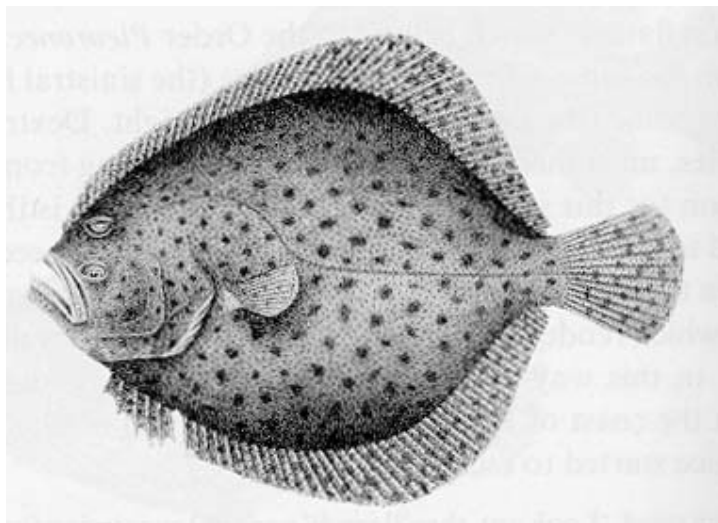


Bruno Graziano da Silva Turini

Os efeitos da carnitina no crescimento e na composição corporal do pregado (*Scophthalmus maximus*) mantido sobre diferentes densidades de estabulação.



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
2008

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de
Mestre em Ciências do Mar-Recursos Marinhos,
especialidade em Aquicultura

Resolução 12/SC/95, D.R. nº 169, II série, de 24 de Julho de 1995

Orientação: Rodrigo Otávio de Almeida Ozório
Co-orientação: José Fernando M. Gonçalves

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para conhecer o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio tecto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver" - Amyr Klink, Mar Sem Fim.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo O. A. Ozório, que me acolheu como seu orientado e efectivamente fez-se presente em todas as etapas deste trabalho, prestando sua excelente orientação desde a idealização até a publicação. Meu sincero muito obrigado, pela amizade, oportunidade de convívio e pelo admirável exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. José Fernando M. Gonçalves, pela oportunidade profissional proporcionada ao aceitar-me como seu co-orientado e me proporcionar todas as condições de trabalho dentro de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Emídio Gomes, pelo incentivo, disponibilidade e atenção demonstrada no decorrer do trabalho.

Aos funcionários Bruno Ramos e Hugo, que me auxiliaram durante o período experimental.

Aos amigos do mestrado e estagiários que passaram pelo Laboratório de Nutrição e Qualidade.

Aos amigos “Rocamboles”, que mesmo distantes sempre estiveram presentes, me incentivando a cada desanimo que aparecia e torcendo por mim.

Aos meus pais e aos meus irmãos por me fazerem ver a realidade e me darem força e determinação para eu seguir o meu caminho.

A querida amiga Liliana, por ter me apoiado e se mantido ao meu lado em todos os momentos, seu amor foi fundamental para que eu alcançasse esse objectivo.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, por não terem permitido que eu fraquejasse nos momentos em que passei por grande provação. Muito Obrigado!

RESUMO

Um dos problemas encontrados na produção intensiva de pregado, *Scophthalmus maximus*, consiste na disparidade de tamanhos durante a fase de crescimento, resultando na formação de grupos com crescimentos diferenciados dentro do lote, os cabeças ou “fast growers” e os caudas ou “slow growers”, sendo esta diferença parcialmente atribuída ao uso de instalações precárias e a más condições de estabulação. O cultivo utilizando elevadas densidades é interessante por otimizar o uso das estruturas produtivas e assim reduzir os custos de produção, contudo, pode ter consequências inversas ao esperado, ocasionando o desenvolvimento de indivíduos de crescimento retardado, tornando assim o processo produtivo mais lento e oneroso. Além disso, os altos níveis de metabólitos libertados em um sistema semi-fechado de produção intensivo provoca a rápida deterioração da qualidade da água, podendo também comprometer a performance da produção.

A L-carnitina, um aditivo multi-fisiológico, bioactivo e livre de poluição, conhecida por funcionar como uma potenciadora do crescimento, parece ser promissora por atenuar ou mesmo reverter alguns desses efeitos. A carnitina parece promover também a protecção contra as variações na qualidade da água, incluindo a toxicidade à amónia, além de reduzir o nível de excreção de amónia pelos peixes, pela redução do catabolismo proteico.

O principal objectivo deste estudo foi avaliar os efeitos da carnitina no crescimento e na composição corporal do pregado mantido sob diferentes densidades de estabulação. Grupos de juvenis de pregado (“slow growers”) foram mantidos sob quatro densidades de estabulação (densidades iniciais: 4, 8, 11 e 14 kg/m²). Os peixes foram alimentados durante 75 dias, duas vezes por dia, com dietas iso-nitrogenadas e isoenergéticas (39% proteína, 18% lípidos e 19.5kJ/g), contendo um nível de carnitina de 40 ou 240 mg/kg. Um efeito significativo da densidade de estabulação sobre a taxa de crescimento e sobrevivência dos pregados foi observado durante o período experimental. Os peixes cultivados a 4 kg/m² apresentaram melhores taxas de crescimento, ganho de peso e sobrevivência em comparação aos mantidos a 8, 11 ou 14 kg/m². O crescimento, a eficiência de utilização da dieta e a composição corporal não foram significativamente afectados pela suplementação dietética de carnitina. Não foi observada qualquer interacção entre a densidade de estabulação e a concentração de carnitina. Os peixes alimentados com 40 mg/kg de carnitina apresentaram uma excreção azotada

significativamente superior 4 horas pos-prandial quando comparados com os peixes alimentados com a dieta contendo 240 mg/kg de carnitina.

Conclui-se que o crescimento de juvenis de pregado não foi beneficiado pela suplementação com carnitina, mas pode ser significativamente melhorado pela estabulação dos peixes a densidades inferiores às descritas noutros trabalhos de investigação.

ABSTRACT

One of the problems in intensive production of turbot, *Scophthalmus maximus*, is the size disparities during growout stage, causing the formation of groups with different growth rates in the same lot, the fast growers and the slow growers, that could be partly attributed to a poor husbandry facilities and stocking conditions. Although interesting the high stocking density production by optimising the use of production structures and so reducing production costs, the use of high densities may cause opposite results, leading to the development of slow grower's individuals, which makes the process more expensive. Moreover, the high levels of accumulated waste in a semi-closed intensive system may cause rapid deterioration of water quality and therefore may undermine the commercial production.

L-carnitine, a multi-physiological, bioactive and pollution-free additive, is known to act as a growth-enhancer and appear to be promising by mitigating or even reverse some of these effects. In addition, carnitine seems to provide protection against changes in water quality, including ammonia toxicity, and also reduce the ammonia excretion level by reducing protein catabolism.

The main objective of this study was to evaluate the effects of dietary carnitine on growth performance and body composition of turbot kept under different stocking densities. Groups of juvenile turbot selected as slow-grower individuals were reared at four different densities (4, 8, 11 and 14 kg/m²). Fish groups were fed two times a day, with one of two iso-nitrogenous and isoenergetic diets (39% protein, 18% lipids e 19.5kJ/g), each containing a carnitine level of 40 or 240 mg/kg, during 75 days. Stocking density had a significant effect on growth performances and survival over the experimental period. Fish held at 4 kg/m² showed the highest growth rates, mean weights and survival than fish held at 8, 11 or 14 kg/m². Fish fed 40mg carnitine had significantly higher posprandial nitrogen excretion than fish fed 240mg carnitinel. It is concluded that growth performance, feed utilization and body composition were not

significantly affected by dietary carnitine concentration, and no interaction was observed between stocking density and carnitine.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Panorama Mundial da Aquicultura	1
1.2. A aquicultura portuguesa.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. O Pregado (Rodvalho) – Descrição Geral	3
2.1.1. Sistemática.....	3
2.1.2. Nomes Vulgares	3
2.1.3. Características gerais	3
2.1.4. Habitat	4
2.1.5. Alimentação.....	4
2.1.6. Histórico de produção da espécie	4
2.1.7. Produção intensiva.....	5
2.1.8. Estatísticas de produção	6
2.2. Densidade de estabulação e efeitos no crescimento	6
2.3. Alimentos Estimulantes em dietas de peixes.....	7
2.4. Carnitina	11
2.4.1. Descrição geral	11
2.4.2. O porquê da suplementação com carnitina.....	11
2.4.3. Efeito da carnitina no crescimento dos peixes	12
2.4.4. A carnitina e seus efeitos na composição corporal.....	13
3. HIPÓTESES E OBJECTIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1. Local e instalações.....	16
4.2. Condições pré-experimentais	16
4.3. Delineamento experimental.....	16
4.4. Dietas, Alimentação e Condições Experimentais.....	17
4.5. Parâmetros indicadores de desempenho	19
4.6. Recolha das amostras para análise de composição corporal	20
4.7. Métodos Analíticos.....	21
4.7.1. Análise da Composição Corporal	21
4.7.1.1. Humidade	21
4.7.1.2. Cinza.....	21
4.7.1.3. Gordura Bruta.....	21
4.7.1.4. Proteína Bruta	22
4.7.1.5. Energia.....	22
4.8. Determinação da produção de azoto em estado pós-prandial.....	22
4.9. Análise estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Parâmetros Indicadores do desempenho.....	24
5.2. Excreção pós-prandial	29
5.3. Composição corporal.....	30

6. DISCUSSÃO	35
6.1. Parâmetros físico-químicos dos tanques	35
6.1.1. Variação do oxigénio dissolvido, temperatura e salinidade	35
6.1.2. Variação da amónia ionizada e dos nitritos	35
6.2. Efeitos dos parâmetros químicos da água no crescimento	36
6.3. Efeitos da densidade de estocagem no crescimento	37
6.4. O efeito da carnitina no crescimento	41
6.5. A excreção pós-prandial e os efeitos da carnitina	43
6.6. Efeito da carnitina na composição corporal	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8. PUBLICAÇÕES E PRÉMIOS	60
9. ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama Mundial da Aquacultura

Actualmente a produção mundial de organismos aquáticos proveniente da pesca de captura vem sofrendo um ligeiro declínio, devido ao facto das principais áreas pesqueiras terem atingido seu máximo de exploração. A sobrepesca nessas áreas, aliada à degradação do ambiente natural, tem contribuído de forma determinante para que inúmeras espécies aquáticas atinjam rapidamente seu máximo potencial de sustentabilidade (Selock, 2001). Embora a pesca oceânica de algumas espécies não tenha diminuído nos últimos anos do século passado, a actividade pesqueira é actualmente reconhecida como saturada (Sargent e Tacon, 1999).

A aquacultura, actividade cuja finalidade é a produção, o processamento e a comercialização de plantas e organismos aquáticos de água doce, salobra e salgada, surge com o objectivo de aumentar a oferta de alimentos através do desenvolvimento de uma actividade sustentável, garantindo desta forma que os impactos provocados no ambiente sejam reduzidos. Tem como principal objectivo a produção de proteína de origem animal para consumo humano, cumprindo assim o princípio básico de aumentar a quantidade de alimento disponível e agregar valor aos alimentos produzidos.

A última década testemunhou um elevado crescimento e desenvolvimento da aquacultura mundial, tendo a produção de organismos aquáticos crescido de 33.310.349 toneladas para 35.585.111 toneladas em 2000 (FAO, 2006). A aquacultura continua a crescer mais rapidamente do que qualquer outra actividade produtora de proteína animal, representando um crescimento de 8,8 % ao ano (tomando por referência o ano de 1970), crescimento muito superior comparativamente aos 2,8 % verificados nos restantes sistemas terrestres de produção animal. A contribuição da actividade aquícola para o abastecimento mundial de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos representava, em 2004 cerca de 32,4 % do total da produção de organismos aquáticos. Nos últimos anos passou por progressos significativos, passando de uma produção de menos de 1 milhão de toneladas no início da década de 1950 para os 54,9 milhões de toneladas em 2004; e representa actualmente um volume de negócios de 70,3 biliões de dólares (FAO, 2006).

Da mesma maneira que a aquacultura regista um crescimento notável, observa-se também um aumento no número de espécies cultivadas. Dentre as espécies de animais mais

cultivados é possível destacar os peixes de água doce (ciprinídeos e tilápias), crustáceos, alguns moluscos e os peixes diádromos (**Tabela I**).

Tabela I – Produção aquícola mundial: taxa média anual de crescimento para diferentes grupos de espécies

PERÍODO	CRUSTÁCEOS	MOLUSCOS	PEIXES ÁGUA DOCE	PEIXES DIÁDROMOS	PEIXES MARINHOS	TOTAL
1970-2004	18,9	7,7	9,3	7,3	10,5	8,8
1970-1980	23,9	5,6	6	6,5	14,1	6,2
1980-1990	24,1	7	13,1	9,4	5,3	10,8
1990-2000	9,1	11,6	10,5	6,5	12,5	10,5
2000-2004	19,2	5,3	5,2	5,8	9,6	6,3

1.2. A aquacultura portuguesa

A aquacultura em Portugal é uma actividade relativamente antiga, tendo surgido no mesmo período que outros países europeus. No entanto, somente a partir da década de 80, quando as políticas de desenvolvimento da Comunidade Económica Europeia foram aplicadas é que esta actividade foi impulsionada. Entre 1990 e 1997 observou-se um crescimento de 27% desta actividade.

Em Portugal a actividade aquícola distribui-se por águas doces, salgadas e salobras. A produção de espécies marinhas realiza-se tradicionalmente em tanques de terra (regime extensivo/semi-intensivo), sustentando a sua actividade na produção, quase exclusiva, de dourada e robalo, à semelhança do que ocorre nos países do sul da Europa, com maior produção aquícola. Actualmente, o mercado está saturado com estas espécies, o que se traduz na sua dificuldade de comercialização, facto que é agravado por países como a Grécia e a Turquia, colocarem os seus produtos no mercado a preços altamente competitivos.

De forma a aumentar a competitividade e rentabilizar a actividade aquícola, é essencial diversificar a oferta com espécies alternativas ou formas de comercialização complementares. Das possíveis alternativas, o pregado (*Scophthalmus maximus*), de elevado valor comercial é, do ponto de vista zootécnico, uma das espécies mais promissoras para a aquicultura. Tal facto deve-se a características tais como robustez física e resistência a condições adversas (nomeadamente capacidade de adaptação a salinidades bastante variáveis), do conhecimento do seu ciclo de vida em cativeiro (FAO, 2007) aliadas a uma taxa de crescimento interessante nas nossas condições climáticas (Carvalho e Diniz, 1998).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Pregado (Rodvalho) – Descrição Geral

2.1.1. Sistemática

Segundo Parker (1982), o pregado apresenta a seguinte classificação sistemática:

Superclasse: Pisces

Classe: Osteichthyes

Superordem: Teleosteos

Ordem: Pleuronectiformes

Família: Scophthalmidae

Género: *Scophthalmus*

Espécie: *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810) = [*Psetta maxima* (Lineu, 1758)]

2.1.2. Nomes Vulgares

Pregado, Rodvalho (Portugal)

Rodoballo (Espanha)

Turbot (Estados Unidos, França, Inglaterra)

Rombo chiodat (Itália)

Steinbutt (Alemanha)

Rómbus-pisci (Grécia)

2.1.3. Características gerais

O pregado é um teleósteo marinho caracterizado morfológicamente pelo corpo em formato oval, quase circular. É um peixe plano, de simetria dorso-ventral (Carvalho e Diniz, 1998). A face cega (direita) apresenta coloração esbranquiçada e a face ocular possui coloração variável, geralmente cinzenta – acastanhada, com manchas escuras (FAO, 2007). Na pele não apresenta escamas, mas saliências de origem quitinosa, placas córneas cobertas de muco. A boca é relativamente grande (Munroe, 2005), torta e arqueada, uma vez que durante a metamorfose sofre deslocação (Carvalho e Diniz, 1998). Apresenta duas barbatanas pélvicas (levemente assimétricas) que se estendem da parte anterior a *urohyal*, e o processo supra-occipital é alongado, formando uma ponte com a margem dorsal do osso

frontal do lado cego (Chapleu, 1993; Munroe, 2005). A barbatana caudal tem arcos ósseos cobertos de pele e junto da barbatana peitoral existe geralmente uma mancha.

2.1.4. Habitat

O *Scophthalmus maximus* possui coloração críptica: imita a coloração do substrato (FAO, 2007). É uma espécie bentónica, que vive na areia e nos fundos enlameados, sendo encontrada desde as águas superficiais até aos 100 m de profundidade. Os juvenis tendem a viver nas áreas mais enlameadas. Esta espécie é altamente afectada por perturbações no fundo dos oceanos, devido principalmente a sua afinidade bentónica (Link *et al.*, 2005). Os impactos provenientes da pesca no fundo dos oceanos (arrasto, dragagem, etc.) podem alterar criticamente o habitat, a dinâmica trófica, e também a sobrevivência (particularmente dos juvenis) em muitos ecossistemas.

2.1.5. Alimentação

O pregado é uma espécie piscívora. Os juvenis alimentam-se geralmente de moluscos e crustáceos e os adultos sobretudo de cefalópodes e peixes (Menú e Person, 1991). Os peixes contribuem com 40-80% de toda a alimentação desta espécie e, em casos extremos, podem representar mais de 90% da alimentação (Link *et al.*, 2005).

2.1.6. Histórico de produção da espécie

A produção aquícola de pregado teve início na Escócia na década de 1970. A espécie foi posteriormente introduzida na França e na Espanha. Inicialmente, o número de instalações na Espanha era limitado devido à escassez de juvenis tendo o desenvolvimento de tecnologias de produção de juvenis, alterado este cenário. No início da década de 1990 já existiam 16 produtores na Espanha. O ano de 1992 foi marcado por uma crise no cultivo do pregado, com o aumento de 52% da produção, mas com a falta de investimentos em marketing comercial. Outro factor importante, que contribuiu para esta crise, foi o facto das unidades de produção serem pequenas, não sendo capazes de suportar os altos custos de produção, tendo como consequência a falência de muitas empresas. A partir daquele momento, iniciou-se uma reorganização no sector, impulsionando-se assim o aumento da produção (Carvalho e Diniz, 1998). A Espanha é hoje o maior produtor mundial, mas o pregado também é produzido na Dinamarca, Alemanha, Islândia, Irlanda, Itália, Noruega, Portugal e, brevemente, também será produzido na Holanda (FAO, 2007). Em Portugal, a

actividade de produção de pregado teve início na década de 1980, com a instalação da primeira piscicultura na região Norte do país (Carvalho e Diniz, 1998).

2.1.7. Produção intensiva

O pregado é considerado uma espécie promissora para a produção intensiva, não só devido às boas perspectivas de mercado, como ainda às boas características da espécie a nível zootécnico: robustez física, ciclo de produção bem controlado, boa taxa de crescimento, conhecimento das principais doenças, etc. Além disso, a introdução de novas tecnologias de produção têm impulsionado a produção desta espécie (Jones e Howell, 1995). Como será pormenorizado adiante, um dos maiores problemas relacionados com a produção intensiva desta espécie consiste na disparidade de crescimento entre os indivíduos da mesma idade. Os factores extrínsecos explicam em parte este crescimento heterogéneo, mas, os factores genéticos também não devem deixar de ser considerados. Alguns pesquisadores como Gjedrem (1997) estimam que, em 1993, menos de um por cento do total da produção mundial da aquacultura foi obtida a partir de linhagens melhoradas. O caso de pregado não é diferente. Embora já se tenham iniciado programas de melhoramento genético para a espécie (Coughlan *et al.*, 1998), ainda hoje muitas empresas aquícolas continuam a utilizar animais provenientes do ambiente natural (selvagens) nos seus sistemas de produção. A ausência de programas de selecção e melhoramento genético para a espécie acaba por dar origem a descendentes com uma enorme variabilidade genética. As características herdadas, associadas a uma maior ou menor capacidade de hiperplasia muscular pode ser um dos factores que condiciona a formação de grupos com crescimentos diferenciados dentro de um mesmo lote (“fast growers” versus “slow growers”). Baseado em pesquisas recentes com o pregado e com o alabote (*Hippoglossus hippoglossus*), aproximadamente 30% da variação no crescimento é explicada por factores genéticos (Imsland e Jónsdóttir, 2001).

Referentemente aos sistemas de produção utilizados actualmente, este e outros peixes planos são produzidos em tanques ou jangadas. O capital envolvido na produção destes peixes em tanques é bastante elevado (Howell e Yamashita, 2005). O custo de produção ronda os € 5-6/ kg nos tanques e € 5/kg em jangadas (FAO, 2007). A produtividade é função tanto da taxa de crescimento como da densidade de estabulação, sendo estes os dois factores determinantes do custo envolvido no processo produtivo (Howell, 1998).

2.1.8. Estatísticas de produção

A produção francesa de rodovalho foi estimada em 150 toneladas em 1993 e teve seu pico em 980 toneladas em 1997; a partir daí tem sofrido flutuações, sendo que em 2002 atingiu as 728 toneladas. Em Portugal, a produção varia entre as 350 e as 390 toneladas/ano. A Espanha é o maior produtor, representando 76 % da produção mundial em 2002. Nenhum outro país além dos três mencionados anteriormente apresentava produções acima das 50 toneladas em 2002. Neste ano, a produção global de pregado foi avaliada em US\$ 41.38 milhões.

2.2. Densidade de estabulação e efeitos no crescimento

Nos últimos anos, a produção comercial de pregado tem beneficiado das melhorias no processo de produção larvar, avanços nutricionais e das técnicas de produção utilizadas na fase de crescimento (Cowey *et al.*, 1976; Minkoff e Broadhurst, 1994).

Entretanto, um dos problemas encontrados na produção intensiva de pregado consiste na disparidade de tamanhos durante a fase de crescimento. Os mecanismos que geram este fenómeno não estão totalmente esclarecidos, contudo, uma grande quantidade de estudos indicam que a variação no crescimento seja o resultado de um conjunto de factores, como as diferenças genéticas e os efeitos parentais, assim como factores extrínsecos relacionados às condições ambientais (uso de instalações precárias e as más condições de estabulação) e às interacções sociais.

O crescimento dos peixes pode ser fortemente influenciado pelo desenvolvimento de hierarquias dentro do tanque, resultado da competição intra-específica pelo alimento, sendo fortemente afectada pela densidade de estabulação (Brett, 1979).

Inúmeros resultados relativos à densidade da cultura e ao crescimento dos peixes têm sido observados, como documentado no salmão do Atlântico *Salmo salar* (Refstie e Kittelsen, 1976), no salvelino-ártico *Salvelinus alpinus* (Jorgensen *et al.*, 1993), no alabote *Hippoglossus hippoglossus* (Bjornsson, 1994), no robalo *Dicentrarchus labrax* (Paspatis *et al.*, 2003) e no peixe gato africano *Heterobranchus longifilis* (Coulibaly *et al.*, 2007), sendo o modelo destas interacções, aparentemente, espécie-específico (Irwin *et al.*, 1999).

Para algumas espécies de peixes a utilização de elevadas densidades de cultivo pode ser prejudicial por gerar maior competição pelo alimento, promovendo o aparecimento de indivíduos dominantes, que impedem os indivíduos subordinados de se alimentarem adequadamente, comprometendo a uniformidade do lote. Na produção aquícola, a

incidência de um lote não uniforme é relevante, por acarretar o aumento dos custos de produção, resultado do aumento das operações de calibragem, das altas taxas de conversão alimentar e, conseqüentemente, de um maior tempo de permanência dos peixes com baixo crescimento nas instalações de produção. Noutras espécies, a utilização de densidades elevadas desempenha um efeito benéfico por inibir ou reduzir os efeitos destas hierarquias dentro do tanque (Brett, 1979; Brown *et al.*, 1992; Christianssen *et al.*, 1992; Jobling e Baardvik, 1994), proporcionando assim um crescimento uniforme do lote.

Comercialmente os peixes planos são estabulados em densidades que variam entre os 15 e os 50 kg/m², dependendo da espécie e das condições de produção (Mallekh *et al.*, 1998; Silva e Velez, 1998), ou entre 100 e os 200%, se utilizarmos como referência a taxa de cobertura da área do fundo pelos peixes (Jeon *et al.*, 1993; Bjornsson, 1994).

O pregado, assim como outros peixes planos, é uma espécie bentônica (habita o fundo), e para melhorar o crescimento e a sobrevivência desta espécie tem-se recomendado oferecer um ambiente que disponha de uma grande relação área x volume (Cripps e Poxton, 1992; Kaiser *et al.*, 1995; Labatut e Olivares, 2004). Por outro lado, a capacidade de cultivo de pregado em densidades elevadas, buscando a maximização da utilização da área é de particular importância para o futuro comercial deste tipo de actividade.

2.3. Alimentos Estimulantes em dietas de peixes

A fim de atender às necessidades nutricionais dos animais, a formulação das dietas deve levar em conta a exigência nutricional específica de cada espécie. A aceitação das dietas pelos peixes é dependente dos factores nutricionais, da sua composição química e das características físicas de cada alimento.

Sabe-se que o comportamento alimentar nos animais está associado a um estímulo químico que promove ou inibe a ingestão de determinados componentes alimentares. A habilidade do peixe em auto alimentar-se ou de optar por um alimento está associado à sensibilidade quimio-receptiva, sendo a preferência pelo peixe a um determinado alimento associado às funções de sabor, conteúdo e disponibilidade dos nutrientes da dieta (Higuera, 2001). Isto implica na necessidade de múltiplas células sensoriais interagirem com um químico específico ou com um grupo de químicos, devendo ser simultaneamente estimuladas para induzir uma resposta a um determinado alimento (Mackie, *et al.*, 1980; Carr *et al.*, 1996; Higuera, 2001).

A solha (*Solea solea*), por exemplo, alimenta-se principalmente no período noturno, sendo a principal fonte de alimentação constituída de poliquetas, pequenos moluscos e, ocasionalmente, pequenos crustáceos. Estes organismos contêm uma grande quantidade de glicina-betaína nos seus tecidos, sendo muito provável que os peixes selvagens localizem e seleccionem as suas presas por um mecanismo que inclua células quimio-sensoriais que apresentem uma alta especificidade química pela glicina-betaína (Mackie *et al.*, 1980).

Ao contrário dos animais terrestres, que necessitam de colocar o alimento no interior da boca para promover um estímulo gustativo, os peixes são capazes de reconhecer e rejeitar alimentos não saborosos antes de os colocar na boca, já que o seu sistema gustativo está associado ao sistema olfactivo (Yamashita *et al.*, 2006). Desta forma, o alimento muitas vezes é detectado à distância, o que faz imenso sentido se levarmos em consideração a grande quantidade de espécies de peixes que habitam ambientes desprovidos de luz. Um grande número de compostos orgânicos, incluindo os aminoácidos livres, as aminas quaternárias, os nucleosídeos e nucleotídeos, e os extractos de animais marinhos têm sido utilizados como alimentos estimulantes para peixes (Gomes *et al.*, 1997; Papatryphon e Soares Jr, 2000 a e b). Inúmeros estudos com compostos químicos e misturas têm sido desenvolvidos obtendo-se resultados interessantes (Meteiller *et al.*, 1983; Person-Le Ruyet *et al.*, 1983; Jones, 1989; Hughes, 1991; Kamstra e Heinsbroek, 1991, Heinsbroek e Krueger, 1992; NRC, 1993; McGoogan e Gatlin III, 1997; Toften e Jobling, 1997).

Carr e Chaney (1976) descobriram que os aminoácidos e as aminas quaternárias (como a L-carnitina, a betaína e a colina) são estimulantes potentes para algumas espécies de peixes. A suplementação de L-carnitina na dieta, por exemplo, tem sido atribuída a um aumento do consumo (Twibell e Brown, 2000) e a uma melhoria do crescimento e ao aumento de ganho de peso num grande número de espécies de peixes (Santulli e D'Amelio, 1986a; Torreele *et al.*, 1993; Chatzifotis *et al.*, 1995; Focken *et al.*, 1997); podendo também levar a uma diminuição no teor de gordura corporal, como descrito para o robalo europeu (Santulli *et al.*, 1990) e para o peixe-gato africano (Ozório *et al.*, 2001a, b), sendo estes benefícios atribuídos a um aumento da oxidação lipídica; resultando numa melhor utilização da gordura como fonte de energia (Harpaz, 2005).

Carr e Chaney (1976) e Meteiller *et al.* (1983) mostraram que o efeito de algumas aminas quaternárias é potencializado quando misturada aos aminoácidos, sugerindo uma interacção sinérgica entre estas substâncias. A adição de betaína na dieta, por exemplo, tem gerado benefícios relacionados com o aumento do apetite, como demonstrado em alguns peixes costeiros (Goh e Tamura, 1980; Mackie e Mitchell, 1983), com peixes de

água doce (Beklevik e Polat, 2001) e com invertebrados (Harpaz, 1997; Félix e Sudharsan, 2004). Entretanto, nem sempre uma resposta benéfica é encontrada quando se fornece uma dieta suplementada com aminas quaternárias, como descrito para a betaína em achigã *Micropterus salmoides* por Kubitzka *et al.* (1997).

Os compostos utilizados como promotores de consumo apresentam também propriedades secundárias, como demonstrado por Takii *et al.* (1986), em que os peixes (trutas arco-íris e os pimpões) alimentados com uma dieta contendo dimetil- β -propiotetina, um estimulante alimentar, não só cresceram mais do que os peixes alimentados com a dieta controlo (sem a adição da substância) mas também apresentaram maior resistência a factores ambientais de stress, como a falta de oxigénio e a elevação da temperatura (Cavichiolo *et al.*, 2002). Kubitzka (1995) desenvolveu um ensaio com achigã *Micropterus salmoides*, alimentado com uma dieta à base de soja (60% farelo de soja), contendo uma mistura de aminoácidos, nucleotídeos e betaína, como descrito a seguir: somente aminoácidos; somente betaína; somente nucleotídeos; aminoácidos + betaína; aminoácidos + nucleotídeos; betaína + nucleotídeos; e aminoácidos + betaína + nucleotídeos. Os peixes alimentados com as dietas contendo somente nucleotídeos apresentaram os melhores resultados na performance de crescimento. Contrariamente às expectativas iniciais, Kubitzka (1995) observou que a betaína, abundante em extractos de crustáceos e considerado um bom estimulante e promotor do consumo para uma grande variedade de espécies de peixes, não é eficaz no achigã. A inosina-5X-monofosfacto, abundante na musculatura dos peixes e, conseqüentemente, na farinha de peixe, apresentou o melhor efeito como estimulante do consumo para esta espécie.

Algumas fontes naturais utilizadas na alimentação dos peixes apresentam uma grande variedade de compostos químicos, que para algumas espécies de peixes actuam como estimulante na alimentação e em outras espécies não. O extracto muscular da lula, por exemplo apresenta uma mistura de aminoácidos que são efectivos na truta arco-íris (Adron e Mackie, 1978), e apresentam também inosina e inosina-5X-monofosfacto, que tem acção estimulante no pregado (Mackie e Adron, 1978). No estudo desenvolvido por Hidaka *et al.* (2000), foi descoberto que a fracção de aminoácidos presentes nos extractos de lula estimulam os receptores gustativos da seriola (*Seriola quinqueradiata*), sendo responsáveis pelo efeito de estímulo na alimentação.

Um estudo complementar, desenvolvido por Carr *et al.* (1996), testou um grande número de estimulantes alimentares em 30 espécies de animais marinhos, incluindo 10 espécies de peixes teleósteos e 20 espécies de invertebrados. Através da determinação desses

compostos químicos na composição corporal dos animais foi possível detectar que os peixes, os moluscos e os crustáceos estudados se agrupavam separadamente em grupos específicos. A principal diferença encontrada deu-se entre os peixes e os dois grupos de invertebrados. Dentre os invertebrados, oito das nove substâncias mais abundantes são comumente encontradas nos crustáceos e moluscos: betaína, taurina, óxido de trimetilamina, glicina, alanina, prolina, arginina e homarina. Os componentes mais abundantes nos tecidos dos peixes e dos invertebrados estão correlacionados aos compostos mais abundantes citados na literatura. Nos tecidos dos peixes a glicina e a alanina são os componentes mais abundantes. Nos moluscos e crustáceos a glicina, a alanina, a betaína, a prolina e a arginina são as substâncias mais abundantes nos tecidos, sendo nos peixes encontradas em concentrações muito inferiores. Os estimulantes para herbívoros e carnívoros são geralmente diferentes por serem inter-específicos (Xue e Cui, 2001). Uma mistura de L-aminoácidos, por exemplo, induz uma resposta positiva na truta arco-íris, mas a mesma mistura não surte qualquer efeito quando fornecida ao pregado, *Scophthalmus maximus* (Makie e Adron, 1978). O “Pinfish”, *Lagodon rhomboids*, apresenta sensibilidade à glicina (Carr e Chaney, 1976), mas a truta arco-íris não responde positivamente ao aminoácido (Adron e Mackie, 1978).

Geralmente, os peixes carnívoros, são sensíveis a aminoácidos neutros e alcalinos (glicina, prolina, taurina, valina), enquanto que as espécies herbívoras respondem mais eficientemente a aminoácidos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico). Aparentemente a alanina, a glicina, a prolina, a valina, o triptofano, a tirosina, a fenilalanina, a lisina e a histidina são os principais componentes para uma grande variedade de espécies, sendo a composição da mistura activa de aminoácidos específica para cada espécie (Higuera, 2001). Em inúmeros trabalhos tem sido publicado que a adição de uma mistura de estimulantes na dieta é mais eficiente do que a adição de um composto individualizado (Mackie *et al*, 1980; Papatryphon e Soares Jr., 2001), embora para algumas espécies o estímulo da alimentação possa ocorrer com a adição de um único aminoácido, como descrito para a tilápia (Johnsen e Adams, 1986). Os extractos de presas naturais, assim como seus correspondentes sintéticos são os produtos mais eficientes como estimulantes da alimentação.

Como já se referiu, a L-carnitina, uma amina quaternária, é um alimento estimulante, que promove o aumento do consumo e ganho de peso. Além disso, está associada a outras funções benéficas relacionadas ao desempenho e desenvolvimento dos peixes. Dentre os inúmeros benefícios de sua inclusão na dieta é possível destacar: (a) a protecção contra

níveis tóxicos de amónia e xenobióticos; (b) alivia os efeitos de stress relacionados ao ambiente (como alterações na temperatura ou na diminuição no níveis de oxigénio dissolvido no meio), facilitando a aclimação dos peixes. Os principais benefícios da L-carnitina no desenvolvimento dos peixes serão pormenorizadas no capítulo seguinte.

2.4. L-carnitina

2.4.1. Descrição geral

O nome L-carnitina é derivado do Latin *canis* (carne). Foi descoberta em 1905 em extractos musculares, sendo mais tarde a sua fórmula química $C_7H_{15}NO_3$ identificada. A L-carnitina é uma pequena molécula (peso molecular, 161.20), encontrada nos órgãos dos mamíferos e de pequenos animais, assim como em inúmeros microrganismos e plantas (Rebouche e Seim, 1998). Quimicamente, a L-carnitina pode ser encontrada sob duas formas: a D-L-carnitina e a L-carnitina. Na natureza, a L-carnitina só é encontrada sob a forma de L-carnitina (Ozório, 2001). Este nutriente orgânico é sintetizado a partir de dois aminoácidos essenciais, a lisina e a metionina, com o auxílio da vitamina C e de outros compostos secundários produzidos no corpo, sendo que, a formação endógena de L-carnitina nos vertebrados ocorre inicialmente no fígado, assim como no baço e no cérebro (Harpaz, 2005).

A L-carnitina é uma amina quaternária que desempenha funções fisiológicas importantes, sendo, a mais conhecida destas, o facto de transportar as longas cadeias de ácidos gordos para o interior da matriz mitocondrial (Hathcock e Shao, 2006) na forma de acilL-carnitina, para a oxidação e produção de ATP nos tecidos periféricos (Gulçin, 2006). Além disto, é responsável pela translocação de resíduos de acil para o exterior da matriz mitocondrial. Sendo assim, a L-carnitina desempenha uma função indispensável no metabolismo dos ácidos gordos.

2.4.2. O porquê da suplementação com L-carnitina

Actualmente, a produção mundial de organismos aquáticos proveniente da pesca de captura vem sofrendo um ligeiro declínio, devido ao facto das principais áreas pesqueiras terem atingido o seu potencial máximo. A sobrepesca nessas áreas, aliada à degradação do ambiente natural, tem contribuído de forma determinante para que inúmeras espécies aquáticas tenham a sustentabilidade ameaçada. A aquacultura, como actividade

sustentável, tem procurado reduzir os impactos provocados no ambiente. Sabe-se que a principal fonte de proteína nas dietas para peixes cultivados são as farinhas de peixe (Urbinati *et al.*, 2000). Os altos preços das farinhas de peixe, aliados à instabilidade do seu fornecimento e à qualidade duvidosa deste ingrediente tem forçado a busca por formulações que passem a substituir em parte a fracção proteica provinda da farinha de peixe por outras fontes alternativas ou mesmo à substituição de uma parcela da fracção proteica por uma fonte lipídica que passe a ser incorporada pelo peixe. Actualmente, as fontes alternativas têm-se baseado em produtos de origem vegetal, como os grãos das leguminosas, algumas sementes e cereais. Sabe-se que a substituição por produtos vegetais, mesmo que feita parcialmente, acarreta impactos negativos na saúde e no desempenho do animal, já que interfere no fornecimento de alguns nutrientes essenciais. Como as fontes vegetais apresentam, em média, 10 a 20 vezes menos L-carnitina do que as fontes animais (Ozório, 2001), torna-se essencial uma suplementação de L-carnitina nas formulações.

2.4.3. Efeito da L-carnitina no crescimento dos peixes

Os peixes necessitam de um nível muito elevado de proteína na sua dieta em comparação com outros animais cultivados, pelo facto dos peixes utilizarem parte da proteína para a obtenção de energia e não para o crescimento (Wilson, 2002). Factores como o tamanho e a idade dos peixes, a composição da dieta, a taxa de alimentação, a presença de alimento natural, a temperatura da água e a densidade de estabulação podem influenciar a exigência proteica dos animais. A proteína é um dos principais nutrientes utilizados nas dietas para peixes, sendo o macro nutriente mais caro, devido ao alto volume em que é utilizado (Lazo *et al.*, 1998).

Como já se referiu, nas últimas décadas, tem aumentado a pressão para reduzir o nível de farinha de peixe na formulação das dietas para peixes. Inúmeros estudos com peixes carnívoros têm tentado substituir uma parcela da proteína por gordura (Hanley, 1991; Brecka *et al.*, 1996). A L-carnitina parece ser um nutriente promissor neste sentido. O efeito da suplementação dietética de L-carnitina no crescimento dos peixes tem sido atribuído à melhoria da utilização de energia, em consequência do aumento da oxidação dos ácidos gordos pela mitocôndria. Por este motivo, a adição da L-carnitina resulta, indirectamente, numa diminuição do catabolismo proteico (“*protein-sparing action*”), já que uma maior parte da energia é gerada a partir dos ácidos gordos de cadeia longa, conduzindo a um melhor crescimento mesmo em dietas contendo um menor teor proteico

(Harpaz, 2005). Inúmeros estudos demonstram que a L-carnitina actua como promotor de crescimento nos peixes como o robalo europeu *Dicentrarchus labrax* (Santulli e D'Amelio, 1986b); no peixe-gato africano *Clarias gariepinus* (Torreele *et al.*, 1993); no pargo *Pagrus major* (Chatzifotis *et al.*, 1995); na tilápia moçambicana *Oreochromis mossambicus* (Jayaprakas *et al.*, 1996); na carpa comum *Cyprinus carpio* (Focken *et al.*, 1997). Entretanto, nem sempre se verifica uma melhoria no desempenho dos peixes tal como foi descrito nos trabalhos de Rodehutschord (1995), Harpaz *et al.* (1999), Ozório *et al.* (2001a) e Ozório *et al.* (2003). Tais variações nos resultados, referentes ao efeito da suplementação de L-carnitina na dieta, podem ser atribuídos a inúmeros factores, como a idade do animal, a composição da dieta, ou mesmo aos requisitos da espécie de peixe estudada.

2.4.4. A L-carnitina e seus efeitos na composição corporal

Considerando que a suplementação de L-carnitina aumenta a translocação de ácidos gordos para o interior da mitocôndria, é esperado que esta amina estimule de forma indirecta a queima corporal de lípidos e por consequência previna o catabolismo de proteínas. Sendo assim, os animais alimentados com maiores quantidades de L-carnitina, em dietas com um teor de gordura considerável, beneficiariam desta função e passariam a direccionar a energia proveniente da proteína para o crescimento. Por aumentar a oxidação lipídica, a adição da L-carnitina permite que sejam utilizadas altas níveis de gordura na dieta pois reduz a acumulação de lípidios nos tecidos. Nos últimos anos, algumas evidências tem provado suportar ou rejeitar tal hipótese. Os efeitos positivos da alimentação com L-carnitina no favorecimento da oxidação lipídica e, conseqüentemente, na redução nos teores de gordura corporal dos peixes, têm sido documentados para um grande número de espécies cultivadas, como no peixe-gato africano - *Clarias gariepinus* (Torreele *et al.*, 1993; Ozório *et al.*, 2001a, b; Ozório *et al.*, 2003), no robalo europeu - *Dicentrarchus labrax* (Santulli *et al.*, 1990) e no pargo - *Pagrus major* (Chatzifotis *et al.*, 1995). Em larvas de pregado alimentadas com dietas contendo suplementação de L-carnitina, notou-se um aumento significativo na taxa de sobrevivência, reduzindo o risco do uso de dietas ricas em gordura (Fernández-Pato e Martínez-Tapia, 1991).

Em contrapartida, a adição de L-carnitina na dieta não tem mostrado nenhum efeito no que diz respeito a promoção do crescimento ou alterações na composição lipídica para outras espécies, como é documentado na tilápia (Becker *et al.*, 1999), e nos salmonídeos

(Rodehutschord, 1995; Ji *et al.*, 1996). Tais contradições podem ser atribuídas a uma interacção de factores, como a idade do animal, a composição da dieta e aos requisitos metabólicos da espécie em estudo, como referido no capítulo anterior.

Actualmente ainda se desconhece até que ponto a suplementação de L-carnitina pode interferir no teor de gordura e proteína na carcaça dos peixes cultivados em sistemas de produção intensiva. O uso deste ingrediente na dieta para produção de pregado (*Scophthalmus maximus*) pode, primeiramente, permitir a utilização de dietas com altos teores de energia, ao diminuir a deposição de gordura intramuscular, melhorando, desta forma, a qualidade do pescado comercializado. Em segundo lugar, pode reduzir o custo envolvido na produção através da redução da quantidade de farinha de peixe utilizada nas formulações, assim como proporcionar uma redução na produção de metabólitos azotados pelo peixe, favorecendo igualmente o ambiente.

3. HIPÓTESES E OBJECTIVOS

O principal objectivo deste ensaio consistiu em determinar os efeitos da alimentação com L-carnitina na performance de crescimento e na composição corporal de pregados seleccionados de um lote de cauda (“slow growers”), mantidos a diferentes densidades (4, 8, 11 e 14 kg/m²).

O pregado foi escolhido como espécie modelo pelo facto de ser bastante robusto, por exhibir um rápido crescimento, e por apresentar todo o seu ciclo de produção em cativeiro bem estudado. Além disso, é uma espécie de grande importância económica para a Europa, já que representa um volume de produção bastante considerável. Por outro lado, esta espécie apresenta um crescimento não uniforme em cativeiro, sendo observado a presença de indivíduos de tamanhos muito díspares dentro de um mesmo lote. Acredita-se que uma possível explicação para esta disparidade no crescimento seja provocada pelo cultivo em densidades impróprias, acarretando a formação de hierarquias e de indivíduos dominantes, sendo por este motivo testado a diferentes densidades de cultura.

Em relação à L-carnitina, é esperado que a sua suplementação na dieta promova um aumento da oxidação lipídica e, como resultado, proporcione uma redução no teor de gordura corporal, produzindo desta forma peixes de melhor qualidade. Pelo mesmo motivo, acredita-se que os peixes que receberem suplementação de L-carnitina na dieta apresentem uma maior taxa de crescimento durante o ensaio de alimentação, pelo facto da energia resultante da oxidação lipídica ser direccionada ao crescimento. Para além disso, é esperado que a adição de L-carnitina na dieta promova uma diminuição no catabolismo proteico, resultando numa menor excreção de compostos azotados, favorecendo desta forma o ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local e instalações

Os ensaios efectuados no âmbito deste trabalho foram realizados nas instalações do laboratório de Engenharia Aquática do ICBAS (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar), Universidade do Porto, de Maio a Julho de 2007.

O laboratório é provido de um sistema de recirculação de água, com capacidade de 3,5 m³, equipado com 12 tanques, cada qual dividido em dois compartimentos idênticos, perfazendo um total de 24 compartimentos com capacidade de 80 L/ compartimento. A unidade de tratamento de água é constituída por um filtro mecânico de 100µ, dois filtros biológicos (lamas activadas e percolação), um escumador, um sistema de esterilização por ultravioleta e refrigeração. O laboratório é ainda equipado com um sistema de ar condicionado, que permite e o controlo da temperatura do ambiente.

4.2. Condições pré-experimentais

Os pregados utilizados nesta experiência foram adquiridos na piscicultura do Rio Alto, propriedade da A. Coelho e Castro Ld^a. Até a data da aquisição, os peixes foram mantidos em tanques com circuito semi-aberto, em condições de fotoperíodo e temperatura naturais, sendo alimentados de 2 a 4 vezes ao dia, com ração comercial e de acordo com as recomendações do fabricante (Alpis Ld^a). Os peixes adquiridos caracterizavam-se por apresentar uma taxa de crescimento bastante reduzida, pois constituíam o lote de cauda existente na piscicultura (“slow growers”).

4.3. Delineamento experimental

Para a realização da experiência foram utilizados cerca de 600 pregados. Ao chegarem foram seleccionados 5 peixes, ao acaso, que foram anestesiados e mortos por overdose de etileno-glicol-monofenil-eter (MERK[®]), e congelados a -20°C, para posterior determinação da composição corporal inicial. Os restantes peixes foram amostrados e pesados individualmente (peso inicial 75,64 ± 2,83g), e posteriormente distribuídos nas 24 unidades experimentais (compartimentos de 0,25m × 0,80m), sendo dispostos sob 4 densidades diferentes (4, 8, 11 e 14 kg/m²), correspondendo a aproximadamente 10, 20, 30 e 35 peixes/compartimento (**Figura I**).

Nos primeiros 7 dias os peixes foram aclimatados às condições experimentais, sendo alimentados manualmente duas vezes ao dia com as rações teste. Após a aclimação, deu-se início ao ensaio de alimentação, que foi conduzido em triplicado ($2 \times 4 \times 3$, design em blocos alietóricos), por um período de 75 dias.



Figura 1 – Esquema de distribuição dos peixes ao longo dos compartimentos (2X)

4.4. Dietas, Alimentação e Condições Experimentais

Durante o ensaio os peixes foram alimentados manualmente, duas vezes ao dia (às 9h30 e 15h30) até à saciedade aparente, sendo oferecidas uma das duas dietas (iso-nitrogenadas e isoenergéticas), contendo 40 ou 240 ppm de L-carnitina (**Tablela II**). A L-carnitina utilizada na formulação da ração (Carniking) e as análises químicas de L-carnitina das dietas foram realizados pelo laboratório LONZA (Lonza Ltd CH-4002 Basel, Suíça).

Tabela II – Composição dos ingredientes testados no ensaio de alimentação (em %)

COMPOSIÇÃO DA DIETA		
	CARNITINA 40 mg/kg	CARNITINA 240 mg/kg
INGREDIENTES (%)		
Farinha de peixe 70%	30.3	30.3
Farinha de peixe 60%	30.3	30.3
Soja concentrada	8.1	8.1
Bagaço de soja	8.1	8.1
Trigo	15.2	15.1
Óleo de peixe	7.4	7.4
Premix oscialis	0.6	0.6
Carniking	-	0.04
COMPOSIÇÃO		
Matéria seca (%)	91.8	91.5
Proteína total (%)	38.4	39.1
Lípidos totais (%)	13.6	12.8
Cinza (%)	12.7	12.8
Energia (kJ/g)	19.5	19.5
Carboidrato (%) ¹	29.7	29.5
Carnitina (mg/kg)	40.0	240.0

Calculado a partir da energia teórica equivalente dos nutrientes da dieta de acordo com o modelo:

$$E_{\text{dieta}} = (0.2364 \times \% P_{\text{dieta}}) + (0.3954 \times \% L_{\text{dieta}}) + (0.1715 \times \% CH_{\text{dieta}})$$

Durante todo o ensaio de alimentação foram monitorizados diariamente os parâmetros físico-químicos da água. A salinidade da água foi determinada através de um refractómetro ocular (A.S.T.). Os dados de temperatura (°C) e oxigénio dissolvido (mg/L) foram medidos *in situ* através de um oxímetro (Oxi 330 WTW). A cada dois dias efectuou-se a recolha de amostras de água dos tanques para análise de amónia total (NH₃ + NH₄⁺) e dos nitritos (NO₂⁻), que foram armazenadas em pequenos frascos (no escuro a -20°C). As análises de nitrito e da amónia total foram realizadas frequentemente, através do Palintest® Photometer 7000 (Palintest Ltd, Tyne & Wear, England) e reagentes do Palintest® kit de amónia total e nitrito, sendo que o tempo de armazenamento das amostras não ultrapassou os 3 dias.

As variações na salinidade, temperatura, amónia e nitrito registradas no decorrer do ensaio de alimentação estão ilustrados nas figuras seguintes (**Figuras II e III**).

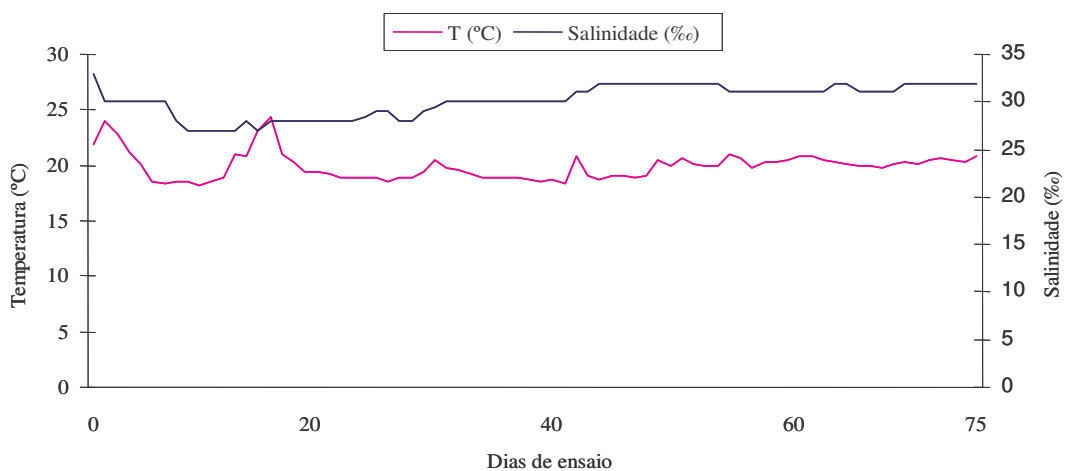


Figura II – Variação da temperatura (°C) e salinidade (‰) da água ao longo do ensaio.

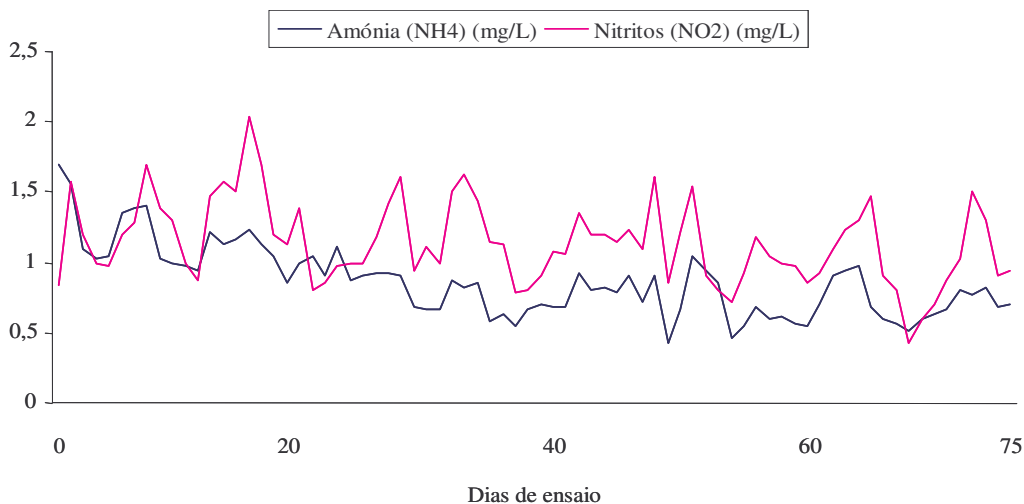


Figura III – Evolução da concentração média diária para a amónia total $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (mg/L) e nitritos, NO_2^- (mg/L) na água ao longo do ensaio.

Os valores médios obtidos para os parâmetros físico-químicos da água foram de 6.17 ± 0.97 mg/L para o oxigénio dissolvido, 19.7 ± 4.5 °C para a temperatura, 29.4 ± 3.6 ‰ para a salinidade, 1.0 ± 0.7 mg/L para a amónia ionizada e 1.2 ± 0.9 mg/L para os nitritos.

4.5. Parâmetros indicadores de desempenho

No decorrer da experiência (aos 20, 40 e 60 dias) foram realizadas amostragens intermédias para verificação na evolução do peso dos peixes, sendo estas pesagens conduzidas do mesmo modo que no início da experiência. Para a realização destas

amostragens os peixes foram mantidos em jejum por um período de 24 h. No final dos 75 dias do ensaio de alimentação, repetiu-se novamente a biometria, sendo seleccionados, aleatoriamente, 5 peixes de cada compartimento, para determinação da composição final das carcaças (humidade, proteína, lípidos, cinza e energia bruta) do material liofilizado.

O desempenho dos pregados alimentados com as diferentes dietas foi avaliado considerando-se os seguintes parâmetros:

- GP, Ganho de peso (g) = peso final – peso inicial.
- CA, Conversão alimentar = consumo (MS)/ ganho de peso, sendo MS= matéria seca.
- TEP, Taxa de eficiência proteica = ganho de peso/proteína consumida (MS).
- TCE, Taxa de crescimento específico (%) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})/\text{dias de ensaio}] \times 100$.
- CVA, Consumo voluntário de alimento = $[\text{consumo}/((\text{peso final} + \text{peso inicial})/2)/\text{dias de ensaio}] \times 100$.
- IHS, Índice hepatossomático (%) = $(\text{peso do fígado}/\text{peso do animal}) \times 100$.
- CEP, Coeficiente de eficiência proteica (%) = $[(\text{peso final} \times \text{proteína corporal final} (\%)) - (\text{peso inicial} \times \text{proteína corporal inicial} (\%))/\text{consumo protéico (MS)}] \times 100$.
- M, Mortalidade (%) = $(n^\circ \text{ mortos}/n^\circ \text{ inicial}) \times 100$.
- K, Factor de condição = $100 \times P / L^3$, sendo P= peso em gramas; L=comprimento total em centímetros.
- CV, Coeficiente de variação do peso (%) = $(\text{desvio padrão do peso}/\text{mídia do peso}) \times 100$.

4.6. Recolha das amostras para análise de composição corporal

Para se proceder à análise da composição corporal dos peixes em estudo, foram amostrados peixes no início e no fim dos 75 dias de experiência. No início do ensaio foram recolhidos aleatoriamente, do lote de origem, 5 peixes que foram abatidos com uma super dosagem de etileno-glicol-monofenil-eter (MERK®). Seguidamente, foram identificados e colocados em congelador a -20° C, para posterior análise de carcaças (composição corporal inicial). Após 75 dias, procedeu-se novamente a uma recolha de indivíduos, sendo seleccionados, aleatoriamente, 5 peixes de cada compartimento, sendo 2 destes utilizados para determinação da composição final do homogeneizado da carcaça liofilizada,

nomeadamente o conteúdo de humidade, proteína, lipídios, cinza e energia bruta. Dos restantes peixes, a 3 foram retirados os fígados para determinação do índice hepatossomático (IHS), sendo acondicionados da mesma forma.

4.7. Métodos Analíticos

4.7.1. Análise da Composição Corporal

Para a análise da composição corporal foram utilizadas as amostras recolhidas no início (dia 0) e no final do ensaio (75º dia). Os animais destinados à análise de composição corporal foram cortados, ainda congelados, e moídos num triturador até se obter uma pasta homogénea. Uma pequena parte desta pasta foi utilizada para a determinação do teor de humidade e de cinza da amostra. O material restante foi submetido ao processo de liofilização, durante 72 horas, até se atingir peso constante. Depois desta fase, foram triturados novamente, até se obter uma granulometria bastante fina, e armazenados em sacos plásticos com boa vedação.

4.7.1.1. Humidade

A humidade foi determinada por secagem das amostras, que se encontravam homogeneizadas, sob a forma pastosa, em estufa a 105°C, durante 24 horas (Anexo I)

4.7.1.2. Cinza

O teor de cinza foi determinado por incineração das amostras em mufla a 550°C, durante, aproximadamente, 6 horas (Anexo II).

4.7.1.3. Gordura Bruta

Entende-se por gordura bruta o resíduo seco, não volátil, que fica, depois de evaporar em estufa o extracto, obtido pela acção do éter anidro na amostra. A gordura bruta foi determinada extraindo os lípidios com éter de petróleo, continuamente, durante cerca de 3 horas, através do sistema de extracção “Soxtherm Multistat” (Anexo III).

4.7.1.4. Proteína Bruta

O conteúdo em proteína bruta foi obtido através da determinação do teor de azoto das amostras pelo método de Kjeldahl, utilizando-se para o efeito, um digestor “Kjeldatherm Block” e um destilador “Vapodest 40”. Foram utilizadas, aproximadamente, 200 mg de amostra liofilizada para cada determinação, utilizando-se como catalizador, pastilhas “Kjeldahl”. A proteína bruta foi obtida multiplicando o teor de azoto total pelo factor 6.25 (Anexo IV).

4.7.1.5. Energia

O teor de energia de cada amostra foi determinado utilizando-se uma bomba calorimétrica (Anexo V).

4.8. Determinação da produção de azoto em estado pós-prandial

No decurso do ensaio de alimentação (55º dia) foi desenvolvido uma experiência complementar, para avaliar a componente de excreção branquial e urinária dos peixes.

Para que não houvesse qualquer interferência desta no ensaio principal, optou-se por utilizar a mesma distribuição dos peixes em vigor (conforme ilustrado na **figura I**). Assim, foram utilizados os mesmos 12 tanques (cada qual subdivididos em 2 compartimentos), que apresentavam exactamente a mesma densidade por tanque ($10.21 \pm 0.54 \text{ kg/m}^2$, $p > 0.05$) e mais 2 tanques complementares, idênticos aos anteriores, que se encontravam cheios de água, porém sem peixes, que serviram como tanques controlo. Os peixes foram mantidos em jejum por um período de 48 horas antes de se iniciar este ensaio. O objectivo deste ensaio foi determinar a influência da alimentação com L-carnitina na excreção urinária e branquial dos pregados.

Como primeiro passo, procedeu-se à calibração dos caudais de entrada de água a cada um dos tanques. Em seguida, os peixes foram alimentados manualmente (às 9h00) com uma das duas dietas (isonitrogenadas e isoenergéticas) contendo 40 ou 240 mg/kg de L-carnitina, sendo fornecido $56 \pm 0.17 \text{ g}$ de alimento/tanque em % BM. Depois de concluída a alimentação iniciou-se a colheita de amostras de água em períodos regulares. Todos os tanques foram amostrados às 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 21 e 24 horas após a alimentação e as amostras de água foram conservadas a -20°C para posterior determinação da amónia total.

A determinação da concentração de amónia total, TAN ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foi realizada através do Palintest® Photometer 7000 (Palintest Ltd, Tyne & Wear, England) e reagentes do Palintest ® kit de amónia total.

4.9. Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância, modelo “two way” (ANOVA). Quando identificadas diferenças significativas entre os tratamentos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando a ferramenta estatística SAS (SAS versão 8; SAS Institute INC., 1999).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Indicadores do desempenho

Após os 75 dias de ensaio de alimentação com os pregados, procedemos ao cálculo de alguns indicadores de desempenho, que são apresentados na **Tabela III**.

Tabela III – Valores médios (n=3 réplicas/tratamento) dos parâmetros de desempenho de pregados alimentados com dietas contendo dois teores de L-carnitina e mantidos em diferentes densidades de estabulação, ao fim de 75 dias¹.

	Densidade, 8kg/m ²							
	4		8		11		14	
	Carnitina, mg/kg		Carnitina, mg/kg		Carnitina, mg/kg		Carnitina, mg/kg	
	40	240	40	240	40	240	40	240
PI ²	78.16±0.07	76.37±4.51	77.39±4.04	73.17±3.3	75.9±0.81	73.13±1.38	75.53±2.03	74.45±2.41
PF ³	95.49±11.4 ^a	93.91±5.75 ^a	87.25±5.81 ^{ab}	82.2±3.91 ^{ab}	83.46±1.26 ^b	79.7±4.93 ^b	80.59±1.89 ^b	81.13±4.39 ^b
GP ⁴	23.89±2.16 ^a	17.54±1.24 ^a	9.86±3.16 ^b	11.56±4.04 ^b	7.55±1.33 ^{bc}	8.3±2.94 ^{bc}	5.06±1.41 ^c	6.68±1.99 ^c
CA ⁵	1.98±0.57 ^b	1.78±0.22 ^b	3.1±0.53 ^b	2.46±0.6 ^b	3.67±0.32 ^{ab}	3.26±1.02 ^{ab}	5.62±1.57 ^a	4.71±1.36 ^a
TEP ⁶	1.26±0.36 ^a	1.33±0.16 ^a	0.79±0.15 ^b	0.98±0.24 ^b	0.66±0.06 ^{bc}	0.76±0.24 ^{bc}	0.45±0.15 ^c	0.52±0.15 ^c
TCE ⁷	0.36±0.03 ^a	0.28±0 ^a	0.16±0.05 ^b	0.2±0.08 ^b	0.13±0.02 ^{bc}	0.14±0.05 ^{bc}	0.09±0.02 ^c	0.11±0.03 ^c
CVA ⁸	0.7±0.14 ^a	0.55±0.06 ^a	0.52±0.06 ^b	0.5±0.05 ^b	0.5±0.04 ^b	0.46±0.03 ^b	0.5±0.06 ^{ab}	0.56±0.06 ^{ab}
IHS ⁹	0.64±0.03	0.54±0.1	0.6±0.13	0.68±0.01	0.68±0.22	0.59±0.09	0.75±0.12	0.68±0.11
CEP ¹⁰	4.21±0.97 ^a	4.18±0.04 ^a	1.78±1.28 ^{ab}	2.22±1.68 ^{ab}	0.35±0.17 ^{ab}	2.58±0 ^{ab}	0.64±2.34 ^b	1.46±1.24 ^b
M ¹¹	0±0 ^b	0±0 ^b	0±0 ^{ab}	4.45±0.14 ^{ab}	4.56±5.28 ^a	5±2.36 ^a	1.32±1.86 ^{ab}	6.58±1.86 ^{ab}
K ¹²	1.53±0.08	1.51±0.03	1.49±0.06	1.47±0.05	1.49±0.03	1.51±0.02	1.5±0.04	1.51±0.05

¹ Médias na mesma linha seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p> 0.05).

² Peso inicial (g).

³ Peso Final (g).

⁴ Ganho peso (g).

⁵ Conversão alimentar.

⁶ Taxa eficiência proteica.

⁷ Taxa de crescimento específico (%).

⁸ Consumo voluntário de alimento (%).

⁹ Índice hepatossomático.

¹⁰ Coeficiente de eficiência proteica (%).

¹¹ Mortalidade (%).

¹² Factor de condição K (%).

Não verificamos nenhuma interação entre as diferentes dietas e as diferentes densidades (p>0.05). Através da análise estatística averiguamos que as diferentes dietas não apresentaram qualquer influência no desempenho dos animais, considerando um nível de significância de 5%.

O peso final dos animais, o ganho de peso, e o coeficiente de eficiência proteica foram claramente afectados pelas diferentes densidades, sendo que os animais acondicionados na

menor densidade (4 kg/m^2) cresceram significativamente mais que os demais, além de apresentarem um melhor coeficiente de eficiência proteica. Assim, ao fim dos 75 dias do ensaio os animais acondicionados na menor densidade apresentaram um ganho de peso de 23.89 ± 2.16 e $17.54 \pm 1.24 \text{ g}$ e o coeficiente de eficiência proteica de 4.21 ± 0.97 e $4.18 \pm 0.04\%$ para os peixes alimentados com as dietas com 40 e 240 mg/kg de L-carnitina, respectivamente. Os peixes mantidos nas densidades de 11 e 14 kg/m^2 foram os que apresentaram os piores índices de peso final ($p < 0.01$), ganho de peso ($p < 0.0001$) e coeficiente de eficiência proteica, ($p < 0.01$). A taxa de eficiência proteica e a taxa de crescimento específico seguiram uma tendência parecida, e também foram influenciadas pela densidade de estabulação. Também neste caso, os peixes mantidos na menor densidade apresentaram também um melhor desempenho para a taxa de eficiência proteica ($p < 0.0005$) e para a taxa de crescimento específico ($p < 0.0001$). Também notamos uma melhor conversão alimentar ($p < 0.01$), consumo voluntário de alimento ($p < 0.05$) e mortalidade ($p < 0.05$), nos peixes acomodados na menor densidade de estabulação.

Não foram observadas diferenças estatísticas para o peso inicial, para o índice hepatossomático, assim como para o factor de condição.

As alterações na taxa de crescimento específico e no ganho de peso dos peixes alimentados com as diferentes dietas e mantidos em diferentes densidades são apresentadas na **Figura IV**. Podemos verificar uma piora destes índices com o aumento da densidade de estocagem.

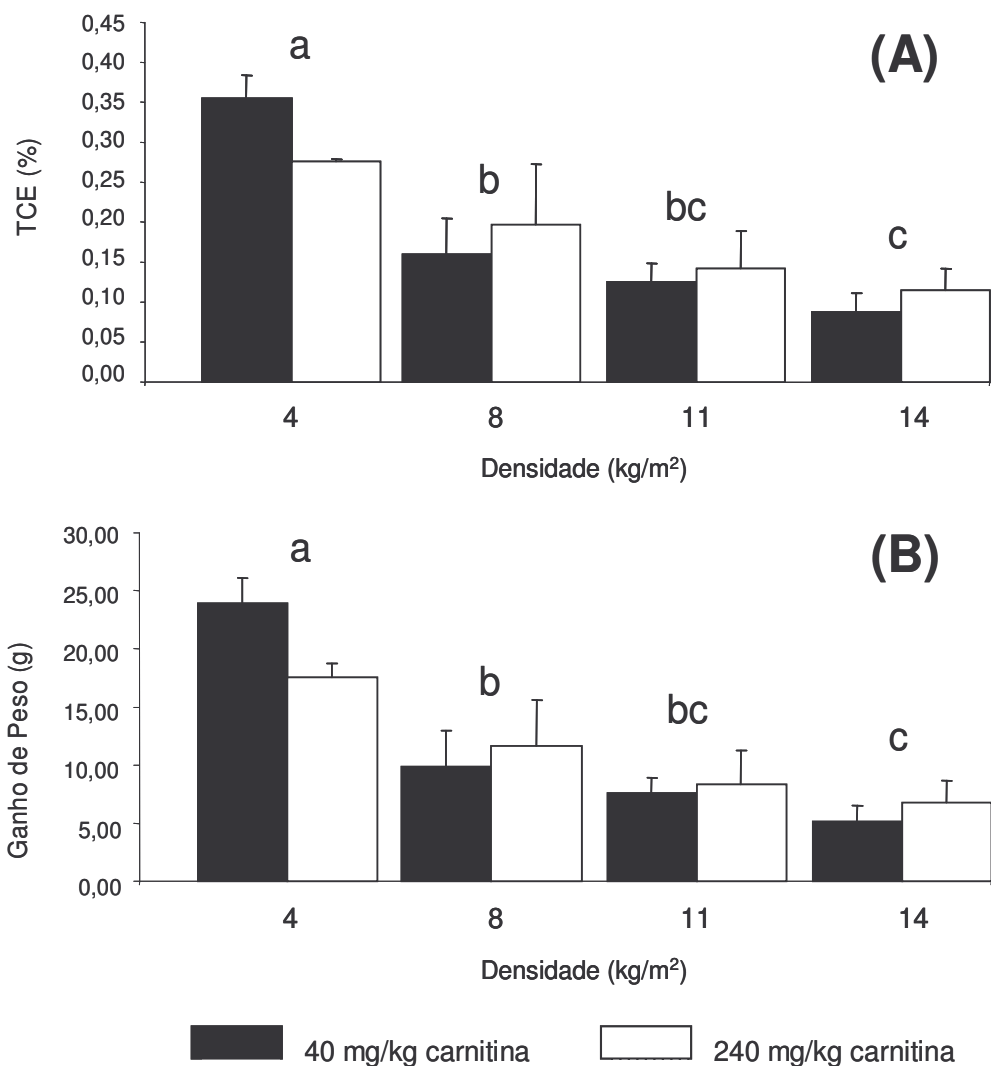


Figura IV – Valores médios (n=3 réplicas/tratamento) das alterações na taxa de crescimento específico (TCE, %/dia) (A) e no ganho de peso (GP, g) (B) dos pregados alimentados com duas dietas distintas (contendo 40 ou 240 mg/kg de L-carnitina) e mantidos sob diferentes densidades (4, 8, 11 e 14 kg/m²). Os valores com letras diferentes são significativamente diferentes, p<0.0001.

Pelo facto das diferenças estatísticas estarem atribuídas somente às diferentes densidades de cultivo, e para uma melhor compreensão e análise dos resultados, estes foram agrupados considerando somente o efeito da densidade no desempenho dos peixes (n=6 réplicas/densidade).

Na tabela seguinte apresentam-se os dados referentes ao ganho de peso, à conversão alimentar, à taxa de eficiência proteica, ao consumo voluntário aparente, ao índice hepatossomático, ao coeficiente de eficiência proteica, à taxa de mortalidade e ao factor de condição.

Tabela IV – Valores médios (n=6 réplicas/densidade) dos parâmetros de desempenho dos pregados mantidos em diferentes densidades de cultivo, ao final de 75 dias.

Densidade	GP ²	CA ³	TEP ⁴	TCE ⁵	CVA ⁶	IHS ⁷	CEP ⁸	M ⁹	K ¹⁰
4	17.72±3.94 ^a	2.22±0.37 ^b	1.12±0.23 ^a	0.28±0.05 ^a	0.6±0.13 ^a	0.66±0.08	4.19±0.56 ^a	0±0	1.49±0.05
8	10.54±3.15 ^b	2.85±0.59 ^b	0.86±0.19 ^b	0.17±0.05 ^b	0.51±0.05 ^{ab}	0.64±0.09	1.32±1.85 ^{ab}	1.78±2.44	1.48±0.05
11	7.85±2.51 ^b	3.5±1.46 ^b	0.7±0.19 ^{bc}	0.13±0.04 ^b	0.48±0.04 ^b	0.64±0.16	1.46±1.29 ^b	4.74±3.92	1.5±0.03
14	5.87±1.78 ^b	5.16±1.41 ^a	0.49±0.14 ^c	0.1±0.03 ^b	0.53±0.06 ^{ab}	0.71±0.11	1.05±1.74 ^b	3.95±3.4	1.5±0.04
Valor p	<0.0001	<0.0005	<0.0001	<0.0001	<0.05	NS	<0.05	NS	NS

¹ Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

² Ganho peso (g).

³ Conversão alimentar.

⁴ Taxa eficiência proteica.

⁵ Taxa de crescimento específico (%).

⁶ Consumo voluntário de alimento (%).

⁷ Índice hepatossômático.

⁸ Coeficiente de eficiência proteica (%).

⁹ Mortalidade (%).

¹⁰ Factor de condição K (%).

Foram constatadas diferenças significativas em relação ao ganho de peso, à conversão alimentar, à taxa de eficiência proteica, à taxa de crescimento específico, ao consumo voluntário de alimento e ao coeficiente de eficiência proteica nos peixes mantidos nas diferentes densidades de cultivo.

Observa-se uma relação inversamente proporcional entre o ganho de peso e o incremento da densidade de cultivo. A taxa de crescimento específico, e conseqüentemente o ganho de peso dos peixes diminuiu à medida que se promove o aumento da densidade de cultivo. No final do ensaio os peixes apresentaram um ganho de peso de 17.72±3.94g quando acondicionados na densidade de 4 kg/m², enquanto que os peixes acomodados nas densidades de 8, 11 e 14 kg/m² apresentaram ganhos inferiores, de 10.54±3.15, 7.85±2.51 e 5.87±1.78g, respectivamente.

Embora sem significado estatístico (p=0.05), a mesma relação é verificada quando observamos a taxa de mortalidade dos peixes durante o ensaio. À medida que promovemos o aumento na densidade de estabulação, verificamos uma diminuição na taxa de sobrevivência. Enquanto que, na menor densidade de cultura não foram constatadas mortalidades, nas densidades de 8, 11 e 14kg/m² registaram-se respectivamente 1.78%, 4.74% e 3.95% de mortalidade, evidenciando nas condições experimentais, um melhor desempenho dos peixes quando mantidos em baixas densidades (melhor bem estar animal).

A taxa de crescimento específico e a taxa de eficiência proteica também são negativamente afectadas com o aumento das densidades ($p < 0.0001$). A taxa de conversão alimentar também segue essa tendência, sendo fortemente prejudicada pelo aumento da densidade ($p < 0.005$).

Quanto ao consumo voluntário de alimento, não se observa uma tendência linear dos dados, porém, mais uma vez observamos que os peixes mantidos em condições de menor densidade se alimentaram melhor.

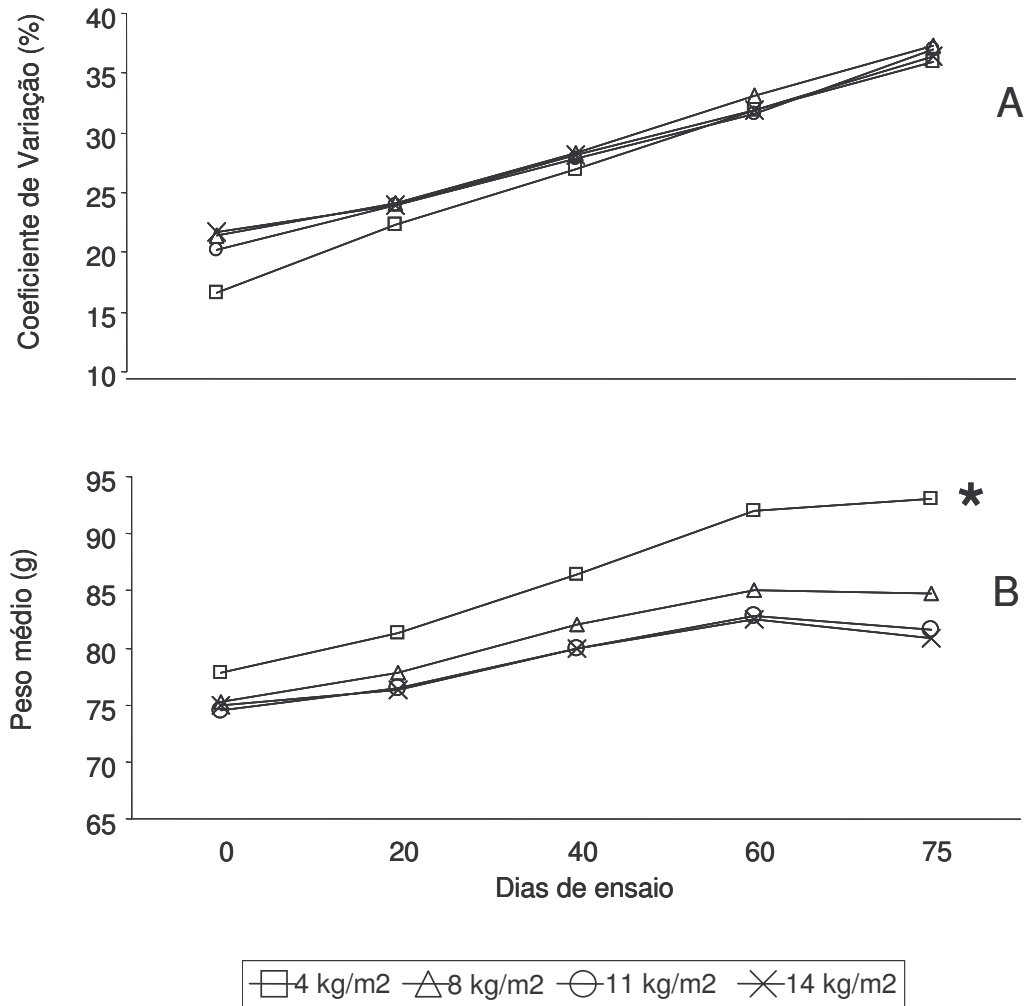


Figura V – Valores médios ($n=6$ réplicas/tratamento) para o coeficiente de variação do peso (A) e para a curva de crescimento em peso (B) de pregados, submetidos a densidades de estabulação de 4, 8, 11 e 14 kg/m^2 durante o período experimental. Valores assinalados com (*) diferem estatisticamente, $p < 0.05$.

As médias finais do peso de 93.11, 84.72, 81.58 e 80.86g, respectivamente, nas densidades de 4, 8, 11 e 14 kg/m², demonstraram que o tratamento com menor densidade foi significativamente superior aos demais (**Figura V**).

Neste trabalho, em todas as densidades, houve aumento do coeficiente de variação com o tempo, não havendo diferença significativa para este parâmetro entre as diferentes densidades ($p > 0.05$). Assim, com base neste parâmetro, não parece ter havido dominância hierárquica associada à variação de densidade. Entretanto, um padrão de comportamento agressivo foi observado em alguns tratamentos quando alguns peixes, prestes a abocanhar o alimento, desistiam diante da presença de um outro que se aproximava. Tal conduta era acompanhada, em certos casos, da tentativa de morder o oponente.

5.2. Excreção pós-prandial

O efeito da L-carnitina na excreção pós-prandial de amônia total – TAN ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$), durante o período de 24 horas representa-se na figura 6.

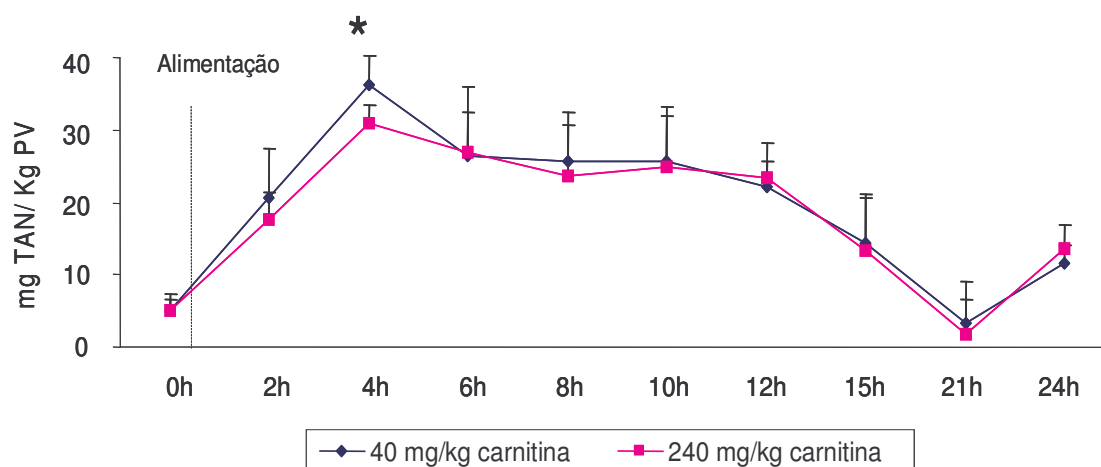


Figura VI – Valores médios (n=12 amostras/tratamento) das alterações na excreção total de azoto – TAN ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) em pregados, pré-acondicionados com dietas contendo dois níveis de L-carnitina. *, significativamente diferente, $p < 0.05$.

No presente estudo foi possível observar um aumento imediato na excreção azotada após a alimentação. A excreção de azoto - TAN atingiu o pico aproximadamente 4 horas após a alimentação, assim como o verificado para outras espécies de peixes (Robaina *et al.*, 1999; Ismiño-Orbe *et al.*, 2003; Gómez-Requeni *et al.*, 2003; Webb Jr. e Gatlin III, 2003) e decresceu lentamente, atingindo às 21 h um nível de TAN (2.4 mg/kg PV) inferior ao da

pré-alimentação. O efeito da suplementação com L-carnitina nos níveis de TAN foi nítido no momento do pico de excreção, mostrando que os peixes alimentados com 40 mg/kg de L-carnitina apresentaram uma excreção azotada significativamente superior aos peixes alimentados com a dieta contendo 240 mg/kg de L-carnitina, sendo isto comprovado pela análise estatística, para um nível de significância de 5%.

5.3. Composição corporal

Na **Tabela IV** é apresentada a média dos valores referentes à composição corporal dos pregados após 75 dias de ensaio de alimentação.

Tabela V – Composição corporal dos peixes mantidos sob diferentes densidades e alimentados com diferentes dietas¹.

	Densidade								ANOVA, Pr > F ¹		
	4		8		11		14		C	D	C x D
	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta	Carnitina. mg/kg dieta			
40	240	40	240	40	240	40	240				
Cinza (%)	19.5±2.0	19.5±0.8	22.2±2.4	20.8±1.7	22.3±3.2	19.0±1.0	20.3±2.1	20.1±1.1	NS	NS	NS
Lipídio (%)	9.1±2.1	10.3±1.0	5.2±0.4	7.7±1.4	8.5±0.6	11.9±0.1	10.8±4.3	6.3±2.0	NS	NS	NS
Proteína (%)	73.6±3.0	74.5±1.6	77.4±2.9	74.4±0.4	72.8±0.4	72.5±1.2	73.5±3.3	75.9±0.5	NS	NS	NS
Energia (KJ/g)	18.9±0.2	18.9±0.2	17.7±0.1	18.0±0.9	18.3±0.0	19.2±0.1	19.1±0.6	18.0±0.8	NS	0.038	NS
Carnitina (mg/kg)	105.6±14.9	117.0±4.9	75.3±1.5	74.8±11.0	79.0±12.6	100.1±14.8	101.8±3.6	127.7±16.2	<0.05	<0.005	NS

¹ Valores expressos em matéria seca.

² Os dados mostrados correspondem a média±desvio padrão (n=6 peixes/tratamento).

³ Probabilidade associada a estatística F; C = efeito da L-carnitina; D = efeito da dieta; C x D = efeito de interacção.

Verificamos que as diferentes densidades tiveram um efeito na percentagem de energia da carcaça e que os peixes mantidos na densidade de 8kg/m² apresentaram os menores teores de energia corporal, sendo os valores de 75.3±1.5 e 74.8±11.0 KJ/g para os peixes alimentados com as dietas de 40 e 240 mg/kg de L-carnitina, respectivamente. Entretanto, este parâmetro não varia por efeito das dietas.

Os níveis de L-carnitina na carcaça foram claramente afectados pelas diferentes densidades de cultivo, assim como pelo teor de L-carnitina dietética. Entretanto, não foi verificada nenhuma interacção entre o teor de L-carnitina na dieta e as diferentes densidades em que os peixes foram submetidos ao longo do ensaio.

Não foram detectadas diferenças estatísticas para o teor de cinza, lípidos e proteínas da carcaça entre os diferentes tratamentos, $p > 0.05$. Isto evidencia que para estes pregados a L-carnitina não promoveu um benefício expressivo quanto ao aumento da oxidação lipídica, o que seria comprovado pela diminuição no teor de lípidos corporais à medida que se fosse aumentando o teor de L-carnitina na dieta.

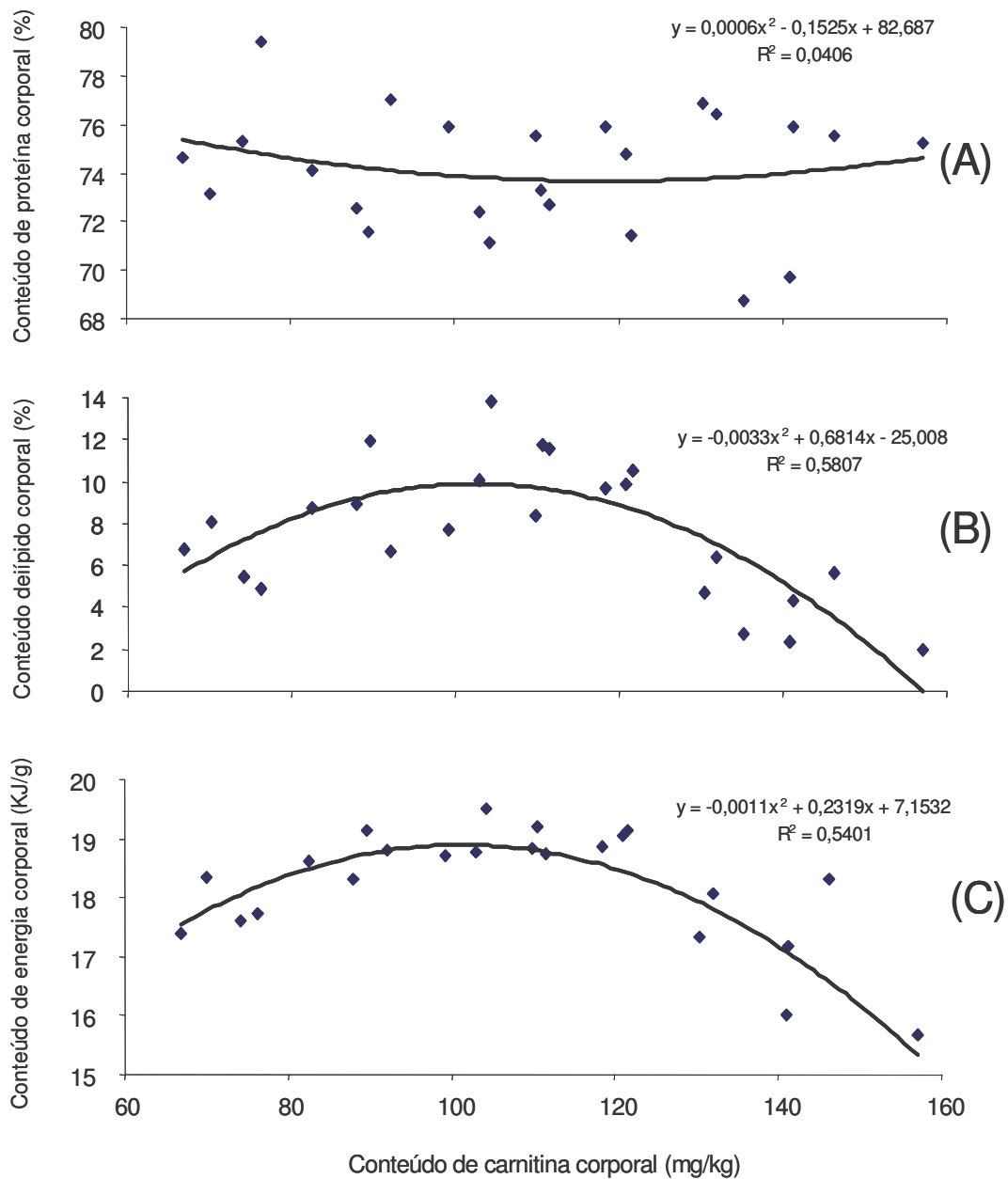


Figura VII – Relação entre o teor de L-carnitina corporal (mg/kg) e (A) o conteúdo de proteína corporal, % na MS; (B) o conteúdo de lípido corporal, % na MS; e (C) o conteúdo de energia corporal, KJ/g na MS, em que MS = matéria seca.

Verifica-se na **figura VII** que os teores de energia e de lípidos na carcaça sofrem um efeito da variação no conteúdo de L-carnitina no organismo do animal.

Nota-se um aumento no conteúdo energético e lipídico da carcaça à medida que se aumenta o teor de L-carnitina no organismo do animal. Porém, a partir de aproximadamente 100 mg/kg de L-carnitina, observamos uma alteração na curva de tendência, sendo que a partir deste nível, ocorre uma diminuição acentuada no teor de gordura corporal, e naturalmente, uma redução no teor energético. Nos pregados estudados percebemos que a partir deste teor (100 mg/kg) a promoção da oxidação dos ácidos gordos passa a ser realmente efectiva e que é evidenciada pela combustão de lípidos corporais.

Não foi observado uma influência directa da L-carnitina na variação do conteúdo proteico da carcaça. Constatamos que mesmo havendo uma grande variação no conteúdo de L-carnitina corporal, a percentagem de proteína corporal variou muito pouco.

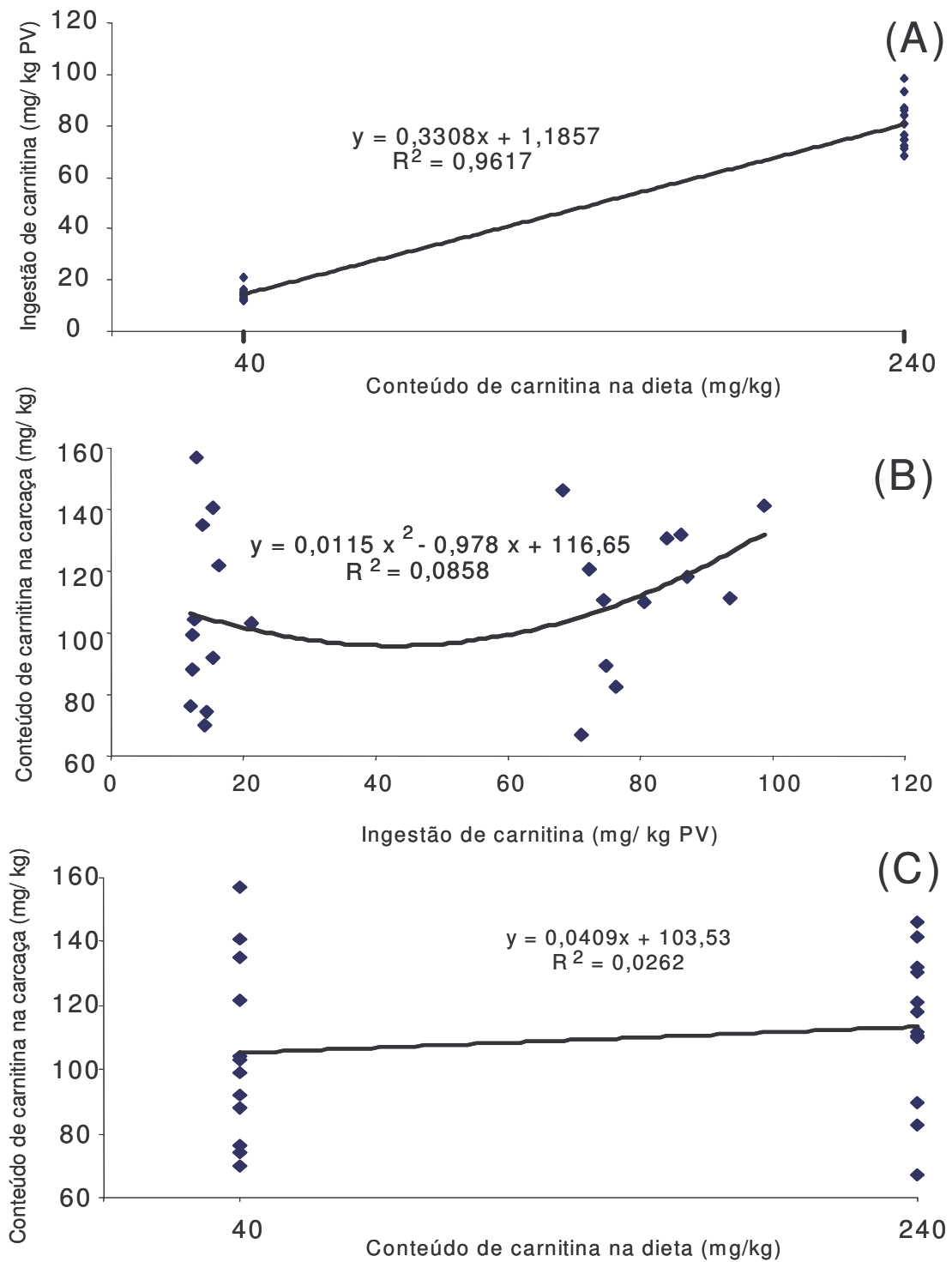


Figura VIII – (A) Relação entre o conteúdo de L-carnitina da dieta (mg/kg) e a ingestão de L-carnitina pelos peixes (mg/kg PV); (B) Relação entre a ingestão de L-carnitina pelos peixes (mg/kg PV) e o conteúdo de L-carnitina na carcaça (mg/kg); (C) Relação entre o conteúdo de L-carnitina da dieta (mg/kg) e o conteúdo de L-carnitina na carcaça (mg/kg).

Na **Figura VIII (A)** é possível verificar uma relação directa entre o teor de L-carnitina na dieta e a ingestão de L-carnitina pelos peixes. A medida que se aumenta o teor de L-carnitina na ração, verifica-se um aumento da ingestão desta pelo animal. Os peixes alimentados com a dieta controlo, 40 mg/kg de L-carnitina, ingeriram uma quantidade de L-carnitina muito inferior (14.42 ± 2.5 mg de L-carnitina/kg PV) aos peixes alimentados com a ração suplementada, 240 mg/kg de L-carnitina (80.58 ± 9.41 mg de L-carnitina/kg PV).

Na **Figura VIII (B)** observamos que a partir da ingestão de 50 mg de L-carnitina/kg de PV há uma ligeira tendência de aumento no teor de L-carnitina na carcaça. A partir dos 80 mg de L-carnitina ingerido/kg de peso vivo podemos constatar um aumento significativo no teor de L-carnitina na carcaça.

Na **Figura VIII (C)** é possível observar uma pequena tendência de elevação no teor de L-carnitina na carcaça ao fornecermos uma dieta com um teor mais elevado de L-carnitina. Esperávamos, que houvesse uma deposição bem mais acentuada de L-carnitina na carcaça nos peixes que receberam a dieta suplementada, já que esta apresenta um teor 6 vezes superior de L-carnitina ao da dieta controlo.

Entretanto, a variação dos níveis de L-carnitina presente nos tecidos dos animais se deve a uma combinação de factores que não podem ser analisados isoladamente: a) à absorção de L-carnitina presente nas fontes suplementares (dieta); b) à modesta taxa de síntese; c) à eficiência de reabsorção dos tecidos. A discussão dos resultados é apresentada no Capítulo Discussão, item 6.5.

6. DISCUSSÃO

6.1. Parâmetros físico-químicos dos tanques

6.1.1. Variação do oxigênio dissolvido, temperatura e salinidade

Os valores referentes ao oxigênio dissolvido (mg/L) não apresentaram muitas variações ao longo da experiência, apresentando como valor médio 6.17 ± 0.97 .

Relativamente aos valores de temperatura, nota-se que no início do ensaio os valores de temperatura foram mais elevados, sendo isso decorrente de algumas avarias que ocorreram no sistema de refrigeração da água e do ambiente. Além disso, o sistema de refrigeração encontrava-se sub-dimensionado para o volume de água do sistema, e como a temperatura do ar encontrava-se muito elevada, o sistema não tinha capacidade de manter a temperatura média em torno dos 19°C. Foi durante este período do ensaio que os tanques atingiram as temperaturas mais elevadas. Ao 16º dia a temperatura atingiu os 24.3°C, sendo controlada já no dia seguinte. Após a terceira semana de experiência, procedeu-se o reparo do equipamento de refrigeração, sendo, a partir de então, registradas temperaturas mais constantes e mais amenas até o final do estudo. O valor médio de temperatura (°C) registrado foi de 19.7 ± 4.5 .

Quanto à salinidade, foi realizada uma ambientação dos peixes no início do ensaio. Inicialmente a salinidade rondava os 33 ‰, sendo, ao longo dos primeiros dias, feito uma diminuição gradativa até que a mesma atingisse os 28 ‰. A partir do 40º dia é possível observar uma elevação gradativa da salinidade, sendo atingido os 32 ‰. Embora tenhamos observado pequenas alterações de salinidade no decorrer do ensaio, acredita-se que estas não tenham tido qualquer influência no desempenho dos peixes. Como é de conhecimento, o pregado é uma espécie eurialina, suportando grandes variações de salinidade. Segundo Carvalho e Diniz (1998) e Menu e Person (1991), o pregado apresenta crescimento ótimo com salinidades entre os 20-35‰. O valor médio de salinidade (‰) ao longo dos 75 dias foi de 29.4 ± 3.6 .

6.1.2. Variação da amônia ionizada e dos nitritos

Durante alguns dias foram registrados valores acima dos 1.0 ± 0.7 mg/L para amônia total (TAN= $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$) e de 1.2 ± 0.9 mg/L para NO_2^- . Após aumentar a eficiência dos

filtros biológicos através da inoculação de culturas de bactérias dos géneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* durante o ensaio, observou-se uma pequena melhora nos níveis de amónia e nitrito. Como meio de prevenção, optou-se pela realização de uma substituição parcial da água do sistema (± 200 L/dia), a fim de evitar que os valores de amónia e nitrito atingissem níveis tóxicos.

Os valores médios registrados (mg/L) durante o ensaio foram de 1.0 ± 0.7 para amónia ionizada e de 1.2 ± 0.9 para nitrito.

6.2. Efeitos dos parâmetros químicos da água no crescimento

Na piscicultura intensiva, onde os peixes são mantidos em altas densidades, uma acumulação gradual de amónia na água pode ocorrer, especialmente quando a renovação de água é pequena e em sistemas de recirculação de água. Os dados referentes à toxicidade da amónia em peixes de água salgada e os factores envolvidos com sua toxicidade são pouco documentados se comparados com os dados disponíveis para as espécies de água doce (EPA, 1989, 1998). A maioria dos resultados publicados sobre os efeitos da amónia em peixes marinhos está restrita às estimativas de sobrevivência e aos efeitos relacionados aos parâmetros de crescimento.

Os mecanismos relacionados à toxicidade da amónia (considerada uma das principais neurotoxinas nos mamíferos) permanecem pouco claros nos teleósteos (Mommsen e Walsh, 1992; Tomasso, 1994). Informações relacionadas às respostas fisiológicas dos peixes quanto à exposição a amónia a longo prazo são raras, tanto em peixes marinhos (Pesson-Le Ruyet *et al.*, 1997; Rasmussen e Korsgaard, 1998) como em salmonídeos cultivados em água do mar (Fivelstad *et al.*, 1995; Knoph e Thorud, 1996).

O pregado, assim como outras espécies de peixes, apresenta uma capacidade parcial de se desintoxicar quando mantido em ambientes com altas concentrações de amónia (Wood, 1993; Pesson-Le Ruyet *et al.*, 1998; Wang e Walsh, 2000). As lamelas branquiais, frequentemente expostas às águas de baixa qualidade, além de envolvidas em muitas funções fisiológicas (por exemplo, respiração e troca de iões), são também as principais vias de excreção dos resíduos azotados. O stress não específico frequentemente causa perturbações osmoregulatórias, acarretando um aumento nos níveis de iões e do cortisol plasmático nos peixes marinhos (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999).

Verifica-se na literatura que a toxicidade da amónia está associada a uma grande variedade de disfunções nos peixes, podendo levar à redução do crescimento ou mesmo à morte dos

indivíduos. Alguns trabalhos têm procurado testar a toxicidade de azoto total – TAN no pregado.

Person-le Ruyet *et al.* (2003) desenvolveram um estudo onde expuseram juvenis de pregado sobre diferentes concentrações de TAN (0.16, 5.6, 11.4, 21.1 e 27.2 mg/L) por diferentes períodos (24 a 81 dias). Os resultados mostram que os pregados mantidos sob as concentrações de 0.16 e 5.6 mg/L de TAN apresentaram taxas de ingestão e de crescimento similares durante o primeiro mês de exposição (ganhos de 1.55 e 1.59 g/dia, respectivamente), e crescimentos inferiores nos demais grupos estudados. Mesmos nos grupos expostos às concentrações elevadas de azoto (21.1 e 27.2 mg/L) não foram observados sinais óbvios de stress, como alterações na cor da pele ou distúrbios comportamentais, e os peixes retirados para as medições não demonstraram qualquer sinal externo que poderia ser uma indicação de dor ou sofrimento. No entanto, não houve aumento de massa no grupo exposto aos 27.2 mg/L de TAN a partir do 28º dia. O aumento da massa no grupo exposto aos 21.1 mg/L de TAN, a partir do dia 57, foi de apenas 15% em relação ao observado no grupo exposto a menor concentração.

Como se verificou no nosso ensaio, os valores registrados relativamente ao TAN encontram-se na faixa dos 1.5 mg/L, valores intermediários aos 0.16 e 5.6 mg/L testados por Person-Le Ruyet *et al.* (2003), sendo um indicativo de que os metabólitos presentes nos tanques experimentais não interferiram de forma negativa no crescimento dos peixes durante os 75 dias em que decorreram o estudo.

6.3. Efeitos da densidade de estocagem no crescimento

Diferentes expressões tem sido utilizadas quando se procura examinar os efeitos da densidade de estocagem no crescimento dos peixes, podendo a densidade ser expressa em termos da biomassa ou do número de peixes por unidade de área ou volume. Ao longo de alguns estudos, o número de peixes é reduzido a medida que os peixes crescem, fazendo com que a densidade de estocagem no interior dos tanques permaneça constante.

Neste estudo, o número de pregados foi mantido constante do início ao fim do ensaio (com exceção das mortalidades), e portanto, houve um aumento da densidade (em kg/m²) ao longo do tempo, já que os peixes foram crescendo. Há uma evidência de que a remoção de alguns peixes e a manutenção de uma densidade constante pode romper hierarquias, modificando as interações entre os indivíduos e afectando as taxas de crescimento (Baardvik e Jobling, 1990), porém isto é difícil em condições de cultivo. Foi por este

mesmo motivo que optamos por manter o número de peixes constante durante todo o ensaio, sendo eliminados somente os peixes que morriam.

Nos nossos tanques experimentais observamos que o crescimento do pregado diminuiu ao aumentarmos a densidade de estocagem. Resultados similares foram observados com outras espécies marinhas quando se promoveu um aumento da densidade de estocagem (Koike *et al.*, 1979; Chen, 1984; Marsden e Williams, 1996; Lambert e Dutil, 2001; Souza-Filho e Cerqueira, 2003; Paspatis *et al.*, 2003).

A densidade populacional e as taxas de crescimento são frequentemente descritas por estarem relacionadas, no entanto, as correlações existentes entre estes dois factores não podem ser analisados linearmente, podendo apresentar interações positivas e negativas dependente da espécie e das condições em estudo. Baker e Ayles (1990), por exemplo, sugerem que o crescimento do salvelino-ártico (*Salvelinus alpinus*) aumenta com o aumento da densidade, com um limiar de 40-50 kg/m³ e, em valores superiores, declina. Bjornsson (1994) documenta que a densidade afecta o crescimento do alabote (*Hippoglossus hippoglossus*) apenas acima de um determinado limiar correspondente a aproximadamente 100% de cobertura do fundo do tanque.

Embora o uso de altas densidades seja um factor a se considerar durante a determinação dos custos de produção no sector da aquicultura, em estudos com populações de juvenis de pregados, o uso de densidades elevadas implica em um aumento do período de manutenção dos peixes durante a fase de crescimento devido a uma diminuição na taxa de crescimento específico (Irwin *et al.*, 1999).

Martínes-Tapia e Fernández-Pato (1991) testaram o efeito de duas densidades de estocagem, 0.25 e 0.5 kg/m² sobre o crescimento do pregado e não verificaram diferenças significativas entre o peso dos indivíduos após o ensaio. Os peixes utilizados nesta experiência, entretanto, tratavam-se de indivíduos com peso muito superior aos utilizados em nossa experiência, com biomassa aproximada de 500g. Já Danielssen e Hjertnes (1991) documentaram um crescimento reduzido em pregados quando mantidos em densidades de 150 kg/m³, observando uma melhora no crescimento ao se reduzir a densidade.

A relação inversamente proporcional entre o crescimento e a densidade de estocagem sugere que haja uma competição dependente da densidade por espaço ou alimento (Jarayabhand e Newkirk, 1989; Parsons e Dadswell, 1992).

Altas densidades nos tanques e jaulas de cultivo podem dificultar os peixes do fundo a moverem-se e ingerir alimento, comprometendo desta maneira o seu crescimento, mesmo em situações em que haja disponibilidade de alimento.

Além disso, o aumento da densidade de estocagem promove um aumento das interações entre os indivíduos. Estas interações, ao longo de algum tempo, provocam variações de tamanho entre os indivíduos do grupo, sendo isto o resultado da supressão do crescimento dos indivíduos subordinados pelos indivíduos maiores (Jobling, 1985). Algumas espécies têm comportamento bastante específico, sendo que as hierarquias de dominância e submissão criadas, resultam em situação de stress, tanto para os dominantes quanto para os submissos, comprometendo desta forma o desempenho de todo o grupo.

As instalações comerciais de produção de peixes planos em tanques de terra utilizam, usualmente, densidades elevadas que alcançam os 40 kg/m² no caso da solha (Honda, 1998) e os 70 kg/m² no linguado (Liewes, 1984). Para o alabote do atlântico Bjornsson (1994) sugere que a melhor densidade para peixes com 2 kg permaneça entre os 25 e os 50 kg/m² e para peixes com 10 kg, entre os 50 e os 100 kg/m². No entanto, em operações comerciais de produção os peixes planos são normalmente produzidos em concentrações que variam dos 15 aos 50 kg/m², dependendo da espécie e do método de produção empregado (Pesson-Le Ruyet *et al.*, 1991; Liewes, 1984; Martinez-Tapia e Fernandez-Pato, 1991; Mallekh *et al.*, 1998; Silva e Velez, 1998; Kikuchi, 2000; Merino *et al.*, 2007). Uma densidade segura sugerida para os peixes planos situa-se entre 100 e 200% de cobertura da área, se utilizado como método de medição a percentagem de cobertura do fundo (Bjornsson, 1994; King *et al.*, 1998).

A biomassa de estocagem utilizada nesta experiência com o pregado variou entre os 4 e os 14 kg/m², densidade similar a utilizada em alguns meios de cultivo comerciais. Segundo a literatura, o pregado pode ser cultivado em densidades de estocagem bastante altas, que em operações comerciais geralmente rondam os 25 a 30 kg/m³ (Iglesias *et al.*, 1978), sendo a máxima densidade de estocagem sustentável descrita de 75 kg/m³ para pregados adultos em sistemas abertos (Jones *et al.*, 1981). Em algumas experiências com pregados de maior peso, têm se obtido resultados interessantes, atingindo concentrações de cultivo de até 60 kg/m² (Mallekh *et al.*, 1998; Martínez-Tapia e Fernández-Pato, 1991) sem comprometer o crescimento dos peixes. É importante chamar a atenção, entretanto, que nestes casos de sucesso do cultivo adensado, os sistemas utilizados são providos de uma elevada taxa de renovação de água. Os sistemas de produção abertos e aqueles que envolvem uma grande taxa de renovação da água apresentam uma melhor qualidade de água (menor nível de metabólitos e altos níveis de oxigênio dissolvido), o que possibilita a produção dos peixes em densidades maiores. Em sistemas fechados ou sistemas com pouco fluxo de água, a qualidade de água pode ser um factor limitante, implicando no cultivo em densidades

inferiores. O sistema de produção utilizado na nossa experiência se trata de um sistema fechado com recirculação de água, em que somente uma pequena fracção da água é substituída diariamente, podendo este ser um dos factores que não permitiu que atingíssemos densidades de produção extremamente elevadas. Vale lembrar que muitas fazendas aquícolas localizadas em Portugal produzem pregados em sistemas semi-intensivos - em tanques escavados de terra - sendo que a capacidade de produção destes sistemas está relacionada com o desenho e com a cota dos reservatórios, onde a adução e a qualidade da água muitas vezes é dependente das oscilações das marés. Portanto, embora em alguns casos se tenha atingido densidades de produção elevadas, como referenciado por Mallekh *et al.* (1998) e Martínez-Tapia e Fernández-Pato (1991), as condições testadas fogem à realidade portuguesa.

A habilidade do pregado em se manter em condições de altas densidades de estocagem pode estar relacionada ao seu habitat bentónico, aos baixos níveis de actividade e baixa exigência em oxigénio dissolvido (Jones *et al.*, 1981). Entretanto, essas condições descritas não levam em conta que haja interacções comportamentais entre os indivíduos, que em algumas situações, pode comprometer o ganho em biomassa.

Alguns estudos têm sugerido que um aumento no coeficiente de variação seja indicativo do estabelecimento de dominância hierárquica e competição pelo alimento, com a supressão do crescimento de indivíduos subordinados por peixes dominantes (Higby e Beulig, 1988). Neste trabalho, em todas as densidades, houve aumento do coeficiente de variação com o tempo, não havendo diferença significativa para este parâmetro entre as diferentes densidades ($p > 0.05$). Assim, com base neste parâmetro, não parece ter havido dominância hierárquica associada à variação de densidade. Entretanto, um padrão de comportamento agressivo foi observado em todos os tratamentos quando alguns peixes, prestes a abocanhar o alimento, desistiam diante da presença de um outro que se aproximava. Tal conduta era acompanhada, em certos casos, de “ataques” (tentativa de morder o oponente). Neste estudo, os pregados cultivados sob altas densidades de estocagem apresentaram taxas de crescimento significativamente inferiores àqueles cultivados sob baixas densidades. Isto suporta o ponto de vista de que o aumento da densidade acarreta um impacto negativo nas taxas de crescimento das populações de pregado, como observado por Danielssen e Hjertnes, 1991.

Inúmeros trabalhos reportam uma correlação entre a densidade de estocagem e o crescimento dos peixes. Entretanto, a relação entre os dois factores não parece ser uniformemente linear, podendo levar a respostas positivas ou negativas, de acordo com a

espécie e as condições em que se trabalha. No presente trabalho, desenvolvido em tanques com sistema de recirculação da água, nota-se um decréscimo acentuado na taxa de crescimento específico do pregado quando se promove um aumento da densidade de estocagem. De qualquer forma, a estocagem dos peixes em altas densidades é um factor a se considerar ao se levar em consideração os custos de produção das actividades aquícolas, em especial nos peixes planos, que ao contrário de inúmeras espécies de peixes, ocupam somente a área do fundo dos tanques e viveiros e não toda a coluna da água.

6.4. O efeito da L-carnitina no crescimento

O crescimento (medido como aumento de peso) é um factor de grande importância para os produtores de peixes e, por conseguinte, merece uma atenção especial no que diz respeito à promoção do crescimento. Os efeitos da suplementação L-carnitina em dietas para peixes são atribuídos ao aumento da utilização de energia, como resultado do aumento da oxidação lipídica pela mitocôndria.

Um efeito de promoção do crescimento devido à suplementação de L-carnitina foi encontrado pelos seguintes investigadores: Santulli D'Amelio (1986a), no robalo europeu; Twibell e Brown (2000) em híbridos de robalo-muge; Torrele *et al.* (1993), no catfish africano; Chatzifotis *et al.* (1995) no goraz; Keshavanath e Renuka (1998), no beijuado; Jayaprakas *et al.* (1996) na tilápia mossambicana; e Becker *et al.* (1999) na tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*). Uma indicação da promoção do crescimento (embora não significativa) foi encontrada por Becker e Focken (1995) e Focken *et al.* (1997) na carpa comum. Por outro lado, nenhum efeito da suplementação da L-carnitina sobre o crescimento foi observado por inúmeros investigadores, assim como o constatado por nós, em que os pregados cultivados durante os 75 dias de ensaio não apresentaram qualquer indicativo de benefício quanto ao aumento do peso ao consumirem dietas suplementadas. São exemplos de estudos sem um favorecimento do crescimento os desenvolvidos por Dias *et al.* (2001) no robalo; por Ozorio (2001) e Ozorio *et al.* (2001a, b) no catfish africano; por Rodehutschord (1995) e Chatzifotis *et al.* (1997) nas trutas; por Gaylord e Gatlin (2000) em híbridos de robalo-muge; por Ji *et al.* (1996) no salmão do Atlântico; por Harpaz *et al.* (1999) no ciclídeo ornamental (*Pelvicachromis pulcher*); por Dzikowski *et al.* (2001) em guppys (*Poecilia reticulata*); e por Schlechtriem *et al.* (2004) na tilápia híbrida (*O. Niloticus x O. Aureus*).

A interpretação desses resultados conflitantes é mais complexa do que inicialmente salta aos olhos. Essas variações nos resultados sugerem que os efeitos da L-carnitina possam estar atribuídos a inúmeros factores como a idade dos animais (Harpaz, 2005), composição da dieta e requerimentos metabólicos das espécies em estudo (Ozório, 2001).

Os peixes exigem um nível muito mais elevado de proteína em sua dieta em comparação com outros animais. Além do custo da proteína ser bastante alto, nos peixes uma parte desta é utilizada para fins energéticos e não para o crescimento (Wilson, 2002). Ao longo das duas últimas décadas tem havido uma pressão crescente para reduzir o nível de farinha de peixe nas dietas para peixes. Em muitos peixes carnívoros, rações com alta teor energético estão sendo utilizadas, sendo que o nível de gordura na dieta tem aumentado consideravelmente, atingindo valores superiores a 35% da composição (Harpaz, 2005). Estes elevados níveis de gordura na dieta tem desencadeado estudos com o interesse de aumentar a capacidade de utilização plena da energia alimentar pelo peixe. Como a L-carnitina está intimamente associada ao metabolismo dos ácidos gordos, muitos pesquisadores têm tentado estabelecer correlações entre os níveis de L-carnitina na dieta dos peixes e o metabolismo das gorduras (Burtle e Liu, 1994; Chatzifotis *et al.*, 1995). A oxidação das gorduras proporciona o mais alto e mais rentável rendimento energético dos ingredientes alimentares por unidade de peso.

Como a L-carnitina promove a oxidação de gordura, assumimos que a adição de L-carnitina à dieta dos pregados teria como resultado o aumento na “*protein sparing action*”, ou seja, proporcionaria uma redução na oxidação dos aminoácidos pelo aumento da oxidação lipídica, e assim, levaria a um aumento do ganho de peso nos peixes alimentados com a dieta suplementada. Entretanto, não observamos qualquer efeito benéfico da suplementação da mesma no crescimento dos animais. A quantidade de L-carnitina presente na dieta, a sua reabsorção e a biossíntese (que ocorre principalmente no fígado) são os principais factores que ditam os possíveis efeitos metabólicos da L-carnitina, dentre eles os efeitos no crescimento e na composição corporal dos indivíduos. Além disso, o efeito da L-carnitina é mais visível em peixes com maior acúmulo de gordura (Ozório, 2001), o que não é o caso dos pregados em estudo, podendo ser este um dos factores que justificariam uma ausência de efeito no crescimento.

Em um trabalho desenvolvido por Rebouche (1991), foi demonstrado que até 87% de toda a L-carnitina ingerida pode ser absorvida. Entretanto, a absorção de L-carnitina pelo intestino é inversamente proporcional ao teor de L-carnitina dietética (Heo *et al*, 2000) e em certos casos inversamente proporcional ao PE/NPE das dietas (Chien *et al*, 2000;

Ozório 2001), o que significa que parte da L-carnitina presente na dieta suplementada pode estar sendo excretada directamente. Além disso, a taxa síntese de L-carnitina é influenciada pelo teor de L-carnitina na dieta. Em alguns casos, o fornecimento de uma dieta com alta concentração de L-carnitina pode ocasionar a diminuição da síntese endógena desta substância (Rebouche e Chenard, 1991). Acreditamos que tanto uma diminuição da absorção quanto uma diminuição na síntese de L-carnitina pelos peixes alimentados com a dieta suplementada podem, no nosso caso, explicarem o porquê de não ter havido um benefício no crescimento dos peixes quando alimentados com uma dieta suplementada.

Possivelmente, se tivéssemos desenvolvido um estudo com um nível de suplementação muito maior, poderíamos ter encontrado algum resultado diferente. Entretanto, mesmo em alguns trabalhos com elevado teor de suplementação, como o desenvolvido por Burtle e Liu (1994), que estudou os efeitos da suplementação da L-carnitina (a um nível de 1000 mg/kg) na dieta do catfish do canal, muitas vezes não se observa qualquer benefício da L-carnitina sob o crescimento. Em alguns casos em que a L-carnitina tem mostrado efeitos benéficos, o nível requerido desta cara substância pode não justificar o crescimento adicional obtido. Becker *et al.* (1999) abordou esta questão afirmando que o melhor crescimento foi obtido pela adição de 150 mg/kg L-carnitina à dieta de tilápia híbrida e resultou numa melhora da conversão alimentar, com uma redução de 13% no fornecimento de alimento para se atingir o mesmo peso. Assim, de acordo com os seus cálculos, apesar do elevado preço do L-carnitina o aquicultor continuaria a se beneficiar da suplementação de L-carnitina na dieta. Infelizmente, na maioria dos estudos, os efeitos positivos da suplementação com L-carnitina não leva em conta o aspecto económico.

6.5. A excreção pós-prandial e os efeitos da L-carnitina

Como já comentado anteriormente, a amónia é o principal produto da excreção dos peixes, sendo responsável por 80% do total excretado por várias espécies (Westers, 2001), sendo esta molécula derivada da digestão das proteínas e do catabolismo dos aminoácidos (Boyce, 1999) e sua síntese é energeticamente mais eficiente que outros produtos de excreção tais como o ácido úrico e a ureia (Jobling e Baardvik, 1994), ocorrendo principalmente no fígado. A amónia produzida é transportada pelo sistema sanguíneo até as brânquias, de onde é excretada para a água, que, em solução aquosa, normalmente está em equilíbrio entre a forma ionizada (NH^+) e a não-ionizada (NH) (Boyce, 1999).

Alguns trabalhos, como o de Ozório (2001) mostram que através do acréscimo de L-carnitina na ração, ocorre uma redução da excreção de azoto, o que também se verificou em nosso estudo. Como constatado estatisticamente ($p < 0.05$), pudemos observar que durante o pico de excreção (4 horas pós-prandial) houve uma ligeira diminuição da liberação de compostos azotados quando os peixes receberam a dieta suplementada com L-carnitina.

Quanto ao pico de excreção, notamos que este ocorreu assim como o verificado para outras espécies de peixes (Robaina *et al.*, 1999; Ismiño-Orbe *et al.*, 2003; Gómez-Requena *et al.*, 2003; Webb Jr. e Gatlin III, 2003), e decresceu vagarosamente, até atingir um valor inferior ao período pré-alimentação. Embora os valores de excreção de azoto total para o pregado tenham sido elevados, verificamos que a taxa de excreção pós-prandial TAN se apresentou dentro faixa documentada para outras espécies de peixes, como para o robalo, *Dicentrarchus labrax* (Robaina *et al.*, 1999) e para a dourada, *Sparus aurata* (Gómez-Requena *et al.*, 2003). Impulsos de excreção azotada pós-alimentação têm sido documentados também na garoupa, *Epinephelus areolatus*, e no luciano do mangal, *Lutjanus argentimaculatus* (Leung *et al.*, 1999). Segundo Kaushik e Dabrowski (1983), a durabilidade e o incremento de azoto excretado imediatamente após a alimentação está intimamente relacionado a idade dos animais, podendo o pico de excreção ser prolongado a medida que os animais crescem, sendo a duração também afectado pela composição da dieta.

6.6. Efeito da L-carnitina na composição corporal

A grande maioria dos estudos têm demonstrado ambiguidades quanto as respostas à administração de L-carnitina. Muitos estudos demonstram que a quantidade extra de L-carnitina presente nas dietas aumentam a taxa de oxidação lipídica. Entretanto, em muitos outros trabalhos não se obtém qualquer benefício desta suplementação, como comprovado no nosso caso. Isto pode ser interpretado de duas maneiras: 1) a síntese endógena de L-carnitina é adequada pelo peixe para manter os seus níveis teciduais suficientes para o crescimento; ou 2) é possível que a resposta a alimentação com dieta suplementada seja influenciada por factores ambientais e fisiológicos.

A variação dos níveis de L-carnitina presente nos tecidos dos animais se deve a uma combinação de factores que não podem ser analisados isoladamente: a) à absorção de L-

carnitina presente nas fontes suplementares (dieta); b) à modesta taxa de síntese; c) à eficiência de reabsorção dos tecidos.

Como já mencionado, entre 30 e 87% de toda a L-carnitina ingerida é absorvida. Em alguns casos, o fornecimento de uma dieta com alta concentração de L-carnitina pode ocasionar a diminuição da síntese endógena desta substância. Num trabalho desenvolvido por Rebouche e Chenard (1991), foi estimado a taxa de síntese endógena de L-carnitina em humanos adultos que recebiam dietas com alto e baixo teor desta substância, em que constataram que o consumo da dieta com elevado teor de L-carnitina provocava um decréscimo na taxa de síntese de 2.47 para 0.48 $\mu\text{mol/kg/dia}$. No trabalho desenvolvido com o catfish Africano (Ozório, 2001) foi demonstrado que somente um fornecimento de L-carnitina na dieta acima dos 600 mg/kg resulta em uma deposição acentuada de L-carnitina no músculo do catfish Africano. Acreditamos que tanto uma diminuição da absorção quanto uma diminuição na síntese de L-carnitina pelos peixes alimentados com a dieta suplementada podem, no nosso caso, terem contribuído para o pequeno incremento de L-carnitina na carcaça ao fornecermos a dieta suplementada, conforme indicado na **Figura VIII (C)**. Além disso, pelo facto de termos utilizado dietas com teores inferiores aos 500-600 mg/kg de L-carnitina podem ter contribuído para não termos encontrado nenhuma influência significativa de deposição de L-carnitina na carcaça ao fornecermos as diferentes dietas. Infelizmente não trabalhamos com níveis extremamente elevados de L-carnitina, como presenciado em outros trabalho (Torreele *et al.*, 1993; Ozório, 2001; Ozório *et al.*, 2001 a), porém é plausível inferir que se houvésemos fornecido uma dieta com um maior nível de L-carnitina poderíamos constatar uma maior deposição de L-carnitina na carcaça do pregado.

É importante salientar também que, nos peixes, uma grande variação na concentração de L-carnitina é observada entre os diferentes tecidos, sendo que a maior parte da L-carnitina corporal se concentra no músculo. No trabalho de Ozório (2001) com o catfish demonstrou-se que 98% do total de L-carnitina corporal se concentra nos músculos, enquanto que 1.5% é encontrado no fígado e os restantes 0.5% nos demais tecidos. No nosso trabalho, ao procedemos a análise centesimal da carcaça, não presenciemos uma elevação tão acentuada nos teores de L-carnitina quanto esperávamos que acontecesse ao fornecermos a dieta suplementada. Não podemos nos esquecer, entretanto, de que os nossos peixes consistiam o lote de cauda (“slow growers”), e ao final do ensaio apresentavam-se consideravelmente magros, o que representa, um teor de músculo reduzido ao considerarmos a carcaça com um todo. Isto poderia ser uma possível

explicação ao facto de não termos constatado um aumento acentuado no teor de L-carnitina na carcaça dos peixes alimentados com um maior nível de L-carnitina dietética - **Figura VIII (B)**, já que ao procedermos a análise de composição corporal, estaríamos utilizando uma pequena fracção muscular em relação a nossa amostra total (carcaça). Portanto, estaríamos “diluindo” a L-carnitina presente no musculo pelos demais tecidos, resultando, durante a determinação, em um valor “diminuto” de L-carnitina depositado na carcaça.

Face aos resultados obtidos com o presente ensaio, é lícito afirmar que a utilização de uma densidade de estocagem de 4kg/m^2 proporciona os melhores resultados em termos de crescimento e sobrevivência para juvenis de pregado seleccionados do lote de cauda (“slow growes”) cultivados em um sistema fechado com recirculação de água. No que se refere à adição de L-carnitina na dieta, não se observa nenhuma melhora no desempenho dos juvenis de pregado quando realizado uma suplementação de L-carnitina na dieta a um nível de até 240 mg/kg , uma vez que não se verificaram diferenças significativas ($p>0.05$) entre os tratamentos. No entanto, futuros ensaios de dose-resposta com pregados deverão desenvolver-se, em que maiores níveis de suplementação de L-carnitina nas dietas devam ser testados, procurando perceber se há algum efeito benéfico do uso de L-carnitina no desempenho da espécie e até que ponto essa adição se justifica. Além disso, durante a determinação da composição corporal, seria interessante fazer não só a determinação da composição da carcaça, como também a determinação individualizada da L-carnitina nos diferentes tecidos, e ainda proceder o controle da quantidade excretada pelos peixes, procurando compreender com mais clareza o que realmente está acontecendo com a L-carnitina ingerida. Para a obtenção de resultados mais interessantes, propõe-se que a alimentação seja feita usando alimentadores automáticos/a pedido, já que segundo fontes literárias os peixes em meio natural apresentam um comportamento alimentar basicamente nocturno (Manu e Person, 1991),

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adron, J.W., Mackie, A.M., 1978. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* 12, 303-310.
- Alderson, R., 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 17, 291-309.
- Baardvik, B.M., Jobling, M., 1990. Effect of size-sorting on biomass gain and individual growth rates in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Aquaculture* 90, 11-16.
- Baker, R.F., Ayles, G.B., 1990. The effects of varying density and loading level on the growth of Arctic charr *Salvelinus alpinus* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *World Aquacult.* 21, 58-62.
- Becker, K., Focken, U., 1995. Effects of feed supplementation with L-carnitine on growth, metabolism and body composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 129, 341(Abstract).
- Becker, K.; Schreiber, S.; Angoni, C.; Blum, R., 1999. Growth performance and feed utilization response of *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* hybrids to L-carnitine measured over a full fattening cycle under commercial conditions. *Aquaculture* 174, 313-322.
- Beklevik, G. e Polat, A., 2001. Effects of DLAlanine and betaine supplemented diets on the growth and body composition of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1972). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 25, 301-307.
- Bjornsson, B., 1994. Effects of stocking density on growth rate of Halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture* 123, 259-270.
- Boyce, S. J., 1999. Nitrogenous excretion in the Antarctic plunderfish. *Journal of Fish Biology*, Cambridge, Inglaterra, v. 54, n. 1, p. 72-81.
- Brecka, B.J., Wahl, D.H., Hooe, M.L., 1996. Growth, survival and body composition of largemouth bass fed various commercial diets and protein concentrations. *The Progressive Fish Culturist* 58, 104-110.
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. Eds., *Fish Physiology*, vol 8. Academic Press, New York, 599-675.
- Brown, G.E., Brown, J.A., Srivastava, R.K., 1992. The effect of stocking density on the behaviour of Arctic charr *Salvelinus alpinus* L.. *J. Fish Biol.* 41, 955-963.

- Burtle, G.J., Liu, Q., 1994. Dietary carnitine and lysine affect channel catfish lipid and protein composition. *J. World Aquac. Soc.* 25, 169–174.
- Carr, W.E.S., Chaney, T.B., 1976. Chemical stimulation of feeding behavior in the pinfish, *Lagodon rhomboides*: characterization and identification of stimulatory substances extracted from shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A, 437-441.
- Carr, W.E.S., Netherton III, J.C., Gleeson, R.A., Derby, C.D., 1996. Stimulants of Feeding Behavior in Fish: Analyses of Tissues of Diverse Marine Organisms. *Biology Bull.* 190, 149-160.
- Carvalho, V. e Diniz, M., 1998. Pregado (Rodovalho) *Scophthalmus maximus*. In: Henriques, M.A.R. (Ed.), Manual de Aquicultura: ostra, amêijoia, camarão, truta, salmão, enguia, dourada, robalo, pregado. Impressão e acabamentos Marca-Artes Gráficas. 189-199.
- Cavichiolo, F., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Marques, H.L., Moreira, B.R.R., Maehana, K., Povh, J.A., Leonardo, J.M.L.O., 2002. Efeito da suplementação de vitamina C e vitamina E na dieta, sobre a ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante a reversão sexual. *Maringá* 24, n. 4, 943-948.
- Chapleau, F., 1993. Pleuronectiform relationships: a cladistic reassessment. *Bulletin of Marine Science* 52, 516-540.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T., Seikai, T., 1995. The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea bream fingerlings. *Fish. Sci.* 61, 1004–1008.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., Satoh, S., 1997. The effect of dietary carnitine supplementation on growth of rainbow trout fingerlings. *Fish. Sci.* 63, 321–322.
- Chen, H.C., 1984. Recent innovations in cultivation of edible molluscs in Taiwan, with special reference to the small abalone *Haliotis diversicolor* and the hard clam *Meretrix lusoria*. *Aquaculture* 39, 11–27.
- Chien, D., Dean, D., Saha, A.K., Flatt, J.P., Ruderman, N.B., 2000. Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *American Journal of Physiology* 279, E259-E265.
- Christianssen, J.S., Svendsen, Y.S., Jobling, M., 1992. The combined effects of stocking density and sustained exercise on the behaviour, food intake and growth of juvenile Arctic charr *Salvelinus alpinus* L.. *Can. J. Zool.* 70, 115-122.
- Coll, J., 1986. Acuicultura marna animal. Editorial Mundi Prensa, 2ª Edição, Madrid, 629p.

- Coughlan, J.P., Imsland, A.J., Galvin, P. T.; Fitzgerald, R. D. , Naevdal, G. , Cross, T. F., 1998. Microsatellite DNA variation in wild populations and farmed strains of turbot from Ireland and Norway: a preliminary study. *Journal of Fish Biology*, volume 52, Issue 5, 916-922.
- Coulibaly, A., Ouattara, I.N., Koné, T., N'Douba, V., Snoeks, J., Gooré Bi, G, Kouamélan, E.P., 2007. First results of floating cage culture of the African catfish *Heterobranchus longifilis* Valenciennes, 1840: Effect of stocking density on survival and growth rates. *Aquaculture* 263, 61-67.
- Cowey, C.B., Owen, J.M., Adron, J.W., Middleton, C., 1976. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of dietary fatty acids on growth and fatty acid composition of turbot *Scophthalmus maximus*. *Br. J. Nutr.* 36, 479-486.
- Cripps, S., Poxton, M., 1992. A review of the design and performance of tanks relevant to flatfish aquaculture. *Aquaculture Engineering* 11, 71-91.
- Danielssen, D.S., Hjertnes, T., 1991. Effect of dietary protein levels in diets for turbot *Scophthalmus maximus* L. to market size. In: Kaushik, S.J., Luquet, P.,_Eds., *Fish Nutrition in Practice _Les Colloques*, no. 61. INRA, Paris, 89-96.
- Dias, J., Arzel, J., Corraze, G., Kaushik, S.J., 2001. Effects of dietary L-carnitine supplementation on growth and lipid metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquac. Res.* 32, 206- 215.
- Dzikowski, R., Hulata, G., Karplus, I., Harpaz, S., 2001. Effect of temperature and dietary L-carnitine supplementation on reproductive performance of female guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture* 199, 323-332.
- EPA, 1989. Ambient water quality criteria for ammonia (salt-water). EPA 440/5-88-0C. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- EPA, 1998. Update of ambient water quality criteria for ammonia. EPA 822-R-98-008. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- FAO, 2006. Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture. SOFIA Report, 1-64.
- FAO, 2007. Food and Agriculture Organization. Cultured aquatic species information program *Psetta maxima*. [http://www.fao.org/fi/website/FIRetrieveAction.do?dom=culturespecies&xml=Psetta_maxima.xml].
- Félix N. e Sudharsan, M., 2004. Effect of glycine betaine, a feed attractant affecting growth and feed conversion of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Nutrition* 10, 193-197.

- Fernández-Pato, C. A. e Matínez-Tapia, C., 1991. Use of L-carnitine supplementation in larval rearing of turbot (*Scophthalmus maximus*): first results. ICES CM/F 16, 10p.
- Fivelstad, S., Schwarz, J. & Stromsnes, H., 1995. Sublethal effects and safe levels of ammonia in seawater for Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). Aquacultural Engineering 14, 271–280.
- Focken, U., Becker, K., Lawrence, P., 1997. A note on the effects of L-carnitine on the energy metabolism of individually reared carp, *Cyprinus carpio* L.. Aquac. Nutr. 3, 261-264.
- Gaylord, T.G., Gatlin, D.M., 2000b. Dietary lipid level but not L-carnitine affects growth performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). Aquaculture 190, 237– 246.
- Gjedrem, T. 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. World aquaculture 28, 33-45.
- Goh, Y., Tamura, T., 1980. Effects of amino acids on the feeding behaviour in red sea bream. Comp. Biochemistry Physiology 66C, 225–229
- Gomes, E., Dias, J., 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 Resource 10, 385-389.
- Gómez-Requena, P., Mingarroa, M., Kirchnerb, S., Caldach-Ginera, J.A., Médaleb, F., Corrazeb, G., Panseratb, S., Martinc, S.A.M., Houlihanc, D.F., Kaushikb, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 220, 749–767.
- Gulçin, I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sciences 78, 803-811.
- Hanley, F., 1991. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture 93, 323-334.
- Harpaz, S., 1997. Enhancement of growth in juvenile freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, through the use of a chemoattractant. Aquaculture 156, 221-227.
- Harpaz, S., Becker, K., Blum, R., 1999. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish (*Pelvicachromis pulcher*) - preliminary results. Journal of Thermal Biology 24, 57-62.

- Harpaz, S., 2005. L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition - a review. *Aquaculture* 249, 3-21.
- Hatcock, J. N. e Shao, A., 2006. Risk assessment for L-carnitina. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 46, 23-28.
- Heinsbroek, L.T.N. e Krueger, J.G., 1992. Feeding and growth of glass eels, *Anguilla anguilla* L.: the effect of feeding stimulants on feed intake, energy metabolism and growth. *Aquacult. Fish. Manage.* 23, 327-336.
- Heo, K.N., Odle, J., Han, I.K., 2000. Effects of dietary L-carnitine and protein level on plasma L-carnitina, energy and L-carnitina balance, and L-carnitina biosynthesis of 20 kg pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 13, 1568-1575.
- Hidaka, I., Kohbara, J., Araki, T., Morishita, T., Miyajima, T., Shimizu, S., Kuriyama, I., 2000. Identification of feeding stimulants from a jack mackerel muscle extract for young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 181, 115-126.
- Higby, M.; Beulig, A, 1988. Effects of stocking density and food quantity on growth of young snook, *Centropomus undecimalis*, in aquaria. *Florida Scientist*, Tampa, v. 51, n. 3/4, p. 161-171.
- Higuera, M., 2005. Effects of nutritional factors and feed characteristics on feed intake. In: Houlihan, D., Boujard., T., Jobling, M. Eds., *Food intake in fish*. Blackwell Science, 250-268.
- Howell, B.R., 1998. The effect of stocking density on growth and size variation in cultured turbot, *Scophthalmus maximus*, and sole, *Solea solea*. *International Council for the Exploration of the Sea* CM 1998/L:10.
- Howell, B.R. e Yamashita, Y., 2005. Aquaculture and stock enhancement. In: Gibson, R.N. Ed., *Flatfishes Biology and Exploitation*. Blackwell Science Ltd, Oxford, USA. 347-371.
- Hughes, S.G., 1991. Response of first-feeding chinook salmon to four potential chemical modifiers of feed intake. *Prog. Fish-Cult.* 53, 15-17.
- Iglesias, J., Olmedo, M., Otero, J.J., Peleteiro, J.B., Solo´rzano, M.R., 1978. Growth, under laboratory conditions, of turbot, *Scophthalmus maximus*, from the R´ia de Vigo_north-west Spain.. *Mar. Biol.* 96, 11-17.
- Imsland, A.K., Jonassen, T.M., 2001. Regulation of growth in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): aspects of environment \times genotype interactions. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, volume 11, n°1, 71-90.

- Irwin, S., O'Halloran, J., Fitzgerald, R., 1999. Stocking density, growth and growth variations in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178, 77–88.
- Ismiño-Orbe, R.A., Araujo-Lima, C.A.R.M., Gomes, L.C., 2003. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1243-1247.
- Jarayabhand, P., Newkirk, G.F., 1989. Effects of intraspecific competition on growth of the European oyster, *Ostrea edulis* Linnaeus, 1750. *J. Shellfish Res.* 8, 359–365.
- Jayaprakas, V., Sambhu, C., Sunil Kumar, S., 1996. Effect of dietary L-carnitine on growth and reproductive performance of male *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish. Technol.* 33, 84–90.
- Jeon, I., Min, K., Lee, J., Kim, K., Son, M., 1993. Optimal stocking density for olive flounder, *Paralichthys olivaceous*, rearing in tanks. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency Korea* 48, 57–70.
- Ji, H., Bradley, T.M., Tremblay, G.C., 1996. Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed L-carnitine exhibit altered intermediary metabolism and reduce tissue lipid, but no change in growth rate. *Journal of Nutrition* 126, 1937-1950.
- Jobling, M., 1985. Physiological and social constraints on growth of fish with special reference to Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. *Aquaculture* 44, 83–90.
- Jobling, M., Baardvik, B.M., 1994. The influence of environmental manipulations on inter- and intra-individual variation in food acquisition and growth performance of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 44, 1069–1087.
- Johnsen, P.B. e Adams, M.A., 1986. Chemical feeding stimulants for the herbivorous fish, *Tilapia zillii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A, Nº 1, 109-112.
- Jones, A., Brown, A.G., Douglas, M.T., Thompson, S.J., Whitfield, R.J., 1981. Progress towards developing methods for the intensive farming of turbot_ *Scophthalmus maximus* L. in cooling water from a nuclear power station. In: Coche, A.G. Ed., *Proceedings of World Symposium on New Developments in the Utilisation of Heated Effluents and of Recirculation Systems for Intensive Aquaculture*, Vol. 2, Tech. Pap. FAO European Inland Fisheries Commission, No. 39. FAO, Rome, 481- 496.
- Jones, K. A., 1989. The palatability of amino acids and related compounds to rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biolpgy* 34, 149-160.

- Jones, A. e Howell, B. R., 1995. The marine flat fishes. In: World Animal Science, C8. Production of Aquatic Animals: Fishes. Nash, C.E., Novotny, A.J. Eds. Elsevier, Amsterdam. 329-338.
- Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M., 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Aquaculture 110, 191- 204.
- Kaiser, H., Weyl, O., Hecht, T., 1995. The effect of stocking density on growth, survival and agonistic behaviour of African catfish. Aquaculture International 3, 217- 225.
- Kamstra, A., Heinsbroek, L.T.N., 1991. Effects of attractants on start feeding of glass eels, *Anguilla anguilla* L. Aquaculture 22, 47- 56.
- Kaushik, S.J. e Dabrowski, K., 1983. Postprandial metabolic changes in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Reproduction, Nutrition, Development 23, 223-234.
- Keshavanath, P., Renuka, P., 1998. Effect of dietary L-carnitine on growth and body composition of fingerling rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquac. Nutr. 4, 83–87.
- Kikuchi, K., 2000. Present status of research and production of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. Manuscript for Aquaculture America.
- King, N., Howell, W., Fairchild, E., 1998. The effect of stocking density on the growth of juvenile summer flounder *Paralichthys dentatus*. In: Howell, W., Keller, B., Park, P., McVey, J., Takayanagi, K., Uekita, Y. (Eds.), Nutrition and Technical Development Aquaculture. Proceedings of the Twenty-Sixth US–Japan Aquaculture Symposium. Durham, New Hampshire, USA, September 16–18, 1997. Publicado pela University of New Hampshire Sea Grant Program em Novembro de 1998, pp. 173–180.
- Knoph, M. B. & Thorud, K., 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and haematologic parameters. Comparative Biochemistry and Physiology 113A, 375–381.
- Koike, Y., Flassch, J.P., Mazurier, J., 1979. Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata* Linnaeus: II. Influence of food and density on the growth of juveniles. La Mer 17, 43- 52.
- Kubitza, F., 1995. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: Simpósio internacional sobre nutrição de peixes e crustáceos, Campos do Jordão, 1995. Anais. Campos do Jordão: CBNA, 91-115.
- Kubitza, F., Lovshin, L. L., Lovell, R. T., 1997. Identification of feed enhancers for juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. Aquaculture 148, 191- 200.

- Labatut, R., Olivares, J., 2004. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles using shallow raceways tanks and recirculation. *Aquacultural Engineering* 32, 113- 127.
- Lambert, Y., Dutil, J.D., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod *Gadus morhua* L. reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture* 192, 233–247.
- Lazo, J.P., Davis, D.A., Arnold, C.R., 1998. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Aquaculture* 169, 225-232.
- Leung, K. M. Y., Chu, J. C. W., Wu, R. S. S., 1999. Effects of body weight, water temperature and ration size on ammonia excretion by the areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) *Aquaculture* 170, 215-227.
- Li, Y. P., Lovell, R. T., 1985. Elevated Levels of Dietary Ascorbic Acid Increase Immune Responses in Channel Catfish. *Journal of Nutrition* 115, 123-131.
- Liewes, E., 1984. Culture, Feeding and Diseases of Commercial Flatfish Species. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands. 104 pp.
- Link, S.J., Fogarty, M.J., Langton, R.W., 2005. The trophic ecology of flatfishes. In: Gibson, R.N. Eds., *Flatfishes Biology and Exploitation*. Blackwell Science Ltd, Oxford, USA. 185-212.
- Mackie, A.M., e Adron, J.W., 1978. Identification of inosine and inosine-5`-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 60A, 79-83.
- Mackie, A.M., Adron, J.W., Gran, P.T., 1980. Chemical nature of feeding stimulants for the juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Biology* 16,701-708.
- Mackie, A.M., Mitchell, A.I., 1983. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology* 22, 425-430.
- Mallekh, R., Lagardere, J., Begout, M., Lafaye, J., 1998. Variability in appetite of turbot, *Scophthalmus maximus*, under intensive rearing conditions: the role of environmental factors. *Aquaculture* 165, 123–138.
- Marsden, I.D., Williams, P.M.J., 1996. Factors affecting the grazing rate of the New Zealand abalone *Haliotis iris* Martyn. *J. Shellfish Res.* 15, 401–406.
- Martínes-Tapia, C., Fernández-Pato, C.A., 1991. Influence of stock density on turbot *Scophthalmus maximus* L. growth. ICES CM1991rF:20.

- McGoogan, B.B., Gatlin III, D.M., 1997. Effects of replacing fish meal with soybean meal in diets for red drum *Sciaenops ocellatus* and potential for palatability enhancement. J. World Aquacult. Soc. 28, 374–385.
- Menu, B. e Person, J., 1991. “ Fase de Criadero y Engorde ” del Capítulo El cultivo de Peces planos: Lenguado, rodaballo. In: Acuicultura, Gilbert Barnabé (Ed.), Vol. II. Edic. Omega S.A. Barcelona, España. pp: 625-642.
- Merino, G.E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2007. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. Aquaculture 265, 176–186.
- Meteiller, R., Cadena-Roa, M., Ruyet, J.P., 1983. Attractive chemical substances for the weaning of Dover sole, *Solea vulgaris*. Qualitative and quantitative approach. J. World Maricult. Soc. 14, 679–684.
- Minkoff, G., Broadhurst, A.P., 1994. Intensive production of turbot, *Scophthalmus maximus*, fry. In: Lavens, P., Remmerswaal, R.A.M. Eds., Turbot Culture: Problems and Prospects. European Aquaculture Society, Belgium, 14-31.
- Mommsen, T. P., Walsh, P. J., 1992. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes. Experientia 48, 583–593.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 9, 211–268.
- Munroe, T.A., 2005. Systematic diversity of the Pleuronectiformes. In: Gibson, R.N. Eds., Flatfishes Biology and Exploitation. Blackwell Science Ltd, Oxford, USA. 10-41.
- NRC – National Research Council, 1993. Nutrients Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, 36p.
- Ozorio, R.O.A., 2001. Dietary L-carnitine and energy and lipid metabolism in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles. Dissertação PhD 3092. Wageningen University, Hollanda.
- Ozorio, R.O.A., Van Eekeren, T.H.B., Huisman, E.A., Verreth, J.A.J., 2001a. Effects of dietary carnitine and protein energy: nonprotein energy ratios on growth, ammonia excretion and respiratory quotient in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) juveniles. Aquac. Res. 32, 406–414.
- Ozorio, R.O.A., Uktoseja, J.L.A., Huisman, E.A., Verreth, J.A.J., 2001b. Changes in fatty acid concentrations in tissues of African catfish *Clarias gariepinus* Burchell, as a

- consequence of dietary carnitine, fat and lysine supplementation. *Brit. J. Nutr.* 86, 623–636.
- Ozório, R.O.A., Verreth, J.A.J., Aragão, C.R., Vermeulen, C.J., Schrama, J.W., Verstegen, M.W.A., Huisman, E.A., 2003. Dietary carnitine supplements increased lipid metabolism and decreased protein oxidation in African catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles fed high fat levels. *Journal Aqua. Trop.* 18, 225-238.
- Papatryphon, E. e Soares Jr., J.H., 2000a. Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 185, 339–352.
- Papatryphon, E. e Soares Jr., J.H., 2000b. The effect of dietary feeding stimulants on growth performance of striped bass *Morone saxatilis*, fed-a-plant feedstuff-based diet. *Aquaculture* 185, 329–338.
- Papatryphon, E. e Soares Jr., J.H., 2001. Optimizing the levels of feeding stimulants for use in high-fish meal and plant feedstuff-based diets for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture* 202, 279–288.
- Parker, S.P., 1982. Synopsis and classification of living organisms. McGraw-Hill Ed. I and II volume, New York.
- Parsons, G.J., Dadswell, M.J., 1992. Effect of stocking density on growth, production, and survival of the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, held in intermediate suspension culture in Passamaquoddy Bay, New Brunswick. *Aquaculture* 103, 291–309.
- Paspatis, M.; Boujard, T.; Maragoudaki, D.; Blanchard, G; Kentouri, M., 2003. Do stocking density and feed reward level affect growth and feeding of self-fed juvenile European sea bass? *Aquaculture* 216, 103– 113.
- Person-Le Ruyet, J., Menu, B., Cadena-Roa, M., Metailler, R., 1983. Use of expanded pellets supplemented with attractive chemical substances for the weaning of turbot, *Scophthalmus maximus*. *J. World Maricult. Soc.* 14, 676–678.
- Person Le-Ruyet, J., Baudin-Laurencin, F., Devauchelle, N., Metaillier, R., Nicolas, J., Robin, J., Guillaume, J., 1991. Culture of turbot (*Scophthalmus maximus*). In: McVey, J. (Ed.), *CRC Handbook of Mariculture. Finfish Aquaculture*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 21–41.
- Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, 155–171.

- Person-Le Ruyet, J., Boeuf, G., Zambonino Infante, J., Helgason, S. & Le Roux, A., 1998. Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119A, 511–518.
- Person-Le Ruyet, J., Lamers, A., Le Roux, A., Sèvére, A., Boeuf, G., Mater-Gostan, N., 2003. Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *Journal of Fish Biology* 62, 879- 894.
- Rasmussen, R.S., e Korsgaard, B., 1998. Ammonia and urea in plasma of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) in response to external ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 120, 163–168.
- Rebouche, C. J., 1991. Quantitative estimation of absorption and degradation of a carnitine supplement by human adults. *Metabolism-Clinical and Experimental* 40, 1305-1310.
- Rebouche C. J. e Chenard, C.A., 1991. Metabolic – fate of dietary carnitine in humans adults- identification and qualification of urinary and fecal metabolites. *Journal of Nutrition* 121, 539-546.
- Rebouche, C.J. e Seim, M., 1998. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annual Review of Nutrition* 18, 39-61.
- Refstie, T., Kittelsen, A., 1976. Effect of density on growth and survival of artificially reared Atlantic salmon. *Aquaculture* 8, 319–326.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus autata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, 347-359.
- Robaina, L., Corraze. G., Aguirre, P., Blanc, D., Melcion, P., Kaushik, S., 1999. Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass *Dicentrarchus labrax* fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture* 179, 45–56.
- Rodehutsord, M., 1995. Effects of supplemental dietary L-carnitine on the growth and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high-fat diets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 73, 276– 279.
- Santulli, A., D’Amelio, V., 1986a. The effects of carnitine on the growth of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. fry. *J. Fish Biol.* 28, 81– 86.
- Santulli, A., D’Amelio, V., 1986b. Effects of supplemental dietary carnitine on the growth and lipid metabolism of hatcheryreared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 59, 177-186.

- Santulli, A., Puccia, E., D'Amelio, V., 1990. Preliminary study on the effect of short-term carnitine treatment on nucleic acids and protein metabolism in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fry. *Aquaculture* 87, 85– 89.
- Sargent, J.R. e Tacon, A.G.J., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 377-383.
- SAS, 1999. SAS institute Inc., SAS OnlineDoc, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schlechtriem, C., Bresler, V., Fishelson, L., Rosenfeld, M., Becker, K., 2004. Protective effects of dietary L-carnitine on tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) reared under intensive pond-culture conditions. *Aquac. Nutr.* 10, 55– 63.
- Selock, D., 2001. *Aquaculture in the World: An Introduction to the Industry*. Rural Enterprise and Alternative development Iniciantive report. Report N°5.
- Silva, A., Velez, A., 1998. Development and challenges of turbot and flounder aquaculture in Chile. *World Aquaculture* 48–58.
- Souza-Filho, J.J. e Cerqueira, V.R., 2003. Influência da densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 38, n. 11, 1317-1322.
- Takii, K., Shimeno, S., Takeda, M, Kamekawa, S., 1986. The effect of feeding stimulant in diet on digestive enzyme activities of eel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52, 1449-1454.
- Toften, H., Jobling, M., 1997. Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid. *Aquacult. Nutr.* 3, 145-151.
- Toften, H., Arnesen, A.M., Jobling, M., 2003. Feed intake, growth and ionoregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in relation to dietary addition of a feeding stimulant and time of seawater transfer. *Aquaculture* 217, 647-662.
- Tomasso, J. R., Davis, K. B. & Simco, B. A., 1981. Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to ammonia and nitrite. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38, 1106–1112.
- Torreele, E., Van Der Sluiszen, A., Verreth, J., 1993. The effect of dietary L-carnitine on the growth performance in fingerlings of the African catfish (*Clarias gariepinus*) in relation to dietary lipid. *Br. J. Nutr.* 69, 289– 299.
- Twibell, R.G. e Brown, P.B., 2000. Effects of dietary carnitine on growth rates and body composition of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* male x *M. chrysops* female). *Aquaculture*, 187, 153-161.

- Urbinati, E.C.; Baccarin, A.E. & Pezzato, L.E., 2000. Efeito da alimentação com levedura desidratada de álcool na glicemia e nos níveis de glicogênio e lipídeos totais hepáticos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Boletim do Instituto de Pesca 26, 163-167.
- Xue, M. e Cui, Y., 2001. Effect of several feeding stimulants on diet preference by juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), fed diets with or without partial replacement of fish meal by meat and bone meal. Aquaculture 198. 281-292.
- Wang, Y. & Walsh, P. J. (2000). High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). Aquatic Toxicology 50, 205–219.
- Webb Jr, K. A. e Gatlin III, D.M., 2003. Effects of dietary protein level and form on production characteristics and ammonia excretion of red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture 225, 17–26.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. Physiological Reviews 77, 591–625.
- Westers, H., 2001. Production. In: Wedemeyer, G. A. (Ed.). Fish hatchery management. 2nd ed. Bethesda: American Fisheries Society, p. 31-90.
- Wood, C. M. (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In The Physiology of Fishes (Evans, D. H., ed.), pp. 379–425. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Wilson, R.P., 2002. Amino acids and proteins. In: Halver, J.E., e Hardy, R.W. Eds., Fish Nutrition, (3ª ed.) Academic Press, San Diego, CA, pp. 143– 179.
- Yamashita, S., Yamada, T., Hara, T.J., 2006. Gustatory responses to feeding- and non-feeding-stimulant chemicals, with an emphasis on amino acids, in rainbow trout. Journal of Fish Biology 68, 783-800.

9. ANEXOS

Anexo I - Determinação da Percentagem de Matéria Seca

Aparelhos:

Excicador

Estufa

Balança

Material:

Cadinhos de porcelana/formas de alumínio

Número de amostras analisadas:

10-15 amostras por dia (com duplicados)

Procedimento:

1. Após a identificação dos cadinhos/formas de alumínio, secá-los previamente na estufa durante 24 hora a 105°C;
2. Pese os cadinhos/formas de alumínio e registre os seus pesos;
3. Tare os cadinhos/formas de alumínio e pese 1g de amostra (mínimo);
4. De seguida, coloque os cadinhos/formas de alumínio com a amostra a secar na estufa a 105°C durante 24h;
5. Após 24 horas na estufa, coloque os cadinhos/formas de alumínio no excicador durante cerca de 30 min;
6. Pese os cadinhos/formas de alumínio com amostra e registre os pesos;
7. Efectue os cálculos:

$$\% \text{ MS} = \frac{\left[\begin{array}{c} \text{Cadinho + amostra} \\ \text{(após 105°C)} \end{array} \right] - \left[\text{Cadinho} \right]}{\text{Amostra}}$$

Anexo II - Determinação das Cinzas

Aparelhos:

Excicador

Mufla

Balança

Material:

Cadinhos de porcelana/formas de alumínio

Número de amostras analisadas:

10 amostras por dia (com duplicados)

Procedimento:

1. Após a identificação dos cadinhos/formas de alumínio, secá-los previamente na mufla durante 5 horas a 500°C;
2. Pese os cadinhos/formas de alumínio e registre os seus pesos;
3. Tare os cadinhos/formas de alumínio e pese 1g de amostra (mínimo);
4. De seguida, coloque os cadinhos/formas de alumínio com a amostra a secar na mufla a 500°C durante 5h;
5. Após 24 horas na mufla, coloque os cadinhos/formas de alumínio no excicador durante cerca de 30 min;
6. Pese os cadinhos/formas de alumínio com amostra e registre os pesos;
7. Efectue os cálculos:

$$\% \text{ MS} = \frac{\left[\text{Cadinho + amostra} \right] - \left[\text{Cadinho} \right]}{\text{Amostra}}$$

(após 500°C)

Anexo III - Determinação da Gordura Bruta

Aparelhos:

Soxtherm Multistat / SX PC (Gerhardt Fabrik und Lager Chemischer, Königswinter, Germany)

Material:

Balança analítica

Papel vegetal

Copos de extracção e suporte

Cartuchos de filtro

Estufa

Reagentes:

Éter de petróleo (40-60°C)

Algodão hidrófilo

Quantidade e número de amostra:

4 amostras por dia (com duplicados)

1 - 1,5g amostra liofilizada (0.5-1g fezes liofilizadas)

Reagentes gastos por cada 10 amostras analisadas em duplicado:

Éter de petróleo – 2 litros

Procedimento:

1. Colocar os copos de extracção na estufa a 150°C durante cerca de 4 horas.
2. Arrefecer no excicador e pesar.
3. Ligar o aparelho e a água, e esperar até atingir a temperatura de 150°C.
4. Pesar cerca de 5 g de amostra para os cartuchos de filtro, colocando por cima o algodão hidrófilo.
5. Adicionar o éter de petróleo aos copos de extracção.
6. Colocar os cartuchos devidamente dentro dos copos e estes no aparelho.
7. No final da extracção, retirar os copos e os cartuchos.
8. Retirar o éter recuperado.

9. Colocar os copos de extracção na estufa a 105°C, e deixar secar durante a noite.
10. Arrefecer no excicador e pesar.

Programação:

Programa gordura bruta:

- 4.0 minutos Reduction interval;
- 3 segundos Reduction pulse;
- 40 minutos Hot Extraction /Boiling (1/2 da extracção);
- 5 x Evaporation A;
- 1h 20m Rising time;
- 3 x Evaporation B;
- 10 minutos Evaporation C.

Cálculos:

$$\text{Teor em GB (\%MS)} = \frac{(\text{Peso do copo} + \text{gordura}) - \text{peso do copo} \times 100}{\text{Toma} \times \% \text{ MS}}$$

Anexo IV - Determinação da Proteína Bruta - Sistema micro

Aparelhos:

Digestor (Kjeldatherm Block digestion units, Gerhardt Fabrik und Lager, Königswinte,. Germany chemischer)

Destilador (Vapodest 40, Gerhardt Fabrik und Lager chemischer, Königswinter, Germany)

Titulador (HI 901/HI 902, Hanna Instruments, Rhode Island, USA)

Material:

Balança analítica

Papel vegetal

Bureta

Erlenmeyers de 250ml

Tubos de 100ml

Quantidade e número de amostra:

12 amostras por dia (com duplicados)

200 mg amostra liofilizada

Reagentes gastos por cada 10 amostras analisadas em duplicado:

Pastilhas Kjeldahl - 20 pastilhas

Ácido bórico - 50 g

NaOH - 500 g

Ácido sulfúrico concentrado - 100 ml

Ácido sulfúrico 0.1N, dependente do tipo de amostra: dietas e composição corporal \pm até 250ml; fezes \pm 120ml

Reagentes:

1. Solução de NaOH a 40%:

Dissolver 40g de NaOH (puro p.a.) em 100ml de água destilada/400g em 1000ml. A solução deve ser preparada sobre gelo, adicionando a água destilada posteriormente ao NaOH.

2. Pastilhas Panreac (0.3% Cu + 99.7% Sulfato de potássio) 5g a unidade
3. Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)
4. Ácido sulfúrico 0.1N (H₂SO₄)
5. Solução de Ácido bórico (H₃BO₃) a 4%:
 - Sobre um agitador, dissolver 80g de ácido bórico em 1L de água a ferver (para 2L solução).
 - Arrefecer, agitando de vez em quando para evitar cristalização. Adicionar à solução 20 ml de solução de verde de bromocresol e 14 ml de solução de vermelho de metilo (2L).
 - Completar o volume com água destilada até perfazer os 2L e agitar cuidadosamente.
6. Solução de verde de bromocresol:
 - Dissolver 100mg de verde de bromocresol em etanol absoluto para análise. Completar para 100ml com etanol absoluto. Se necessário filtrar com papel de filtro.
7. Solução de vermelho de metilo:
 - Dissolver 100mg de vermelho de metilo em etanol absoluto para análise. Completar para 100ml com etanol absoluto. Filtrar a solução.

Procedimento:

1. Digestão

Tem como finalidade a conversão de todo o azoto ou proteína da amostra em sulfato de amónia (NH₄)₂SO₄.

- Pesar 0.2g de amostra para tubos Kjeldahl de 100ml.
- Adicionar 1 pastilha de selénio.
- Adicionar 5ml de ácido sulfúrico concentrado p.a..
- Agitar os tubos no vortex.
- Fazer 2 brancos.
- Ligar o digestor a 420°C. Ligar a água e a exaustão.

A água deve ter um fluxo elevado de modo a eliminar a humidade e consequentemente melhorar o processo de mineralização. De seguida, diminuir a exaustão para evitar perdas de ácido, mas continuar a eliminar fumos produzidos (CO₂, H₂O e subprodutos).

- Deixar mineralizar durante uma hora.
- Deixar arrefecer os tubos.

2. Destilação:

Converte a NH_4^+ em NH_3 na presença de uma base (NaOH). O destilado é recolhido num erlenmeyer com ácido bórico, que se torna azul devido à presença de uma base. O destilador doseia 20ml de soda, 30ml de ácido bórico, 10ml de água destilada. O tempo de reacção é de 5 segundos e a destilação tem uma duração de cerca de 5 minutos.

- Ligar o destilador e abrir a torneira da água.
- Lavar o aparelho 2 vezes, fazendo uma destilação com adição unicamente de água e uma outra com adição normal dos reagentes.
- Destilar a amostra.

3. Titulação:

- Titular com ácido sulfúrico a 0.1N e a pH 4.60.

Cálculos:

$$\text{Teor em PB (\% MS)} = \frac{\text{Volume do ácido gasto} \times \text{Normalidade do ácido} - \text{Branco} \times 14 \times 6.25}{\text{Toma} \times \% \text{ MS}}$$

Anexo V - Determinação da Energia Bruta

A energia libertada na combustão de 1g de material é seu poder calórico. É possível medir calorimetricamente o poder calórico de qualquer alimento ou combustível através de uma bomba calorimétrica adiabática.

Calorimetria

Um dispositivo bastante comum para medir a variação da energia interna (ΔU) é a bomba calorimétrica (fig. 1). A amostra da substância é colocada num pequeno cadinho no interior da bomba calorimétrica. Essa câmara de combustão de aço inox, capaz de resistir a grandes pressões, tem válvula para a admissão de oxigénio e também contactos eléctricos para provocar a inflamação da amostra.

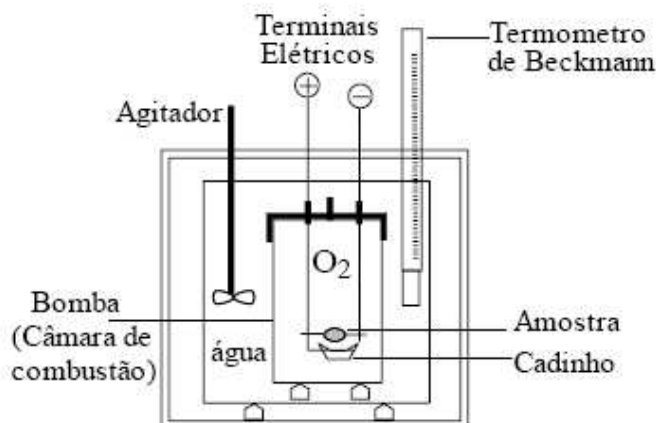


Fig.1- Representação de um calorímetro

Depois da amostra ser instalada, a bomba é hermeticamente fechada e recebe carga de oxigénio sob pressão de aproximadamente 25 kgf/cm². A bomba calorimétrica é então imersa no calorímetro, (vaso que apresenta excelente isolamento térmico) que contém massa de água conhecida, sob agitação. O sistema trabalha em condições adiabáticas, não havendo perda nem ganho de calor do calorímetro para as vizinhanças. Quando todos os componentes dentro do calorímetro atingem uma temperatura uniforme e constante, provoca-se, mediante uma corrente eléctrica que passa por um fio condutor que fica em contacto com a amostra, a inflamação dessa.

Há libertação de calor na combustão. Este calor é absorvido pelo conteúdo do calorímetro e causa a elevação da temperatura da água. Essa temperatura é cuidadosamente medida, com um termómetro de precisão de Beckmann, antes da reacção e depois de a reacção terminar, quando a temperatura no interior do calorímetro é novamente constante. A variação de temperatura ΔT , observada no calorímetro é proporcional ao calor que a reacção liberta ou absorve e, depende da capacidade calorífica do calorímetro. Assim, pela medição directa de ΔT , pode-se determinar a quantidade de energia da amostra. Para se calibrar o equipamento usa-se o ácido benzóico, cujo ΔU é conhecido com precisão. é um exemplo de substância utilizada com padrão de calibração. (Uma capacidade calorífica elevada significa que para uma determinada quantidade de calor fluindo para o sistema provocará uma pequena elevação da temperatura.)