procedeu-se à amostragem inicial T0 onde os juvenis com peso médio aproximado $6,95 \pm 1,65$ g, foram distribuídos aleatoriamente em grupos homogêneos de 28 indivíduos por tanque, num total de 12 tanques de 50L (55 x 40 x 20 cm). Estes estavam inseridos em circuito aberto de água do mar, salinidade 36 ‰, a uma temperatura controlada de $18 \pm 0,5$ °C, 7 mg/L de O₂. Os parâmetros foram mantidos nos níveis óptimos para esta espécie, durante todo o período experimental.

Os peixes estiveram em escuridão total durante o período experimental, excepto durante o período da distribuição de alimento. Os triplicados de cada tratamento foram distribuídos ao acaso pelos 12 tanques, e cada réplica foi alimentada com a dieta experimental correspondente. O método de alimentação escolhido foi o manual, pois desta forma foi possível manter um registo diário do comportamento e do estado dos animais. Os juvenis foram alimentados até à saciedade aparente, 6 dias por semana, 3 vezes por dia e com uma periodicidade de 4 horas, durante 30 dias. Numa base diária e ao fim do dia procedeu-se à limpeza dos tanques com um sifão, retirando-se cerca de 75% da água de cada tanque.

O consumo de cada réplica registou-se durante sete dias do período experimental. Cada réplica é alimentada até à saciedade aparente, o alimento que remanesce no tanque recolhe-se e leva-se a peso seco, o cálculo da ingestão efectua-se por diferença entre o alimento que é recolhido e aquele que estava pesado para cada réplica (3% da biomassa do tanque). Após 30 dias do início da experiência procedeu-se à pesagem de todos os

indivíduos para obter dados da biomassa e calcular o crescimento, sendo esta a amostragem T1.

Antes da amostragem os peixes foram privados de alimento durante 24 h, a fim de garantir que o tubo digestivo se encontrava vazio. Na amostragem inicial (T0) e final (T2) foram sacrificados 6 exemplares de cada tratamento para recolha de amostras, para calcular os índices nutricionais. As vísceras dos peixes pesaram-se de forma individual para o cálculo dos índices hepatosomático (HSI) e visceral (VSI).

Dietas experimentais:

Formularam-se quatro dietas iso-proteicas e iso-energéticas contendo níveis crescentes de EVOCOL 0, 5, 10, 15, em peso húmido por 100g de dieta, sendo estas denominadas por: dieta Controlo (EVO 0%), EVO 5%, EVO 10% e EVO 15% respectivamente. Posteriormente formulou-se uma nova dieta sem inclusão de EVOCOL para melhorar a condição dos indivíduos.

As dietas foram formuladas para conter aproximadamente 56% de proteína e 11% de lípidos, a composição em ingredientes e a análise proximal das dietas experimentais encontram-se resumidas na Tabela 2.

As fontes proteicas foram, farinha de peixe LT-94, concentrado de soja, farinha de trigo e glúten de trigo. Todos os ingredientes da dieta sofreram uma moagem fina, para garantir uma mistura homogénea. Às dietas adicionou-se o conservante Benzoato de Sódio, para evitar que as propriedades das dietas se alterassem. A mistura de ingredientes foi granulada com 2 mm de diâmetro. Seguidamente as dietas levam-se à estufa a uma temperatura de 40 ° C, por um período de 24 h, para retirar o excesso de humidade e evitar que proliferem bactérias e fungos. Posteriormente guardou-se em recipientes herméticos, para que as qualidades nutricionais se mantivessem.

Tabela 2- Composição em ingredientes e análise proximal das dietas experimentais.

	Dietas				Dieta Recuperação
	Controlo	Evo5%	Evo10%	Evo15%	
Óleo de fígado de bacalhau	0	0	0.1	0.5	2
Farinha de Peixe LT- 94	45	45	45	44	51
Concentrado de soja Soycomil	15	14	12.8	12.5	20
Farinha de Trigo	10	9.5	9	8	0
Glúten de Trigo	16.5	15.8	15	14.5	10
EVOCOL*	0	5	10	15	0
Alginato de sódio	1	1	1	1	0
Amido de milho	9.29	6.99	4.39	1.79	0
Amido de Milho Pregelatinizado	0	0	0	0	8
Vitaminas premix	1.5	1	1	1	2
Minerais premix	1	1	1	1	1
Vitamina C	0.4	0.4	0.4	0.4	0
Colina (%)	0.09	0.09	0.09	0.09	0,09
Tocopherol	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Benzoato de sódio	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Gelatina	0	0	0	0	6
<i>Análise proximal (% peso seco)</i>					
Matéria Seca	95.40	94.28	95.39	95.14	90.14
Proteína total	57.32	55.93	56.59	57.08	66,44
Lípidos totais	7.53	8.94	10.77	10.71	9,8
Cinzas	9.94	11.81	14.12	12.82	10,57
Extracto livre de azoto	25.21	23.31	18.52	19.39	13.19
Energia total (kJ g ⁻¹ DM)	20.85	20.76	20.85	21.05	21.73

*EVOCOL cedido pela Açucareira Ebro, Espanha

Formulação da dieta de recuperação:

Após a amostragem T1 devido a problemas nos circuitos de água e ar, e a possíveis problemas nutricionais, houve uma elevada mortalidade em todas as réplicas. Por este facto tornou-se impossível continuar com a experiência inicial.

Assim formulou-se uma dieta de recuperação (DR), com níveis proteicos mais elevados que as dietas formuladas anteriormente e lípidos provenientes de óleo de peixe. Esta dieta formulou-se para que fosse possível recuperar os indivíduos restantes e realizar a segunda

parte do trabalho experimental. Durante duas semanas os indivíduos foram alimentados com a dieta de recuperação, e quando a mortalidade estabilizou, deu-se início à experiência de comportamento.

Devido às observações realizadas ao longo do período de alimentação, existia a possibilidade de as dietas com um nível superior de EVOCOL serem melhor aceites pelos juvenis, quando comparadas com a dieta que não continha este ingrediente (controlo). Esta observação confirmou-se pelas diferenças significativas na ingestão do alimento (VFI), e por isso decidiu-se elaborar um protocolo para observar o comportamento dos indivíduos, quando alimentados com as diferentes dietas.

Experiência de comportamento:

Com a finalidade de avaliar a possível acção como atraente do EVOCOL incluído nas dietas formuladas para linguado (*S. senegalensis*), realizou-se uma experiência de observação do comportamento destes exemplares.

As dietas utilizadas na experiência de crescimento foram também utilizadas para avaliar o comportamento dos indivíduos. A dieta DR foi utilizada para alimentar os peixes antes de se dar início à experiência de comportamento, esta não se utilizou para testar o comportamento dos indivíduos.

Segundo Reig *et al.*, (2003) o comportamento alimentar dos linguados divide-se em três fases, Orientação Distante (OD), Orientação Próxima e início da ingestão (OP) e Continuação da ingestão (CI).

As respostas observadas nas diferentes fases do comportamento alimentar foram avaliadas como positivas (a), intermédias (b) e negativas (c), de acordo com as descrições apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3- Descrição das respostas positivas (a), moderadas (b) e negativas (c), face às diferentes dietas em cada fase do comportamento alimentar, (adaptado de Reig *et al.*, 2003).

Orientação Distante (OD)	A maioria dos indivíduos reage deslocando-se até ao alimento (a) Alguns indivíduos reagem ao estímulo (b) Nenhum indivíduo, ou muito poucos reagem ao estímulo (c)
Orientação próxima e início da ingestão (OP)	A maioria dos indivíduos prova e ingere o alimento (a) Bastantes indivíduos dos que reagem provam e ingerem o alimento (b) Nenhum peixe ingere o alimento (c)
Continuação da ingestão (CI)	Todos os peixes ou a maioria continua a alimentar-se (a) Alguns peixes continuam a alimentar-se (b) Nenhum peixe ingere o alimento e se o ingerem expulsam-no (c)

Depois de calculada o número de respostas positivas (a) moderadas (b) e negativas (c) estas foram transformadas no Índice de aceitação (IA) de acordo com a fórmula (Reig, *et al.*, 2003):

$$IA = \frac{(a * 1) + (b * 0,5) + (c * 0)}{100}$$

O valor máximo que pode apresentar este índice é 1. O índice de aceitação global (IAG) resulta da soma do índice de aceitação nas três fases do comportamento alimentar, sendo o seu valor máximo igual a 3.

Para avaliar a reacção dos peixes ao alimento, este foi introduzido na água dentro de uma bolsa de rede, para classificação da orientação distante (OD). Observou-se como reagiam os indivíduos das 4 réplicas, e quantos se dirigiam ao alimento depois de este ser introduzido na água. Normalmente se o estímulo for suficientemente atractivo o linguado demora apenas alguns segundos a reagir e a dirigir-se no sentido de onde procede o estímulo.

Posteriormente, realizou-se alimentação manual observando-se se estes ingeriam mais que uma partícula de alimento, e se não expulsavam as partículas já ingeridas, este

comportamento pode ser um indicador da palatabilidade do alimento. Com a recolha destas imagens avaliou-se a orientação próxima e início da ingestão (OP) e a continuação da ingestão (CI).

Índices de crescimento:

Para a avaliação do crescimento foram calculados os seguintes índices:

$$\text{Peso ganho (\% do peso inicial) (WG)} = 100 \times \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{\text{Peso inicial}}$$

$$\text{Taxa específica de crescimento (SGR)} = 100 \times \frac{(\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial}))}{n^{\circ} \text{ de dias}}$$

$$\text{Ingestão voluntária (VFI)} = \frac{\text{Alimento ingerido}}{\frac{\text{Peso inicial} + \text{Peso final}}{2}}$$

$$\text{Taxa de eficiência proteica (PER)} = \frac{\text{Peso Ganho}}{\text{Proteína ingerida}}$$

$$\text{Índice hepatosomático (\%) (HSI)} = 100 \times \frac{\text{Peso Fígado}}{\text{Peso corpo completo}}$$

$$\text{Índice visceral (\%) (VSI)} = 100 \times \frac{\text{Peso Visceras}}{\text{Peso corpo completo}}$$

$$\text{Taxa de conversão do alimento (FCR)} = \frac{\text{Alimento oferecido}}{\text{Peso ganho}}$$

Procedimentos Analíticos:

Percentagem de humidade:

Determinou-se a percentagem de humidade dos ingredientes e das dietas. Para tal, pesou-se previamente na balança analítica, cadinhos nos quais se introduziram 2g de amostra em triplicado. Uma vez pesadas as amostras, levaram-se à estufa a 80° C, durante 48 horas, até se obter um peso constante. Depois de retiradas da estufa as amostras foram colocadas num excicador para arrefecerem, antes de serem novamente pesadas na balança analítica. A determinação da humidade é feita por diferença de peso e expressa em percentagem.

Percentagem de cinzas:

As amostras foram pesadas numa balança analítica, em cadinhos de porcelana previamente incinerados e pesados. As amostras foram colocadas na mufla a uma temperatura de 550° C durante 6 horas, após o que foram colocadas num excicador para arrefecer, e posteriormente pesaram-se na balança analítica.

A determinação das cinzas foi feita com base nas seguintes fórmulas:

$$\% \text{ de cinzas em base seca} = \frac{\text{Peso de cinzas} \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

$$\% \text{ matéria orgânica} = 100 - \% \text{ Cinzas}$$

Lípidos totais:

A análise de lípidos totais (LT) em farinhas e dietas realizou-se utilizando o método de Folch *et al.* (1957) modificado.

Pesou-se 100 mg de amostra em triplicado, a cada amostra colocada num tubo pirex juntou-se 2ml de solução de clorofórmio-metanol, homogeneizou-se em tubo potter durante 3 minutos, até sentir que todos os grânulos da amostra se encontram desfeitos. As

amostras foram colocadas novamente em tubos pirex, ficando a repousar durante 30 minutos a 4° C. Em seguida centrifugou-se durante 10 minutos a 3000 rpm, 4°C. Recolheu-se o sobrenadante com uma pipeta Pasteur e trespassou-se para um novo tubo pirex, deixando-se repousar a 4°C. De seguida ressuspendeu-se o precipitado em 2 ml de clorofórmio-metanol e agitou-se em vortex. Centrifugando-se posteriormente durante 10 minutos a 3000 rpm, 4°C. O sobrenadante obtido juntou-se com o sobrenadante obtido anteriormente. Mediu-se o volume numa proveta e adicionou-se 0,25 volumes de solução de NaCl a 0,75% e de seguida, agitou-se em vortex, deixou-se repousar durante 30 minutos a 4°C. Recolheu-se a fase clorofórmica (a que fica por baixo) com pipeta Pasteur para um tubo pirex previamente incinerado a 500° C durante 5 horas e pesado. As amostras colocadas nos tubos foram à estufa durante 60 minutos a 60° C, para evaporarem, depois colocou-se num exsiccador até à sua completa evaporação. Posteriormente as amostras voltaram a ser ressuspendidas em 1 ml de clorofórmio e agitadas em vortex, deixou-se evaporar. Finalmente os tubos com o extracto lipídico pesam-se e a percentagem de lípidos totais (LT) calcula-se de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%LT = \frac{((\text{Peso do tubo com extracto lipídico} - \text{Peso do tubo vazio})) \times 100}{\text{Peso seco da amostra}}$$

A quantificação de lípidos da Dieta de Recuperação, efectuou-se por Soxhlet (AOAC 2000) Official Method 920.39 (4.5.01).

Proteína total:

A quantificação de proteína total realizou-se por CN-LECO2000, determinando a percentagem de azoto e de carbono. O cálculo da proteína efectuou-se segundo a seguinte fórmula matemática:

$$\%Proteína = 0,65 * \%Azoto$$

Extracto livre de azoto:

A determinação do extracto livre de azoto nas dietas realizou-se por diferença.

Digestibilidade:

Utilizaram-se várias técnicas de recolha de fezes. A técnica de colunas de sedimentação, massagem abdominal e dissecação do intestino, segundo a metodologia descrita por Austreng (1978).

Análise estatística:

Os resultados apresentados são a média desvio padrão. Utilizou-se uma ANOVA de um factor, com um intervalo de confiança de 0,5, para avaliar as diferenças entre tratamentos. Para esta análise utilizou-se o programa estatístico Sigma Plot 11.0

3.Resultados:

Crescimento:

Os dados de crescimento, ingestão e utilização do alimento pelos indivíduos nos 30 primeiros dias de experiência, estão apresentados na Tabela 4.

O crescimento dos peixes é expresso em percentagem de peso ganho (WG). A dieta com uma inclusão de 15% de EVOCOL é aquela em que se verifica uma maior percentagem de peso ganho, e a dieta controlo aquela em que se verifica um menor ganho de peso. Embora se verifiquem diferenças de crescimento entre os diferentes tratamentos, estas não são significativas estatisticamente.

A ingestão voluntária de alimento (VFI) é mais elevada para as dietas com inclusão de EVOCOL, comparativamente com a dieta controlo, sendo estas diferenças significativas estatisticamente.

A taxa de eficiência proteica (PER), a taxa específica de crescimento (SGR) e a taxa de conversão do alimento (FCR) não apresentam diferenças significativas ($P>0.05$) entre tratamentos.

Os tratamentos que apresentam valores de PER mais elevado são o controlo e o 15%. No que toca aos tratamentos 5% e 10%, estes têm valores de PER mais semelhantes entre si.

Os valores de SGR aumentam nos tratamentos com uma maior inclusão de EVOCOL, sendo a dieta com uma inclusão de 15% aquela que apresenta o valor mais elevado e a dieta controlo aquela que apresenta o valor mais baixo.

O tratamento controlo é aquele que apresenta um valor inferior de FCR, o tratamento 5% é aquele que apresenta um valor mais elevado, não existem diferenças significativas entre tratamentos.

Tabela 4- Performance de crescimento e utilização do alimento em juvenis de linguado alimentados com as diferentes dietas (30 dias; 18°C). Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão (n=3), os valores com diferentes índices (a,b) apresentam diferenças significativas (P<0,05).

	Dietas experimentais			
	Controlo	EVO 5	EVO 10	EVO 15
Peso Inicial (g)	6,94 \pm 0,29	6,93 \pm 0,26	6,88 \pm 0,25	7,07 \pm 0,29
Peso Final (g)	9,20 \pm 1,18	9,27 \pm 1,23	9,22 \pm 0,28	10,00 \pm 0,57
Peso Ganho (%)	32,19 \pm 9,25	33,36 \pm 9,06	34,11 \pm 4,17	41,74 \pm 9,11
VFI	0,32 \pm 0,06 ^a	0,47 \pm 0,02 ^b	0,47 \pm 0,02 ^b	0,48 \pm 0,07 ^b
FCR	1,00 \pm 0,11	1,46 \pm 0,30	1,38 \pm 0,12	1,17 \pm 0,10
PER	1,75 \pm 0,18	1,26 \pm 0,29	1,29 \pm 0,12	1,51 \pm 0,13
SGR	0,92 \pm 0,24	0,95 \pm 0,22	0,98 \pm 0,10	1,16 \pm 0,21

O aumento em peso durante os 30 dias de experiência encontra-se representado graficamente na figura 1.

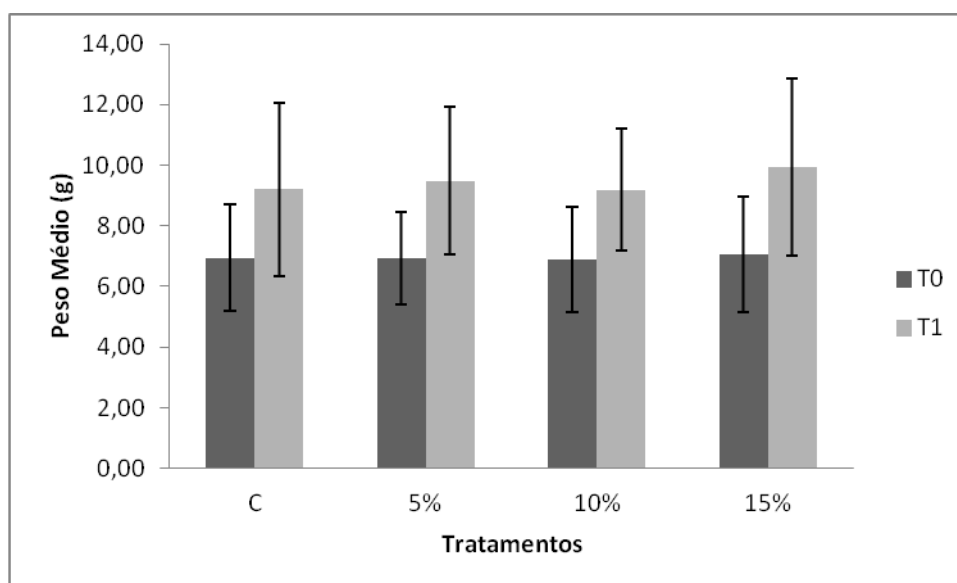


Figura 1- Crescimento em peso (g) por tratamento durante o período experimental (30 dias; 18°C). Amostragem inicial T0 e final T1. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão (n=3).

Após a amostragem T1 ocorreu uma elevada mortalidade em todos os tratamentos. Embora não existam diferenças significativas em termos de sobrevivência entre os

diferentes tratamentos aquele que apresenta maior percentagem sobrevivência é o tratamento com 10% de inclusão de EVOCOL, e o tratamento controlo é aquele que apresenta uma percentagem menor de sobrevivência, tal como consta na figura 2.

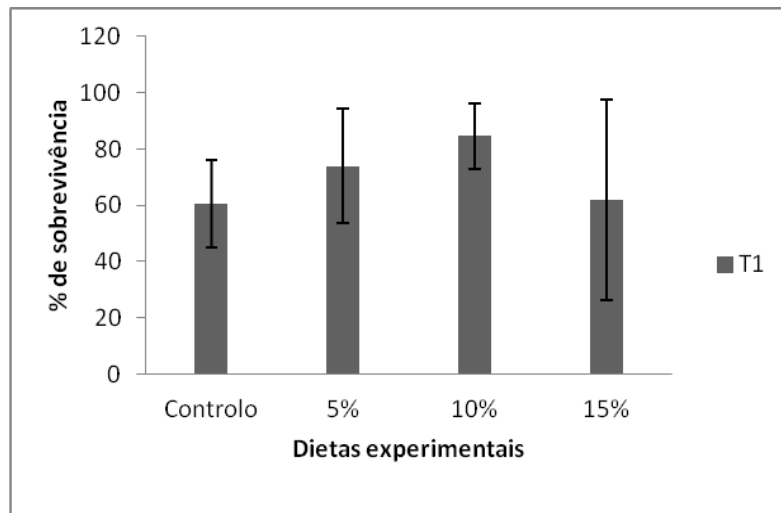


Figura 2- Percentagem de sobrevivência por tratamento no final da experiência de crescimento (T1). Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão (n=3).

Devido a esta mortalidade, a experiência deu-se por terminada. Os peixes sobreviventes foram mantidos nas respectivas unidades experimentais e alimentados com a dieta de recuperação (DR). Muito provavelmente devido a esta dieta, a mortalidade foi diminuindo gradualmente até estabilizar, só depois da estabilização da mortalidade se deu início à experiência de comportamento.

Experiência de comportamento:

Os indivíduos apresentaram diferenças no seu comportamento perante as diferentes dietas, sendo a dieta com 15 % de inclusão aquela que obteve mais reacções positivas, e na qual depois de iniciada a ingestão a maioria dos indivíduos seguia alimentando-se. Sendo esta também a que tem uma maior aceitação por parte dos indivíduos, seguida das dietas Comercial, e das dietas EVO 10, EVO 5%, e controlo. A dieta sem EVOCOL

(Controlo) é aceite pelos indivíduos, mas o seu índice de aceitação global é inferior ao verificado com as restantes dietas, esta é a dieta que apresenta o índice de continuação da ingestão mais baixo.

As dietas que apresentam um índice de aceitação mais elevado na orientação distante são a EVO10% (0,88) e as EVO 15% e Comercial (0,75). As dietas para as quais o índice de continuação da ingestão é superior é para as dietas EVO15% e Comercial, (0,63). Os valores dos índices encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Índice de Aceitação nas diferentes fases do comportamento alimentar de juvenis de linguado, e índice de aceitação global, das diferentes dietas testadas. Baseado na metodologia descrita por Reig *et al.*(2003).

	Índice de Aceitação			Índice de Aceitação Global (IAG)
	Orientação Distante	Orientação Próxima e Início da Ingestão	Continuação da ingestão	
Dieta Comercial	0,75	0,50	0,63	1,88
Dieta Controlo	0,63	0,50	0,25	1,38
Dieta EVO 5%	0,38	0,75	0,38	1,50
Dieta EVO 10%	0,88	0,63	0,50	2,00
Dieta EVO 15%	0,75	0,75	0,63	2,13

Os índices hepato-somático e visceral são semelhantes no início do acondicionamento (Ti) e no final da experiência de comportamento (T2), no início da experiência de crescimento (T0) o índice hepato-somático aumentou e o visceral diminuiu, comparativamente com os valores no momento de amostragem Ti e T2, tal como está representado na Tabela 6.

Tabela 6- Índices hepatosomático e visceral, nos diferentes momentos de amostragem, início do acondicionamento (Ti), início experiência de crescimento (T0) e final da experiência de comportamento (T2). Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão (n=6).

	Amostragens		
	Ti	T0	T2
HSI	1,04 \pm 0,17	1,42 \pm 0,58	1,05 \pm 0,26
VSI	3,95 \pm 0,68	2,34 \pm 0,25	3,89 \pm 0,36

Digestibilidade:

Utilizando as diferentes técnicas de recolha de fezes não foi possível a recolha de amostra suficiente para realizar a análise de digestibilidade das diferentes dietas experimentais

4. Discussão:

O período experimental decorreu durante 30 dias após a aclimação às condições laboratoriais. Durante o período experimental os juvenis não apresentaram uma elevada performance de crescimento, o que pode ser devido à qualidade do alimento oferecido ou à qualidade dos juvenis. O facto de esta experiência não contemplar réplicas alimentadas com uma dieta comercial não permite tornar claro qual o factor determinante para este resultado.

O fotoperíodo pode ter influência no crescimento, ingestão do alimento, digestibilidade e segregação de hormonas (Biswas, *et al.*, 2005; Boeuf and Bail, 1999). Durante esta experiência os juvenis de linguado encontraram-se expostos a dois fotoperíodos diferentes, um de 16 horas de escuridão e 8 de luz, e outro de escuridão permanente, excepto à hora de alimentar. Aparentemente o fotoperíodo com mais horas de escuro (penumbra) é favorável para o linguado, uma vez que estes após a alteração do fotoperíodo se encontravam mais tranquilos não apresentando um comportamento natatório errático.

Embora não existam muitos trabalhos sobre os níveis óptimos de proteína para os juvenis de *S. senegalensis* os trabalhos existentes apontam que o limite inferior seria 53% e o nível que garante uma maior deposição de proteína 60% (Rema *et al.*, 2008). As dietas experimentais formuladas têm um conteúdo proteico superior ao limite inferior estimado para esta espécie, o que em princípio deveria garantir que as necessidades proteicas estivessem asseguradas com as dietas experimentais. Um aumento no conteúdo proteico das dietas leva a um aumento da quantidade de proteína depositada pelos juvenis, o que se traduz num maior crescimento (Rema *et al.* 2008). Embora as dietas tenham níveis proteicos superiores ao nível mínimo este aumento na quantidade de proteína não se traduziu num maior crescimento dos juvenis, talvez porque estes estivessem a utiliza-la como substrato energético e não para o crescimento.

As dietas para juvenis de *S. senegalensis* não devem conter um elevado teor em lípidos neutros, pois dietas contendo um nível elevado de óleo de peixe tendem a resultar num

baixo crescimento e numa baixa conversão do alimento, bem como o aumento a susceptibilidade de oxidação, baixa condição física, alteração do fígado a nível histológico e acumulação de lípidos nos tecidos corporais. As taxas de crescimento e de conversão do alimento são mais elevadas quando os peixes são alimentados com dietas contendo um baixo teor lipídico (Rueda-Jasso *et al.*, 2004).

Outros trabalhos realizados com esta espécie também sugerem que dietas com um baixo conteúdo lipídico promovem um aumento da performance de crescimento dos juvenis de *S. senegalensis*, não levando o aumento do conteúdo lipídico a nenhum efeito benéfico no crescimento. (Dias *et al.* 2004; Borges *et al.*, 2009). As dietas utilizadas na presente experiência tinham níveis lipídicos em torno dos valores que segundo os estudos realizados levam a um aumento da performance de crescimento

Embora os níveis proteicos e lipídicos das dietas estejam de acordo com as referências bibliográficas, os resultados observados em termos de crescimento, não são os melhores quando comparados com os resultados obtidos em trabalhos realizados para a mesma espécie.

O ganho em peso dos juvenis é normalmente um indicador fiável da adequação dos regimes de manutenção e nutricionais (Cho and Kaushik 1990). Neste caso o ganho em peso foi inferior ao obtido em trabalhos similares o que pode sugerir que a dieta formulada não estava adequada para a alimentação dos juvenis ou que o regime de manutenção não foi o melhor.

Os valores de PER nesta experiência variam entre 1,26 e 1,75, os valores mais baixos podem indicar uma utilização do alimento menos eficiente. O VFI para todos os tratamentos é baixo, o facto de este valor ser tão baixo pode justificar o baixo crescimento apresentado pelos juvenis nos diferentes tratamentos. Esta justificação está de acordo com as observações feitas em outros estudos, onde o crescimento dos animais está justificado pela ingestão do alimento (Rema *et al.* 2008; Rubio *et al.*, 2009). Em trabalhos realizados com *Solea aegyptiaca*, os valores de PER são superiores aos valores apresentados por *S. senegalensis* na presente experiência (Bonaldo *et al.*, 2006).

Os linguados alimentam-se no fundo o que torna difícil estimar a sua saciedade. O seu comportamento bentónico leva a que parte do alimento fique retido por baixo do corpo, tornando difícil estimar a sua saciedade. O alimento estava disponível 3 vezes por dia, no entanto por apenas 30 minutos aproximadamente, o que pode ter sido pouco tempo para que estes se alimentassem. Este facto pode ter levado a uma baixa taxa de ingestão.

Uma forma de aumentar a ingestão seria utilizar alimentadores a pedido, dado que segundo os resultados obtidos com linguado, estes têm a capacidade de operar este tipo de dispositivo, desta forma permitia-se que adequassem a sua alimentação ao seu comportamento nocturno de alimentação (Navarro *et al.*, 2009). Assim *S. senegalensis* aparenta regular a sua ingestão diária, mostrando um comportamento de alimentação compensatório para assegurar as suas necessidades alimentícias (Rubio *et al.*, 2009).

O melhor método para determinar o SGR é o cálculo baseado no peso individual, mas para tal teríamos que ter todos os peixes marcados, por este facto, a melhor alternativa seria calcular o SGR baseado na média do peso inicial e final. No caso de ocorrer mortalidade este método de cálculo pode introduzir erros no cálculo do SGR (Schram *et al.*, 2006). Neste estudo o cálculo do SGR pode não ser o mais correcto devido à elevada mortalidade registada nesta experiência.

A maior sobrevivência dos juvenis do tratamento com 10% de inclusão de EVOCOL, pode sugerir que esta dieta se adequa mais às necessidades nutricionais dos juvenis, o que lhes conferiu uma maior resistência ao episódio de stress que representou o corte de água e ar.

O índice hepatosomático é utilizado muitas vezes como um indicador de condição e do estado nutricional do peixe. Em trabalhos anteriores foi referido que um incremento significativo no HSI pode ser influenciado por uma maior quantidade de lípidos na dieta (Rueda-Jasso *et al.*, 2004), ou devido a agentes stressantes como a elevada densidade (Costas *et al.*, 2008). Os valores do índice hepatosomático na amostragem T0 são superiores aos valores obtidos nas amostragens Ti e T2, este facto pode estar relacionado com a dieta, visto que no período entre a amostragem Ti e T1 estes foram alimentados com

a dieta controlo. O facto de o índice ser mais elevado pode estar relacionado com o facto de que esta não ser a mais adequada para alimentar os juvenis de *S. senegalensis*. Na amostragem T2 os valores do índice hepatosomático são mais baixos que os obtidos na amostragem T0, isto pode dever-se a que a dieta de recuperação se adeque melhor às necessidades nutricionais de linguado.

Comparar os resultados obtidos com este trabalho para esta espécie é complicado devido à falta de trabalhos publicados sobre a utilização de vinhaças na alimentação de peixes. Este ingrediente foi testado na formulação de dietas para gado (Weigand and Kirchgessner, 1980; Waliszewski *et al.*, 1997) para Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Chien *et al.*, 2005) e para peixe-leite (*Chanos chanos*) (Chien and Chen, 2007).

Inicialmente este ingrediente contém um elevado teor em sais, principalmente potássio, o que o torna tóxico para os animais. As vinhaças podem passar por um processo no qual lhes é extraído parte dos sais, sendo que deste modo se pode utilizar mais facilmente como fertilizante (Decloux *et al.*, 2002), e para a alimentação animal uma vez que o elevado conteúdo em sais é prejudicial para o crescimento destes (Manfredini and Cavani 1980). O seu elevado teor em sais pode levar a problemas de osmoregulação (Stemme, *et al.*, 2005).

Os trabalhos realizados em peixes sugerem que, um aumento nos níveis de inclusão de vinhaça, levam a uma diminuição do crescimento bem como da eficiência de conversão do alimento (Chien *et al.*, 2005; Chien and Chen, 2007). Nesta experiência a inclusão de 10% ou 15% de EVOCOL aparentemente não têm um efeito negativo no crescimento dos juvenis de linguado, embora os valores de PER sejam superiores para a dieta controlo. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para pregado (*Scophthalmus maximus*), no qual a inclusão de 15% de EVOCOL não teve efeitos negativos para o crescimento (Soliño *et al.*, 2009). As dietas experimentais não apresentam diferenças significativas no que diz respeito ao conteúdo proteico e lipídico o que pode justificar este resultado, uma vez que nos trabalhos realizados com *O. niloticus* e *C. chanos* as dietas com valores de inclusão superior têm níveis proteicos e energéticos mais baixos. No trabalho realizado com Tilapia considera-se a vinhaça uma fonte alternativa de proteína para substituir a farinha de

soja na alimentação desta espécie, uma substituição de 6,7 % não afecta o crescimento nem a eficiência de conversão do alimento.

As vinhaças contêm um elevado conteúdo de azoto, a maior parte são aminoácidos, entre eles betaína (Lewicki, 2001), estes são estimulantes do apetite (Sanz *et al.*, 2000), este facto pode justificar a ingestão de alimento significativamente superior para as dietas com inclusão de EVOCOL comparativamente com a dieta controlo, embora este aumento não se reflecta no crescimento.

A inclusão de vinhaça em dietas para peixe pode ser benéfica uma vez que a betaína parece suprir em parte as necessidades de colina em dietas experimentais utilizadas no cultivo de tilapia (*O. niloticus*) (Kasper *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos sugerem que na alimentação de peixes este ingrediente pode ser utilizado numa proporção superior àquela que se recomenda para gado, uma vez que, para a alimentação de gado sugere-se uma inclusão de 3% (FEDNA, 2003).

As vinhaças de beterraba têm um elevado conteúdo de betaína e amino-ácidos livres (Decloux *et al.*, 2002; Chapoutot, 1985) o que faz deste ingrediente ideal para ser incluído como um estimulante de apetite na alimentação de peixes, e desta forma garantir uma melhor aceitação por parte dos indivíduos, diminuindo os desperdícios de alimento. De acordo com os resultados obtidos a dieta EVO 15 % tem um IAG (índice de aceitação global) superior ao da dieta comercial, o que pode significar que a vinhaça devido ao seu elevado conteúdo em amino-ácidos livres e betaína tem propriedades estimulantes do apetite, aumentando desta forma a ingestão do alimento. Das dietas experimentais aquela que apresenta um valor de IAG mais baixo é a dieta controlo (EVO 0%), que embora os indivíduos inicialmente se aproximem do alimento poucos continuam a ingestão, o que pode indicar uma menor palatabilidade desta dieta comparativamente com as dietas que contêm EVOCOL.

A determinação da digestibilidade aparente das diferentes dietas experimentais seria um dado importante para clarificar a utilização destas pelos juvenis. Embora neste trabalho se

tenha tentado a recolha de fezes recorrendo a diferentes métodos, não foi possível recolher amostra suficiente para realizar esta análise.

Considerações Finais:

O EVOCOL pode ser incluído nas dietas para juvenis de linguado numa taxa superior à aconselhada para gado. A inclusão deste ingrediente numa taxa de 15% (peso húmido) não prejudica o crescimento dos juvenis, no entanto seriam necessários estudos de crescimento mais longos, para avaliar o efeito deste ingrediente ao longo do tempo, a nível do ganho de peso, índices nutricionais e sobrevivência dos indivíduos.

Existe a necessidade de efectuar mais estudos para avaliar a capacidade deste ingrediente como atraente e estimulante do apetite. De acordo com os resultados obtidos a dieta EVO 15% tem um índice de aceitação global mais elevado que a dieta comercial, o que pode sugerir que a inclusão deste ingrediente pode aumentar a ingestão das dietas formuladas para linguado.

Seria importante avaliar a possibilidade de este ingrediente poder suprir em parte as necessidades de colina em dietas para peixes marinhos, tal como se verificou em dietas utilizadas em tilapia.

A utilização deste ingrediente em dietas constitui uma forma de valorizar um subproduto com uma grande quantidade de matéria orgânica e de difícil degradação. Representando assim uma mais-valia a nível ambiental.

5. Referências:

Aragão, C., Conceição, L., Martins, D., Rønnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293–304.

Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13, 265–272.

Basurco, B., Abellán, E., 1999. Finfish species diversification in the context of Mediterranean marine fish farming development. in: Abellan, E., Basurco, B. (Eds.), *Marine Finfish Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture*. Options Mediterranéennes. FAO, serie B: Etudes et Recherches, pp.9–25.

Biswas, A., Seoka, M., Inoue, Y., Takii, K., Kumai, H., 2005. Photoperiod influences the growth, food intake, feed efficiency and digestibility of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture* 250, 666–673.

Boeuf, G., Bail, P., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* 177, 129–152.

Bonaldo, A., Roem, A. J., Pecchini, A., Grilli E., Gatta, P. P., 2006. Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. *Aquaculture* 261, 580–586.

Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L.M.P., 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Br. J. Nutr.* 102, 1007–1014.

Cañavate, J., 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4), 147–154.

Chapoutot, P. 1985. Las vinazas de melaza: Un alimento interesante. Frisona Española 29, 79–84.

Chien, Y., Chen., C., Chen, J., 2005. Substitution of defatted soybean meal with condensed molasses fermentation solubles in diets for fingerling Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). J. Fish. Soc. Taiwan 32(4), 317-325.

Chien, Y., Chen., C., 2007. Substitution of defatted soybean meal with condensed molasses fermentation solubles in diets for Fingerling Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). J. Fish. Soc. Taiwan 34(1), 11–20

Cho, C. Y., Kaushik, S. J., 1990, Nutritional energetic and protein utilization in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). World Rev. Nutr. Dietetics 61, 132–172.

Conceição, L., Grasdalen, H., Rønnestad, I., 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. Aquaculture 227, 221–232.

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

Costas, B., Aragão, C., Mancera, J., Dinis, M., Conceição, L., 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. Aquaculture Research 39, 1–9.

Decloux, M., Bories, A., Lewandowski, R., Fargues, C., Mersad, A., Lameloise, M., Bonnet, F., Dherbecourt, B., Osuna, L., 2002. Interest of electro dialysis to reduce potassium level in vinasses. Preliminary experiments. Desalination 146, 393–398.

Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., da Conceicao, L.E.C., Gomes, E.F., Dinis, M.T., 2004. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). Aquac. Res. 35,1122–1130.

Dinis, M., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176, 27–38.

FAO. State of World Aquaculture. (2006) FAO Fisheries Technical Paper. No.500.Rome,FAO,145pp.http://www.fao.org/cgi/servlet/static?dom=root&xml=aquaculture/regional_reviews_list.xml

Fernández, B., Bodas, R., López-Campos, Ó., Andrés, S., Mantecón, A. R., Giráldez, F. J., 2009. Vinasse added to dried sugar beet pulp: Preference rate, voluntary intake, and digestive utilization in sheep. *J Anim Sci.* 87, 2055–2063.

FEDNA. 2003. Índice Tablas FEDNA de ingredientes para piensos (2003). <http://www.etsia.upm.es/fedna/tablas.htm> (Janeiro 2010)

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509.

Gatlin, D., Barrows, F., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T., Hardy, R., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38, 551–579.

Howell, B., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355–365.

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

Kaushik, S. G., 1999. Feed formulation, diet development and feed technology; CIHEAM - Options Méditerranéennes.

Karalazos, A., Swan, H., 1977. The nutritional value for sheep of molasses and condensed molasses soluble. *Animal Feed Science and Technology* 2, 143–152.

Kasper, C., White, M., Brown, P., 2002. Betaine can replace choline in diets for juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 205, 119–126.

Lewicki, W., 2001. An introduction to vinasse (cms) from beet and cane molasses fermentation. *Int. Sugar Jnl.* 103, 126–128.

Maertens, L., Ducatelle, R., De Groote, G., 1994. Influence de l'incorporation alimentaire d'une vinasse a taux élevé de parois cellulaires de levure sur les performances du lapin en engraissement. *Word Rabbit Science* 2 (1), 15–19.

Manfredini, M., Cavani, C., 1980. Distillery effluents as animal feed: the use of condensed Beet molasses stillage (cbms) in broiler feeding. *Animal Feed Science and Technology* 5, 233–239.

Morais, S., Conceição, L., Rønnestad, I., Koven, W., Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Dinis, M.T., 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture* 268, 106–122.

Naylor, R., Goldberg, R., Primavera, J., Kautsky, N., Beveridge, M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017–1024.

Navarro, D., Rubio, V., Luz, R., Madrid, J., Sánchez-Vázquez, F., 2009. Daily feeding rhythms of Senegalese sole under laboratory and farming conditions using self-feeding systems. *Aquaculture* 291, 130–135.

Reig, L., Ginovart, M., Flos, R., 2003. Modification of the feeding behaviour of sole (*Solea solea*) through the addition of a commercial flavour as an alternative to betaine. *Aquat. Living Resour.* 16, 370–379.

Rema, P., Conceição, L.E.C., Evers, F., Castro-Cunha, M., Dinis, M.T., Dias, J., 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquac. Nutr.* 14, 263–269.

Robaina. L., Izquierdo, M. (1999); Methodological strategies for the determination of nutrient requirement in fin fish; CIHEAM - Options Mediterraneennes, pp. 25-49.

Rodríguez, J. L., Souto. B. F., 2003. Engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) en Galicia con temperatura controlada. In: *IX Congreso Nacional de Acuicultura (Cádiz, mayo 2003). La acuicultura como actividad económica en las zonas costeras: Libro de Resúmenes (12-16 de mayo, 2003. Cádiz, España): 407-409.*

Rønnestad, I., Conceição, L., Aragão, C., Dinis, M.T., 2000. Free Amino Acids Are Absorbed Faster and Assimilated More Efficiently than Protein in Postlarval Senegal Sole (*Solea senegalensis*). American Society for Nutritional Sciences, 2809–2812.

Rubio, V.C., Boluda Navarro, D., Madrid, J. A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Macronutrient self-selection in *Solea senegalensis* fed macronutrient diets and challenged with dietary protein dilutions. *Aquaculture* 291, 95–100.

Rueda-Jasso, R., Conceicao, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T., Sorgeloos, P., 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231, 417–433.

Sá, R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of dietary protein and lipid levels on growth and feed utilization of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 12, 310–321.

Sanz, A., García Gallego, M., De La Higuera, M., 2000. Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *J. Physiol. Biochem.* 56, 275–282.

Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A., Verdegem, M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252, 339– 347.

Silva, J.M.G., Espe, M., Conceição, L.E.C., Dias, J., Valente, L.M.P., 2009. Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) grow equally well on diets devoid of fish meal provided the dietary amino acids are balanced. *Aquaculture* 296, 309–317.

Singh, R., Dhawan, A., Saxena, P.K., 1999. Potential of press mud a sugar factory byproduct in supplementary diets and its impact on fish growth. *Bioresource Technology* 67, 61–64.

Soliño, L., Lastra, M., Matus de la Parra, A., Hernandez, J., Toledo, P., Viana, M.T., 2009. Evaluación del EVOCOL, co-producto de la fabricación de alcohol, en dietas para juveniles de Rodaballo *Scophthalmus maximus*. In: *Resúmenes // Simposio Internacional de Ciencias del Mar, 2009 (ISMS09)*, Vigo-España. (Troncoso, J.S., Alejo, I., López, J., eds.) Facultad de Ciencias del Mar – Vigo. pp. 165.

Stemme, K., Gerdes, B., Harms, A., Kamphues, J., 2005. Beet-vinasse (condensed molasses solubles) as an ingredient in diets for cattle and pigs – nutritive value and limitations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89, 179–183.

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P., Bell, J.G., 2008. Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the artemia feeding period. *Aquaculture Nutrition* 14, 232–241.

Waliszewski, K.N., Romero, A., Pardo, V.T., 1997. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. *Animal Feed Science Technology* 67, 253–258.

Weigand, E., Kirchgessner, M., 1980. Protein and energy value of vinasse for pigs. *Animal Feed Science and Technology* 5, 221–231.