



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Qualidade nutricional do perfil lipídico da carne de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) utilizada em consumo humano

Mestrando: Hugo Jorge Rodrigues Eliseu Ventura

Orientador: Professora Doutora Maria João Marinho
Lança Silva de Almeida

Co-orientador: Mestre Maria da Graça Janeiro
Machado

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

Qualidade nutricional do perfil lipídico da carne de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) utilizada em consumo humano

Mestrando: Hugo Jorge Rodrigues Eliseu Ventura

Orientador: Professora Doutora Maria João Marinho
Lança Silva de Almeida

Co-orientador: Mestre Maria da Graça Janeiro
Machado

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2014

Para os meus pais e avós

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria João Marinho Lança Silva de Almeida, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, por me ter aceitado como orientando, pela liderança, disponibilidade, determinação e enorme dedicação, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

À Engenheira Maria da Graça Janeiro Machado, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora por ter aceitado ser minha co-orientadora e me ter acompanhado e auxiliado durante toda a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida do Departamento de Biologia da Universidade de Évora por todo o apoio logístico facultado no âmbito dos projetos que coordena.

À Professora Doutora Maria João Cabrita e também à Doutora Raquel Garcia, do Departamento de Fitotecnia e do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas da Universidade de Évora, pela disponibilidade das instalações e dos equipamentos inerentes ao Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo).

Ao Professor Doutor Marco Gomes da Silva do REQIMTE, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela análise das amostras através do método de Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (GC/MS).

À sempre atenciosa Margarida Romão do Laboratório de Nutrição e Metabolismo da Universidade de Évora, pela assistência dedicada, pela partilha, pela amizade e sobretudo pela boa disposição, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Enologia da Universidade de Évora, que me integraram no ambiente de trabalho e auxiliaram na logística das atividades laboratoriais. Concretamente à Engenheira Antónia Oliveira, Rui Bicho, Albina Mendes, e Nuno Martins.

À prestativa e sorridente Felicidade Silva, funcionária da diretoria do Colégio da Mitra, pela prontidão na prestação dos seus serviços que em tanto facilitaram o meu trabalho e pela boa disposição contagiante que me alegrava os dias.

À Maria Machado pela ajuda na dissecação dos animais, na determinação dos ácidos gordos e pelo esclarecimento nas questões bioquímicas.

À Susana Raposo de Almeida, aluna da Licenciatura em Audiovisual e Multimédia da Escola Superior de Comunicação Social, pela elaboração das ilustrações desta dissertação.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado em Engenharia Zootécnica: Mafalda Brito, Margarida Santos, Ricardo Boinho e Teresa Eusébio, que me auxiliaram nos trabalhos de laboratório.

Aos meus amigos João Amaro, Gonçalo Oliveira, Miguel Gomes e Ricardo Lourenço, que apesar de não terem contactado diretamente com a realização deste trabalho, contribuíram indiscutivelmente para aquilo que sou hoje.

Ao João Fragoso e à Ana Bota, pela amizade, boa disposição e por serem dois excelentes exemplos de determinação e sucesso.

Às pessoas que estiveram comigo desde sempre e que me “construíram” como pessoa: aos meus pais, aos meus avós e ao meu tio. Todos eles me serviram e servem como exemplo para a vida.

Por fim, agradeço à Mafalda pela paciência que este trabalho e todo o Mestrado exigiram, pela cumplicidade, motivação, e por todos os projetos futuros que temos em comum.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do Projecto Estratégico PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Resumo

Existindo uma forte tradição no nosso país de consumo de lampreia-marinha em muitas populações ribeirinhas, o objetivo geral deste estudo consistiu em determinar a qualidade nutricional do perfil lipídico da carne de lampreia-marinha de forma a avaliar se o seu consumo poderia ser considerado uma prática saudável na dieta dos portugueses.

Foram capturados 30 animais durante o início da época de migração reprodutora, provenientes das bacias hidrográficas dos rios Guadiana e Mondego, para efeitos de caracterização química e nutricional do músculo.

Os resultados obtidos sugerem que a carne de lampreia-marinha apresenta qualidade nutricional em termos de perfil lipídico. Todavia, o consumo desta espécie pode revelar-se uma prática menos saudável para os apreciadores, na medida em que estes consomem lampreia-marinha com uma frequência elevada durante os dois a três meses em que é permitida a sua captura em território nacional.

Palavras-chave: *Petromyzon marinus*, EPA, DHA, colesterol, qualidade nutricional, VDR (Valor Diário de Referência).

Title: Nutritional quality of the lipid profile of sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) meat used for human consumption

Abstract

There is a strong tradition in our country for the consumption of sea lamprey in many riverside populations. The aim of this study was to determine the nutritional quality of the lipid profile of sea lamprey meat, in order to determine if its consumption could be considered a healthy practice in the Portuguese diet. For the chemical and nutritional characterization of sea lamprey muscle, 30 animals were captured during early spawning migration season from Guadiana and Mondego river basins. The results suggest that the meat of sea lamprey presents a good nutritional quality in terms of lipid profile. However, the use of this species for consumption may represent a less healthy practice in the health of the consumers, insofar as the frequency of consumption during the two to three months period in which the captures were allowed in Portugal is very high.

Keywords: *Petromyzon marinus*, EPA, DHA, cholesterol, nutritional value, DRI (Daily Reference Intake).

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de abreviaturas	vii
Índice de tabelas	viii
Índice de figuras	ix
1. Introdução	1
1.1. Importância nutricional dos lípidos provenientes do pescado e afins na nutrição humana	1
1.2. Objetivo geral	5
1.3. Objetivos específicos.....	6
2. Revisão bibliográfica	9
2.1. Classificação dos lípidos	9
2.2. O caso particular dos ácidos gordos.....	11
2.2.1. Nomenclatura.....	12
2.2.2. Tipos de ácidos gordos	15
2.2.3. Ácidos gordos essenciais	18
2.3. Colesterol	21
2.4. Os lípidos nos peixes	23
2.4.1. Peixes gordos versus peixes magros	26
2.4.2. Peixes marinhos versus peixes dulçaquícolas	27
2.5. O caso particular da lampreia-marinha.....	29
2.5.1. Caracterização geral	29
2.5.1.1. Filogenia e taxonomia	29
2.5.1.2. Ciclo de vida da lampreia-marinha.....	31
2.5.1.3. Características morfológicas da lampreia-marinha	33
2.5.2. Distribuição geográfica da lampreia-marinha.....	34
2.6. Caracterização geral das bacias hidrográficas dos rios Mondego e Guadiana	36
3. Metodologia	39

3.1. Estratégia e captura	39
3.2. Recolha de dados biométricos, tecido muscular e determinação do género.....	40
3.3. Organigrama.....	42
3.4. Procedimento experimental	43
3.4.1. Determinação do teor de humidade.....	43
3.4.2. Determinação do teor em cinza	44
3.4.3. Determinação do grau de oxidação lipídica	44
3.4.4. Determinação do teor de energia bruta	45
3.4.5. Determinação dos lípidos totais e análise da composição em ácidos gordos	46
3.4.6. Determinação do teor de colesterol total.....	53
3.5. Determinação dos parâmetros nutricionais.....	55
3.5.1. Índice polinsaturados/saturados.....	55
3.5.2. Índice $\omega 3/\omega 6$	55
3.5.3. Índice de trombogenicidade	55
3.5.4. Índice de aterogenicidade	56
3.5.5. Índice hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos	56
3.6. Análise estatística de dados	57
4. Resultados e discussão.....	58
4.1. Parâmetros biométricos.....	58
4.2. Composição química do músculo de lampreia-marinha.....	61
4.2.1. Perfil de ácidos gordos do músculo	66
4.3. Composição nutricional da parte edível	70
4.3.1. Caracterização nutricional do perfil lipídico.....	74
4.3.2. Qualidade nutricional do perfil lipídico.....	78
5. Conclusão	80
6. Referências.....	82
Anexo	101
Anexo. Lista de equipamento com respetiva marca e modelo.....	102

Lista de abreviaturas

LA	Linoleic acid – Ácido linoleico
ALA	Alfa Linolenic acid – Ácido alfa-linolénico
AA	Arachidonic acid – Ácido Araquidónico
BHT	Butylated hydroxytoluene – Hidroxitolueno butilado
DHA	Docosahexaenoic acid – Ácido docosahexaenóico
EFA	Essential fatty acids – Ácidos gordos essenciais
EPA	Eicosapentaenoic acid – Ácido eicosapentaenóico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
GC/MS	Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa
HDL	High-density lipoprotein – Lipoproteínas de elevada densidade
h/H	Hipocolesterolémico/hipercolesterolémico
HUFA	Highly unsaturated fatty acids – Ácidos gordos altamente insaturados
IA	Índice de aterogenicidade
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IT	Índice de trombogenicidade
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry – União Internacional de Química Pura e Aplicada
LDL	Low-density lipoprotein – Lipoproteínas de baixa densidade
MUFA	Monounsaturated fatty acids – Ácidos gordos monoinsaturados
PUFA	Poliunsaturated fatty acids – Ácidos gordos polinsaturados
SFA	Saturated fatty acids – Ácidos gordos saturados
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBAi	Índice de Ácido tiobarbitúrico
ω 3	Ácidos gordos polinsaturados da família ω 3
ω 6	Ácidos gordos polinsaturados da família ω 6
ω 9	Ácidos gordos polinsaturados da família ω 9

Índice de tabelas

Tabela 1. Representação dos três tipos de ácidos gordos.....	16
Tabela 2. Parâmetros programados no ASE para a extração dos lípidos totais	47
Tabela 3. Parâmetros programados no GC	49
Tabela 4. Parâmetros programados no GC/MS	53
Tabela 5. Parâmetros biométricos da lampreia-marinha das bacias hidrográficas do rio Guadiana e do rio Mondego:.....	58
Tabela 6. Composição química por 100g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.	61
Tabela 7. Composição química por 100g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Mondego.....	62
Tabela 8. Perfil em ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) do músculo de lampreia-marinha das bacias hidrográficas dos rios Guadiana e Mondego.....	66
Tabela 9. Composição nutricional aproximada da parte edível de lampreia-marinha e de algumas espécies de peixes gordos e semi-gordos, descritas na “Tabela da Composição de Alimentos” do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, 2006).....	71
Tabela 10. Teor de colesterol por parte edível de lampreia-marinha e de algumas espécies de peixes vulgarmente consumidos em Portugal (INSA, 2006).	73
Tabela 11. Índices nutricionais associados aos lípidos da parte edível da lampreia-marinha: Razão entre ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos saturados, Razão entre as famílias de ácidos gordos ω 3 e ω 6, Índice de Trombogenicidade, Índice de Aterogenicidade e Índice hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos.....	74
Tabela 12. Percentagem do VDR (valor diário de referência) de energia, lípidos, colesterol e EPA+DHA por 100g de parte edível de lampreia-marinha (média \pm desvio padrão).	78

Índice de figuras

Figura 1 - Representação <i>Van der Waals</i> de um Triacilglicerol	10
Figura 2 - Representação de um Fosfolípido.....	11
Figura 3 - Nomenclatura internacional do ácido oleico.....	13
Figura 4 - Nomenclatura internacional do ácido gordo eicosapentaenóico.....	14
Figura 5 - Representação do ácido linoleico,	14
Figura 6 - Exemplo de um ácido gordo monoinsaturado (ácido oleico)	17
Figura 7 - Famílias de ácidos gordos essenciais (“Essential fatty acids” - EFA).....	19
Figura 8 - Ilustração da lampreia-marinha (<i>Petromyzon marinus</i> , Linnaeus. 1758)	30
Figura 9 – Esquema do ciclo biológico da lampreia-marinha	31
Figura 10 - Distribuição geográfica da lampreia-marinha a nível mundial	35
Figura 11 – Habitat disponível para as populações de lampreia-marinha nos rios Portugueses.....	36
Figura 12 – Localização da bacia hidrográfica do rio Mondego.....	37
Figura 13 - Localização da bacia hidrográfica do rio Guadiana.....	38
Figura 14 - “Accelerated Solvent Extractor”	48
Figura 15 - Cromatógrafo de fase gasosa.....	49
Figura 16 - Cromatograma dos ácidos gordos do padrão externo “FAME MIX 37”	50
Figura 17 - Relação entre o comprimento e o peso dos animais do rio Guadiana	59
Figura 18 - Relação entre o comprimento e o peso dos animais do rio Mondego.....	59
Figura 19 - Correlação negativa e significativa entre o teor de lípidos totais e o teor de humidade do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.....	63
Figura 20 - Composição química média em g/100g de matéria seca de músculo dos animais das duas bacias hidrográficas em estudo.	64
Figura 21 - Correlação positiva e significativa entre o teor de lípidos totais e o teor de energia bruta do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.....	65
Figura 22 - Correlação negativa e significativa entre o teor de colesterol e o teor de lípidos totais do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.....	65
Figura 23 - Percentagens dos somatórios dos principais ácidos gordos presentes no músculo (M.S.) das lampreias das duas bacias hidrográficas em estudo.	69

1. Introdução

1.1. Importância nutricional dos lipídios provenientes do pescado e afins na nutrição humana

Atualmente sabe-se que a interação entre a genética de um indivíduo e o meio ambiente, são fundamentais para a determinação quer de um estado saudável quer de doença (Simopoulos, 2008). Nas últimas décadas, mediante o avanço das técnicas de biologia molecular, é possível afirmar-se que os fatores genéticos determinam a suscetibilidade às doenças e, os fatores do meio determinam quais os indivíduos geneticamente suscetíveis que virão a ser afetados (Simopoulos & Childs, 1990; Simopoulos & Nestel, 1997; Simopoulos & Robinson, 1999; Simopoulos & Pavlou, 2001; Simopoulos, 2002a; Simopoulos & Ordovas, 2004).

O Homem vive atualmente num ambiente que em termos de nutrição difere substancialmente daquele para o qual a sua constituição genética estava inicialmente selecionada. Na realidade, diversos estudos referentes a aspetos relacionados com a evolução da dieta do Homem têm demonstrado que estas têm vindo a ser alteradas de forma muito significativa, quer no teor de ácidos gordos essenciais presentes, quer no teor de compostos de carácter antioxidante dos alimentos (Eaton & Konner, 1985; Simopoulos, 1991; Simopoulos, 1999a,b,c).

Nas sociedades industrializadas, a dieta, em termos lipídicos, é cada vez mais caracterizada por: i) aumento de energia a consumir; ii) aumento do teor de lipídios saturados; iii) aumento do teor de ácidos gordos da família ómega-6 ($\omega 6$); iv) aumento do teor de ácidos gordos trans e v) diminuição do teor de ácidos gordos da família ómega-3 ($\omega 3$). A este perfil junta-se uma crescente substituição dos hidratos de carbono complexos e da fibra por sementes de cereais e ainda uma diminuição do consumo de fruta, vegetais e proteína animal (Simopoulos, 2008).

Desta forma, pode dizer-se que nos últimos 150 anos, as alterações na dieta do Homem, em conjunto com o tipo de vida cada vez mais sedentário, têm conduzido a numerosas doenças crónicas com destaque para a aterosclerose, hipertensão, obesidade, diabetes tipo 2, diversas doenças autoimunes e numerosos tipos de cancro (Simopoulos, 2008).

Artemis Simopoulos foi a grande inspiradora que levou os nutricionistas a olharem para a nutrição humana sobre um novo ponto de vista, aquele em que o padrão genético do *Homo sapiens* evoluiu a partir de uma dieta equilibrada em termos de ácidos gordos essenciais, ou seja, a partir de uma razão $\omega 3/\omega 6$ similar a 1. Mais tarde, o *Conceito Columbus* emergiu, no qual é hipotetizado que a maioria das doenças degenerativas crónicas, que causam mais de 85% das mortes em todo o mundo, resultam de um processo inflamatório não controlado derivado de eicosanóides a nível dos tecidos (De Meester, 2013).

O interesse pelos ácidos gordos presentes nas dietas, sobretudo os da família $\omega 3$, tem crescido de forma constante desde que na década de 70 do século passado se observou que as populações de Esquimós da Gronelândia apresentavam uma reduzida incidência de doenças cardiovasculares mas praticavam uma dieta rica em lípidos (Dyerberg *et al.*, 1975). Atualmente os ácidos gordos, especialmente os da família $\omega 3$, são quase universalmente reconhecidos como tendo efeitos benéficos numa variedade de patologias humanas, como sejam as doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e doenças neurológicas (Tocher, 2009).

O consumo de produtos da pesca e aquicultura contribui com inúmeros benefícios nutricionais que contrariam as dietas dos países mais industrializados (Oehlenschläger, 1997; Kołakowska *et al.*, 2003; Afonso, 2009). De facto, o pescado e derivados representam uma fonte importante de nutrientes, para além dos ácidos gordos ómega, para uma dieta saudável. Salvo raras exceções, a maioria do pescado é pobre em ácidos gordos saturados, colesterol e hidratos de carbono, sendo rico em proteína, micronutrientes, vitaminas, minerais e especialmente rico em ácidos gordos da família $\omega 3$ (Afonso, 2009). Desta forma, mesmo quando ingerido em pequenas quantidades, exerce um efeito nutricional importante ao fornecer aminoácidos essenciais, ácidos

gordos essenciais e micronutrientes que não se encontram nas dietas cuja base são produtos de origem vegetal.

Os recursos marinhos assumiram, desde sempre, um papel de extrema importância como fonte de alimentação para o Homem, sobretudo em países com larga extensão costeira. Para muitas populações ribeirinhas, o pescado constitui a principal fonte de proteína. Por sua vez, o sector da pesca gera postos de trabalho dos quais dependem, em grande parte, estas populações (Tidwell & Allan, 2001).

De acordo com estatísticas da *Food and Agriculture Organization* (FAO), o consumo de pescado fornece em média 33 Kcal *per capita* por dia, com especial destaque para os países em que o consumo de pescado e derivados é uma tradição e se encontra desenvolvido como seja o caso da Islândia e Japão. Portugal é o País da União Europeia com o consumo *per capita* de pescado mais elevado, cerca de 57 kg/ano (FAO, 2007), consumo este que o coloca em 3º lugar a nível mundial, depois do Japão e da Islândia (DGPA, 2007). Todavia, o consumo de pescado deve aumentar fortemente na próxima década, estimando-se que atinja os 20,6 Kg *per capita* em 2022, face aos 19 Kg registados em média no período 2010-2012, preveem a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) e a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura).

Enquanto subsistema da pesca, a pesca artesanal enquadra-se num ambiente económico, legal e administrativo particular, interagindo com outros subsistemas, como a pesca industrial, agricultura ou o turismo. A pesca artesanal pode ser caracterizada pela forma tradicional como se organiza, como por exemplo, com embarcações de pequena dimensão, com utilização de grande diversidade de artes de pesca e com sistemas remuneratórios que se baseiam no rendimento da pesca (Souto, 2003).

Em Portugal, a exploração comercial da lampreia-marinha envolve atividades com grande impacto social, cultural e económico, apesar de ter um carácter sazonal (Duarte *et al.*, 2003; Suissas, 2010).

No nosso país as lampreias são capturadas por pescadores locais durante a sua migração reprodutiva, sobretudo nos estuários e nos cursos inferiores dos rios. No entanto, também são capturadas furtivamente nos seus ninhos em canais mais a montante (Andrade *et al.*, 2007; Suissas, 2010; Pedro *et al.*, 2014). Os pescadores recorrem a aparelhos de pesca tradicionais da lampreia-marinha, tais como o Botirão, a rede de Tresmalho e o Letrache (Afonso-Dias *et al.*, 2001; Correia & Fonseca, 2009). Para estas comunidades piscatórias, a pesca da lampreia-marinha revela-se de elevada importância económica, pois é de onde advém uma porção substancial do seu rendimento anual, para além de fazer parte da dieta dos seus agregados familiares (Suissas, 2010). O valor de um único espécime pode variar entre 15 e 40€ (25€ é o valor mais frequente) consoante a abundância relativa de lampreias em cada bacia e em cada ano, ou o momento da captura ao longo da temporada de pesca (Pedro *et al.*, 2014).

Como a lampreia-marinha é bastante apreciada na gastronomia Portuguesa, foram criadas confrarias com o objetivo de defender, promover e divulgar este património gastronómico tradicional português. Concretamente na região do Mondego surgiu em 2003 a Confraria da Lampreia de Penacova com os objetivos referidos anteriormente, com especial ênfase para a gastronomia do concelho de Penacova (Correia & Fonseca, 2009). Com o intuito de promover os produtos regionais, existem diversos festivais gastronómicos de norte a sul do país, alguns dos quais centrados na lampreia-marinha, tendo como exemplo o “Festival do Arroz e da Lampreia de Montemor-o-Velho”, o “Festival da Lampreia e do Sável” (Figueira da Foz), o “Festival da Lampreia de Penacova” e o “Festival do Peixe do Rio” (Mértola).

Durante estes eventos deslocam-se pessoas de todo o país até estas regiões para consumirem a lampreia confecionada segundo as receitas e os conhecimentos culinários característicos de cada região. Esta procura pelo ciclóstomo representa um aumento das receitas no sector da restauração, uma vez que existem inúmeros restaurantes aderentes aos festivais, que comercializam a lampreia a um preço que pode variar entre os 30 e os 80€ (Suissas, 2010). No Sul do país destaca-se a região de Mértola que é popularmente denominada como “a terra das lampreias”, chegando a

afirmar-se como a “capital da lampreia”. Na região centro de Portugal destaca-se a região de Penacova por todos os esforços que tem vindo a desenvolver na proteção e promoção do seu património gastronómico e por ser considerada desde 1998 como a “Capital Universal da Lampreia”.

Em pleno século XXI continua a existir o paradoxo de se gastar recursos financeiros avultados em tratamentos de distúrbios relacionados com alimentação, situação que poderia ser facilmente evitada se houvesse uma política de recomendação/prevenção forte em termos de hábitos alimentares (Lands, 2013). Sabe-se que as doenças cardíacas, mentais e metabólicas resultam, em parte, de deficiência/desequilíbrios alimentares em ácidos gordos altamente insaturados da família $\omega 3$; é reconhecido que as concentrações de eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) a nível dos tecidos animais são um dos pontos-chave para o estudo e compreensão de numerosas doenças (De Meester, 2013) e as Comissões de Saúde e Bem Estar recomendam o consumo de dietas com maiores teores de ácidos gordos $\omega 3$ e maior equilíbrio na razão $\omega 3/\omega 6$, logo, torna-se urgente incentivar o consumo de pescado junto das populações, principalmente o de origem marinha devido à sua riqueza em ácidos gordos $\omega 3$ (Lands, 2013).

1.2. Objetivo geral

Tendo em consideração esta temática e, havendo uma forte tradição no nosso país de consumo acentuado de lampreia-marinha em muitas populações ribeirinhas (Suissas, 2010), o objetivo geral deste estudo consistiu em determinar a qualidade nutricional do perfil lipídico da carne de lampreia-marinha de forma a avaliar se o consumo deste ciclóstomo pode ser considerado uma prática saudável na dieta dos portugueses.

1.3. Objetivos específicos

I. Conhecer:

- ✓ A estrutura e classificação dos lípidos com destaque para os ácidos gordos das famílias $\omega 3$ e $\omega 6$ e o colesterol;
- ✓ As famílias $\omega 3$ e $\omega 6$ e o colesterol, quer no pescado em geral, quer no músculo de lampreia-marinha;
- ✓ O ciclo de vida da lampreia-marinha;
- ✓ A distribuição da lampreia-marinha com destaque para as bacias hidrográficas do Mondego e do Guadiana;
- ✓ O consumo de lampreia-marinha em Portugal.

II. Aplicar:

- ✓ Metodologia para determinação do teor de lípidos totais presentes no músculo de lampreia-marinha de acordo com os métodos tradicionais para a gordura bruta NP-1972 (IPQ, 2009) e/ou mediante técnicas mais recentes e altamente precisas tais como a extração por solvente a elevada pressão (Lança *et al.*, 2011);
- ✓ Metodologia para preparação de ésteres metílicos de ácidos gordos para cromatografia em fase gasosa;
- ✓ Metodologia para conhecer o perfil em ácidos gordos das famílias $\omega 3$ e $\omega 6$ mediante cromatografia em fase gasosa (GC) e cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS);

- ✓ Metodologia para a quantificação do teor de colesterol total no músculo de acordo com os métodos tradicionais de espectrofotometria/fluorescência;
- ✓ Metodologia para a determinação da humidade presente no músculo de acordo com a NP-2282 (IPQ, 1991);
- ✓ Metodologia para a determinação do conteúdo calórico do músculo de lampreia-marinha mediante utilização de bomba calorimétrica;
- ✓ Tratamento estatístico dos dados.

III. Determinar:

Vários parâmetros nutricionais que caracterizam a carne de lampreia-marinha, a saber:

- ✓ O valor energético;
- ✓ Razão ácidos gordos polinsaturados/ ácidos gordos saturados;
- ✓ Razão ácidos gordos ω 3/ ácidos gordos ω 6;
- ✓ Índice de trombogenicidade;
- ✓ Índice de aterogenicidade;
- ✓ Índice hipocolesterolémico/hípercolesterolémico.

IV. Compreender:

- ✓ O papel do perfil lipídico nutricional oferecido pela lampreia-marinha face ao pescado em geral;

- ✓ As possíveis consequências do consumo de lampreia-marinha na dieta dos portugueses;

V. Valorizar:

O estudo do perfil lipídico nutricional da lampreia-marinha para inferir se o consumo da sua carne poderá ser uma prática de dieta saudável para a população portuguesa.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Classificação dos lípidos

Aos lípidos são atribuídas propriedades homeostáticas nos seres vivos, nomeadamente de isolamento térmico e constituintes de reservas energéticas, assim como parte estrutural das membranas biológicas, através dos fosfolípidos e esteróis. Em pequenas quantidades, funcionam como cofatores enzimáticos, transportadores de eletrões, agentes emulsionantes, hormonas e mensageiros intracelulares (Berg *et al.*, 2002).

Os lípidos são um grupo muito vasto e heterogéneo de substâncias de origem biológica, cuja principal característica é a solubilidade em solventes orgânicos como o metanol, acetona, clorofórmio e benzeno, e a insolubilidade em água. Esta insolubilidade deve-se à baixa proporção de átomos polarizáveis que contêm tais como o oxigénio (O), azoto (N), enxofre (S) e fósforo (P) (Koolman & Roehm, 2005).

Os lípidos podem ser divididos em dois grupos: lípidos polares, compostos principalmente por fosfolípidos e, lípidos não polares, constituídos principalmente por triacilgliceróis. Tendo em conta a sua estrutura e as propriedades físicas, os lípidos podem ser agrupados nas seguintes classes maioritárias: triacilgliceróis, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteróis e nalguns casos ácidos gordos (Voet & Voet, 1995), embora para alguns autores estes últimos possam não ser considerados propriamente lípidos.

A classificação dos lípidos pode ser feita de acordo com a capacidade de os mesmos sofrerem ou não hidrólise, classificação esta que está associada a outra mais antiga na qual os lípidos eram classificados em lípidos simples ou lípidos complexos/compostos. Segundo esta classificação, consideram-se lípidos simples aqueles que por hidrólise total dão origem somente a ácidos gordos e álcoois (acilgliceróis e ceras) e por lípidos complexos aqueles que apresentam na sua molécula outros compostos para além dos álcoois e ácidos gordos (Mayes & Botham, 2003).

Os acilgliceróis tal como o nome indica são ésteres de ácidos gordos e glicerol e compreendem os triacilgliceróis, os diacilgliceróis e os monoacilgliceróis. Um triacilglicerol é um éster simples formado pela união de três ácidos gordos a uma molécula de glicerol (ver figura 1), cujos três grupos hidróxido se ligam aos radicais carboxílicos dos ácidos gordos. Num diacilglicerol e num monoacilglicerol o número de ácidos gordos esterificados à molécula de glicerol são dois e um, respetivamente. Ainda no grupo dos lípidos simples, as ceras são formadas a partir da reação entre o ácido carboxílico e um álcool de cadeia longa e apresentam apenas uma única ligação éster.

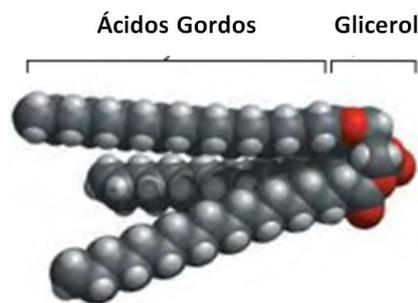


Figura 1 - Representação *Van der Waals* de um triacilglicerol (Adaptado de Koolman & Roehm, 2005).

Relativamente aos lípidos complexos, esta classificação compreende os fosfolípidos (figura 2) e os glicolípidos. Os primeiros são lípidos que contêm ácido fosfórico como mono ou diéster. São constituídos por uma molécula de glicerol, duas (ou uma) cadeias de ácidos gordos (uma saturada e uma insaturada), um (ou dois) grupo fosfato e uma molécula polar ligada a ele e dividem-se em duas classes, dependendo se existe glicerol ou esfingosina na sua composição: glicerofosfolípidos e esfingofosfolípidos. Os glicolípidos são lípidos compostos pela ceramida (i.e., esfingosina mais um ácido gordo) e um glícido de cadeia curta, não existindo o ácido fosfórico típico dos fosfolípidos e incluem os cerebrósidos e os gangliósidos (Mayes & Botham, 2003).

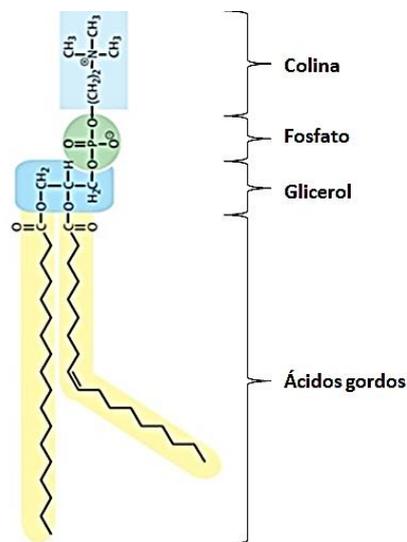


Figura 2 - Representação de um fosfolípido
(Adaptado de Koolman & Roehm, 2005)

Como é comum encontrar-se nos lípidos a função éster do ácido carboxílico, do álcool ou ácido fosfórico, os lípidos podem ainda dividir-se em hidrolisáveis e não hidrolisáveis. Os primeiros são todos aqueles que apresentem pelo menos uma função éster na medida em que os ésteres são hidrolisáveis, e em oposição, os lípidos não hidrolisáveis caracterizam-se pela presença de cadeias de hidrocarbonetos ou de hidrocarbonetos e álcool. Desta forma, o grupo dos lípidos não hidrolisáveis inclui os hidrocarbonetos (alcanos e carotenóides); os álcoois lipídicos (esteróis cíclicos como o colesterol e esteróides tais como o estradiol e a testosterona) e finalmente os ácidos (ácidos gordos e os eicosanóides) (Koolman & Roehm, 2005).

2.2. O caso particular dos ácidos gordos

Os ácidos gordos são ácidos monocarboxílicos de cadeia linear não ramificada com um número par de átomos de carbono e com um grupo carboxilo (-COOH) encontrando-se os átomos de carbono unidos entre si por ligações covalentes simples ou duplas (Campos, 2008). Numa extremidade existe um átomo de carbono que se encontra

ligado a 3 átomos de hidrogénio formando o grupo metilo (H₃C-), enquanto os restantes átomos de carbono que formam a cadeia possuem duas ligações livres que são ocupadas por átomos de hidrogénio (...-CH₂-CH₂-CH₂-...). Na outra extremidade da cadeia tem-se o grupo carboxilo, também denominado por grupo terminal. Os ácidos gordos encontram-se em pequenas quantidades no estado livre mas estão presentes em quantidades elevadas quando envolvidos em ligações éster ou algumas vezes, ligações amina (Weil, 1983). Os ácidos gordos mais comuns são aqueles cujas cadeias variam entre C₄ e C₂₂, sendo o C₁₆ e o C₁₈ os ácidos gordos mais frequentes nos organismos animais (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Tendo em consideração que os átomos de carbono são tetraédricos, a cadeia dos ácidos gordos adota a forma de “zig-zag”, formando ângulos de cerca de 109°, no entanto a molécula é relativamente compacta. Estas moléculas formam uma rede cristalina que confere aos ácidos gordos elevados pontos de fusão. O ponto de fusão dos ácidos gordos aumenta com o aumento da cadeia, mas diminui com o aumento do número de ligações duplas na medida em que a configuração “cis” das ligações duplas confere ângulos de 30° na cadeia, o que dificulta a agregação da molécula (Correia & Correia, 1985; Berg *et al.*, 2002).

2.2.1. Nomenclatura

Todos os ácidos gordos apresentam um nome comum e um nome sistemático. Quando se utiliza o nome sistemático, substitui-se simplesmente o sufixo O – proveniente do hidrocarboneto com o mesmo número de carbonos na cadeia - pelo sufixo OICO (Berg *et al.*, 2002). A título de exemplo pode referir-se o ácido octadecanóico (i.e. C₁₈:0), cujo nome deriva do hidrocarboneto octadecano. O nome comum é ácido esteárico.

Todavia a terminologia dos ácidos gordos deve obedecer a uma nomenclatura universal da IUPAC (“*International Union of Pure and Applied Chemistry*”). Assim, os ácidos gordos são representados com base: i) no comprimento da sua cadeia; ii) no grau de insaturação (número de ligações duplas) presente e iii) na posição das ligações duplas. Desta forma, na representação usual o primeiro número corresponde ao

número de átomos de carbono do ácido gordo; o segundo número corresponde ao número de ligações duplas presentes e o último número corresponde à posição do átomo de carbono correspondente à primeira ligação dupla a partir do grupo carboxilo, como ilustrado na figura 3.

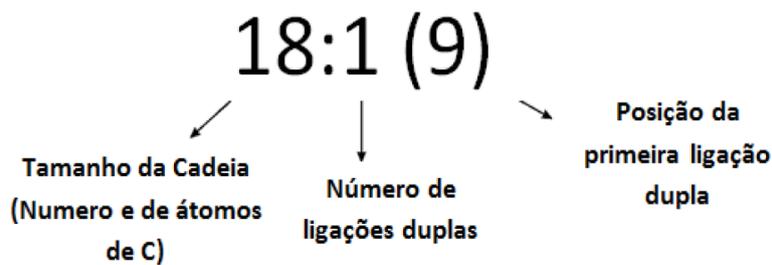


Figura 3 - Nomenclatura internacional do ácido oleico.

Em determinadas circunstâncias, pode torna-se vantajoso indicar a posição das ligações duplas relativamente à extremidade mais distanciada do grupo carboxilo, que como já referido é o grupo metilo, cujo carbono recebe a designação “*n*” ou “*ω*”.

A utilização do alfabeto grego denota um modo de representação dos ácidos gordos que é cada vez mais popular. Segundo esta representação, o átomo de carbono do grupo carboxílico é o primeiro mas permanece fora da contagem, fazendo com que o segundo átomo de carbono da cadeia tome a designação α (alfa), o terceiro a designação β (beta) e assim sucessivamente até ao carbono do grupo metilo que recebe a designação ω (ómega). A posição que ocupam as ligações duplas é indicada em relação ao carbono do grupo metilo, ou seja, o carbono ω (ver figura 4). Um ácido gordo ω_3 será aquele que apresenta a primeira ligação dupla posicionada entre os carbonos 3 e 4 a contar do extremo metilo, assim como um ácido gordo ω_6 terá a sua primeira ligação dupla entre os carbonos 6 e 7 a contar do extremo metilo (Berg *et al.*, 2002). Existem assim várias famílias ómega de ácidos gordos, sendo as mais estudadas as famílias ω_3 , ω_6 e ω_9 (Scrimgeour & Harwood, 2007; De Meester, 2013).

Igualmente importante é a configuração geométrica das ligações duplas. A ligação entre os átomos de carbono não permite a rotação, logo a posição que os ligantes do átomo de carbono assumem em relação aos ligantes do outro átomo de carbono no espaço adquire uma importância fundamental, na medida em que dá origem a compostos diferentes. Qualquer tentativa de rotação entre os átomos de carbono ocasiona a ruptura da ligação. No sistema IUPAC é muito frequente a configuração da ligação C=C ser mostrada sistematicamente pelas letras *Z* (do alemão *Zusammen*, “juntos”) ou *E* (do alemão *Entgegen*, “opostos”), embora os termos *cis* e *trans* sejam cada vez mais utilizados para descrever a geometria da ligação dupla. Se dois grupos idênticos estão do mesmo lado de uma ligação dupla, o composto é designado como *cis*; se eles estiverem em lados opostos, será designado como *trans*. Como no caso dos ácidos gordos só existem dois substituintes, estas designações não criam qualquer ambiguidade (Scrimgeour & Harwood, 2007).

2.2.2. Tipos de ácidos gordos

Existem vários tipos de ácidos gordos. Por definição, os ácidos gordos saturados não possuem nenhuma ligação dupla e os ácidos gordos monoinsaturados têm somente uma ligação dupla. Os ácidos gordos polinsaturados contêm duas ou mais ligações duplas interrompidas por um único grupo metileno (CH₂) e incluídos nestes últimos têm-se os ácidos gordos altamente insaturados, sempre que contenham várias ligações duplas (4, 5 ou 6) como ilustrado na tabela 1 (Mayes & Botham, 2003).

Tabela 1. Representação dos três tipos de ácidos gordos

Tipos de Ácidos Gordos (de acordo com o número de ligações duplas)	
	Saturado (sem ligação)
	Monoinsaturado (1 ligação)
	Polinsaturado (>1 ligação)

Os ácidos gordos saturados (saturated fatty acid - SFA) formam uma série de ácidos monocarboxílicos homólogos que apresentam a fórmula geral $C_nH_{2n+1}COOH$ e, tal como já referido, não apresentam nenhuma ligação dupla, sendo por isso caracterizados por possuírem pontos de ebulição mais elevados que os ácidos gordos insaturados. Os ácidos gordos saturados cuja cadeia tenha mais que 10 átomos de carbono são sólidos à temperatura ambiente enquanto os ácidos gordos saturados de cadeia ímpar apresentam geralmente um ponto de ebulição menor que o ácido gordo saturado de cadeia par precedente (Scrimgeour & Harwood, 2007).

O ácido palmítico (C16:0) é o ácido gordo saturado com maior frequência em plantas, microrganismos e em animais, chegando mesmo a poder constituir entre 20-30% do total dos ácidos gordos saturados presentes (Scrimgeour & Harwood, 2007). Para além do ácido palmítico, o esteárico (C18:0) também ocorre naturalmente e com elevada frequência nos lípidos dos peixes, apesar de poderem ser encontrados frequentemente ácidos gordos com comprimentos de cadeia compreendidos entre C12 e C24 (Tocher, 2003).

Os ácidos gordos monoinsaturados (Monounsaturated fatty acid - MUFA) ou monoénicos, apresentam uma ligação dupla, a qual imprime grande reatividade às estruturas onde se encontram e impede também a livre rotação dos dois átomos de carbono intervenientes (Correia & Correia, 1985).

Os ácidos gordos monoinsaturados mais comuns são aqueles que apresentam uma cadeia com número par de átomos de carbono e configuração *cis* (figura 6). A ligação

dupla é geralmente introduzida pelo enzima Δ^9 (delta 9) desaturase que atua sobre os ácidos gordos saturados. Em seguida ocorre um alongamento da cadeia de carbonos mediante o aumento de dois átomos de carbono no grupo carboxilo (Scrimgeour & Harwood, 2007). Os enzimas do grupo das desaturases têm a capacidade de remover dois átomos de hidrogénio de um ácido gordo e criar assim uma ligação dupla C=C. Estes enzimas são classificados como delta (Δ) desaturases sempre que a ligação dupla é introduzida especificamente numa posição fixa a contar do grupo carboxilo do ácido gordo ou ómega desaturases quando a ligação dupla é introduzida especificamente numa posição fixa a contar do extremo metilo da cadeia carbonada. Os enzimas elongases (em português, alongases) proporcionam o aumento da cadeia de carbonos em duas unidades de carbono a partir do grupo carboxilo (Weil, 1983).

18:1 Δ^9

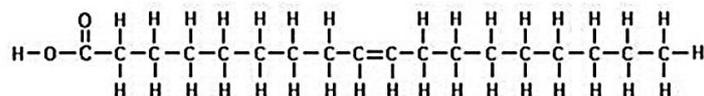


Figura 6 - Exemplo de um ácido gordo monoinsaturado (ácido oleico)

onde é possível observar a configuração *cis* da ligação dupla.

Os ácidos gordos monoinsaturados com 18 ou menos átomos de carbono na sua cadeia são líquidos à temperatura ambiente ou sólidos mas com baixo ponto de fusão. Os ácidos monoinsaturados, quer sejam *cis* ou *trans*, apresentam elevados pontos de ebulição se a ligação dupla estiver posicionada numa posição par da cadeia (Scrimgeour & Harwood, 2007). Os ácidos gordos dos peixes caracterizam-se pelo facto das ligações duplas apresentarem geralmente conformação *cis*, no entanto podem surgir configurações *trans* como por exemplo o ácido elaídico, isómero do ácido oleico, embora seja raro (Tocher, 2003).

Tal como já mencionado, os ácidos gordos monoinsaturados podem ocorrer nos peixes em comprimentos de cadeia entre C14 e C24 (Sargent *et al.*, 1989; Tocher, 2003) e como a posição da ligação etilénica pode variar na cadeia de carbono, dentro de um

comprimento de cadeia específico, existem consideravelmente mais tipos de ácidos gordos monoinsaturados do que saturados (Tocher, 2003).

Consideram-se ácidos gordos polinsaturados aqueles que apresentem duas ou mais ligações duplas etilénicas (Polyunsaturated fatty acid - PUFA). Este padrão resulta da ação dos enzimas desaturases (ou vulgarmente chamados insaturases) seguida pela ação dos enzimas elongases. Nas plantas, as ligações duplas são inseridas nas posições Δ^9 , Δ^{12} e Δ^{15} do ácido gordo com 18 átomos de carbono, dando origem às famílias Δ^9 , Δ^6 e Δ^3 respetivamente. Nos animais, os enzimas inserem as ligações duplas na posição Δ^9 , não existindo nenhum enzima capaz de as introduzir na posição Δ^{12} e Δ^{15} . Qualquer ligação dupla posterior será introduzida entre o grupo carboxilo e a posição Δ^9 sendo essas desaturações realizadas pelos enzimas desaturases Δ^5 e Δ^6 . Em relação ao alongamento da cadeia, este é feito pelos enzimas do grupo das elongases, de acordo com o referido para os ácidos gordos monoinsaturados (Scrimgeour & Harwood, 2007). Consequentemente, toda a estrutura de um ácido gordo polinsaturado é definida através da especificação da posição da primeira ligação etilénica relativamente ao grupo metilo terminal (Tocher, 2003).

2.2.3. Ácidos gordos essenciais

Alguns dos ácidos gordos insaturados são considerados essenciais, o que significa que os animais não dispõem de sistemas enzimáticos para a sua síntese, ou quando dispõem, por vezes fazem-no em quantidades inferiores às necessárias, tendo que ser complementados através da alimentação (Correia & Correia, 1985).

Os ácidos gordos considerados essenciais são todos pertencentes ao grupo dos PUFA (ver figura 7) (Koolman & Roehm, 2005). Quando são fornecidas quantidades suficientes de ácidos gordos ω_3 e ω_6 (como o alfa-linolénico e o linoleico) na dieta, alguns animais tem a capacidade de sintetizar outros ácidos gordos das famílias ω_3 e ω_6 recorrendo a dessaturações e alongamentos (Parrish, 2009). Desta forma, os ácidos gordos essenciais, linoleico (LA) e alfa-linolénico (ALA), são respetivamente os

precursores das famílias ω 6 e ω 3 (figura 7) (Steffens, 1997; Tocher, 2003; Souza *et al.*, 2007).

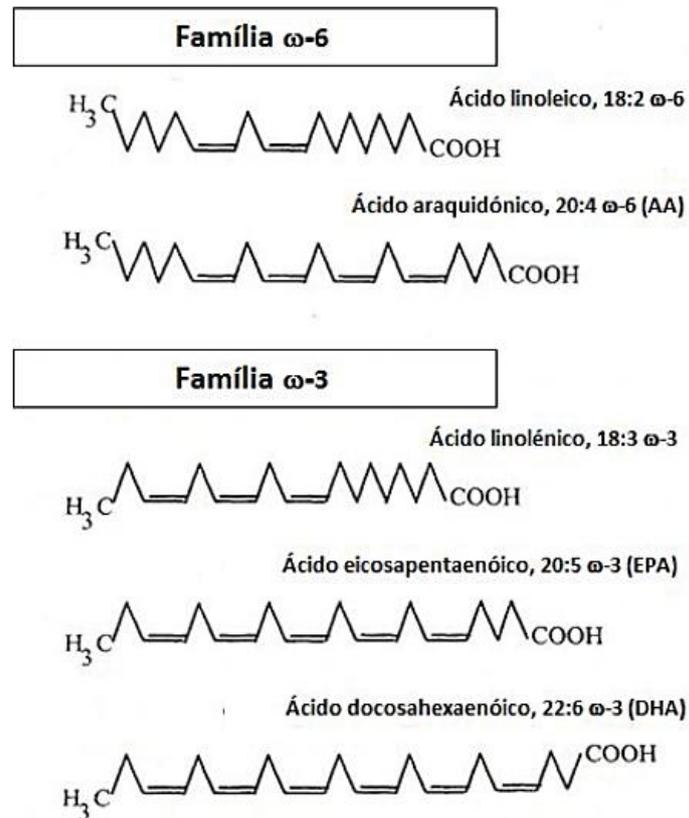


Figura 7 - Famílias de ácidos gordos essenciais ("Essential fatty acids" - EFA)

(Adaptado de Olsen, 1999).

Os enzimas desaturases Δ^5 e Δ^6 apresentam preferências diferentes entre as famílias de ácidos gordos, sendo essa preferência maior pela família ω 3 do que pela família ω 6 e estes enzimas são comuns aos processos de desaturação de ambas as famílias (Zheng *et al.*, 2004). Apesar das circunstâncias, o excesso de ω 6 PUFA na dieta pode inibir a biossíntese de alguns ácidos gordos essenciais ω 3 (Horrobin, 1993). A proporção recomendada para a razão ω 3/ ω 6 na dieta, deve ser superior a 0,25 para minimizar a competitividade entre a série linoleica e a série linolênica (Holub, 2002). Atualmente para além do ácido linoleico (C18:2 ω 6) e alfa-linolênico (C18:3 ω 3), são igualmente considerados essenciais os ácidos araquidônico (AA, C20:4 ω 6); eicosapentaenóico

(EPA, C20:5 ω 3) e docosahexaenóico C22:6 ω 3 (DHA) (Simopoulos 1999a; Souza *et al.*, 2007).

A importância dos ácidos linoleico e alfa-linolénico encontra-se bem definida, quer pelo facto de serem componentes estruturais de membranas, quer por serem precursores de substâncias fisiologicamente ativas denominadas eicosanóides. Os eicosanóides são sintetizados a partir do C20:4 ω 6 presente nos fosfolípidos das membranas celulares e em menor extensão, a partir do ácido C20:5 ω 3 (Sargent *et al.*, 1999) quando estes são libertados da posição *sn*-2 de fosfolípidos teciduais pela ação de fosfolipase A2 (Six & Dennis, 2000; Zhou & Nilsson, 2001). A produção de eicosanóides é influenciada pela razão C20:4 ω 6/C20:5 ω 3 e uma alteração neste equilíbrio pode causar danos na estrutura e função dos tecidos. A disponibilidade de ácidos gordos essenciais é o regulador mais importante para a formação de eicosanóides, onde eles irão competir pelas vias da ciclooxigenase ou da lipooxigenase (Broughton & Wade, 2002).

Os eicosanóides são reguladores do sistema autócrino, isto é, são compostos de curta duração que atuam nas células vizinhas das células de origem. Virtualmente, todos os tecidos produzem eicosanóides e apresentam diversas funções fisiológicas tais como no sistema coagulação do sangue, no sistema neuronal, cardiovascular (ação sobre o tónus), reprodutivo, respiratório, renal, endócrino e imunitário (Vanek & Connor, 2007).

Os eicosanóides dos ácidos gordos da série ω 3 são menos aterogénicos, pró-inflamatórios e vasoconstritores que os eicosanóides dos ácidos gordos da série ω 6 (Vanek & Connor, 2007). Esta é uma das principais razões pelo interesse na investigação do papel preventivo dos lípidos do pescado, já que estes são ricos em ácidos gordos de cadeia longa da série ω 3. Em quantidades suficientes, tanto o EPA quanto o DHA, são capazes de diminuir a síntese de prostaglandinas da série 2 e a síntese de leucotrienos da série 4, que são potentes mediadores pró-inflamatórios (Guiné & Henriques, 2011).

Depreende-se assim que a manutenção de um equilíbrio apropriado entre as duas famílias de ácidos gordos ómega é fundamental para a saúde humana. De facto, os processos metabólicos de digestão, alongamento, dessaturação, esterificação e deposição de ácidos gordos altamente insaturados nas membranas celulares não são muito discriminatórios relativamente à estrutura química dos ácidos gordos das duas famílias ómega acima referidas. Isto significa que a proporção destes na dieta é o principal fator que poderá determinar uma proporção equilibrada nos tecidos onde se formam os precursores de eicosanóides, exercendo assim a dieta um papel importante na prevenção de desequilíbrios e futuras patologias (Mohrhauer & Holman, 1963; Lands *et al.*, 1992).

Em contrapartida, a conversão dos precursores de eicosanóides em ações hormonais é muito mais seletiva e todas as hormonas provenientes da família ω_6 apresentam ações muito mais fortes que aquelas que derivam dos precursores da família ω_3 (Lands, 2013).

A deficiência de ácidos gordos essenciais e o desequilíbrio entre estas famílias estão relacionados com diversas patologias, tais como doenças cardiovasculares, cancro, resistência à insulina, asma, lúpus, esquizofrenia, depressão, depressão pós-parto, envelhecimento acelerado, acidente vascular cerebral (AVC), obesidade, diabetes, artrite, hiperatividade e síndrome de déficit de atenção, doença de Alzheimer, entre outras (Guiné & Henriques, 2011).

2.3. Colesterol

O colesterol é o esteroide mais importante e abundante nos animais, incluindo o pescado, encontrando-se amplamente distribuído em todas as células do organismo (Sargent *et al.*, 1989).

A maior parte do colesterol existente no organismo humano deriva da síntese endógena (cerca de 1g/dia) enquanto aproximadamente 0,3g/dia é fornecido pela dieta (Silva, 2000).

É um dos constituintes maioritários das membranas plasmáticas e das lipoproteínas plasmáticas, e ocorre usualmente na forma de ésteres de colesterol (i.e. esterificado com ácidos gordos saturados e insaturados e com algumas proteínas) mas pode também ser encontrado na forma livre (i.e. não esterificado) (Wąsowicz, 2003; Belitz *et al.*, 2004; IOM, 2005). Este último, para além de fazer parte da estrutura das membranas celulares, também funciona como precursor para a biossíntese de várias hormonas esteroides (i.e. cortisol, aldosterona, testosterona, progesterona e estradiol) de ácidos biliares e da vitamina D (Huss, 1995; Kołakowska & Sikorski, 2003; Wąsowicz, 2003; Belitz *et al.*, 2004).

Vários estudos revelam que o elevado consumo de colesterol associado à dieta contribui para o aumento do risco de aparecimento de hipercolesterolemia e risco vascular (Wąsowicz, 2003; IOM, 2005). Nos países desenvolvidos, as dislipidémias são a principal causa de morte, superior à provocada por doenças degenerativas. No entanto, quando se consome uma dieta nutricionalmente adequada, é possível manter os níveis de colesterol na gama de valores aceitáveis (IOM, 2005). Um consumo adequado de ácidos gordos mono e polinsaturados, sobretudo das famílias $\omega 3$ e $\omega 6$, apresenta efeitos benéficos nos níveis de colesterol livre presente no sangue (Gajić, 1997, citado por Živković *et al.*, 2002).

Segundo Oehlenschläger (2006) 90% do total de esteróis do pescado corresponde ao colesterol, podendo representar cerca de 6% do total de lípidos nos peixes magros (Huss, 1995). De acordo com Iwasaki & Harada (1984), o conteúdo em colesterol nos peixes pode variar entre 32 e 68 mg/100g de carne, estando os valores superiores (> 40 mg/100g) associados a peixes gordos enquanto os peixes magros apresentam valores entre os 30 – 40 mg/100g (Živković *et al.*, 2002). Os valores de colesterol encontrados em animais marinhos são tendencialmente menores do que os valores encontrados em carnes vermelhas, manteigas e ovos (Živković *et al.*, 2002; INSA, 2006).

2.4. Os lípidos nos peixes

Os lípidos e os ácidos gordos que os constituem são, juntamente com as proteínas, os maiores compostos orgânicos dos peixes, sendo os hidratos de carbono quantitativamente muito menos representativos. Os lípidos podem representar 20% do peso fresco de algumas espécies de peixes marinhos, excedendo grandemente o conteúdo em proteínas em determinadas etapas do ciclo de vida e dependendo das espécies em causa (Tocher, 2003). Nos ecossistemas aquáticos os lípidos proporcionam a principal fonte de energia para os organismos animais (Parrish, 2009), fornecendo energia metabólica para as principais funções tais como locomoção, migração e reprodução (Tocher, 2003).

Os lípidos dos peixes contrastam bastante com os lípidos dos mamíferos, podendo incluir mais de 40% de ácidos gordos de cadeia longa que são altamente insaturados (Highly unsaturated fatty acid - HUFA) e que contêm 4, 5 ou 6 ligações duplas, enquanto por outro lado os ácidos gordos dos mamíferos raramente contêm mais do que 2 ligações duplas (FAO, 2005).

No meio marinho, as algas, são organismos ricos em ácidos gordos polinsaturados com cadeias de comprimento em C16 e contendo 2 ou 4 ligações duplas; em C18 e contendo 2 a 5 ligações duplas; em C20 com 2 a 5 ligações duplas e em C22 com 2 a 6 ligações duplas (Sargent 1995; Tocher, 2003). Ao constituírem a base da cadeia trófica dos peixes, faz destes vertebrados a fonte mais importante destes ácidos gordos para o Homem (Tocher, 2003), sendo particularmente importantes na prevenção de numerosas patologias.

Os lípidos dos peixes, à semelhança do que acontece nos mamíferos, podem ser divididos em lípidos polares e lípidos não polares e entre os compostos orgânicos presentes nos peixes, os lípidos são os que apresentam a maior variação, podendo oscilar muito mais do que o conteúdo em água, proteína ou minerais. Deste modo, a razão entre o maior e o menor valor do conteúdo proteico ou hídrico geralmente não é superior a 3:1, já a razão entre o valor superior e inferior de lípidos pode ser de 300:1 (Murray & Burt, 2001).

Enquanto os fosfoglicéridos, fazem parte da constituição das membranas celulares, os triacilgliceróis formam as reservas de energia nos animais, encontrando-se depositados em células denominadas adipócitos. Devido a estas características, os triacilgliceróis são frequentemente denominados como depósitos de gordura e em muitos outros animais eles constituem o tecido adiposo. Todavia, este não é tão frequente nos peixes, sendo regra a presença de gordura mesentérica (Tocher, 2003). A nível sanguíneo, são também encontrados ácidos gordos livres, os quais transportados entre diversos compartimentos do organismo animal têm como finalidade ser catabolizados para obtenção de energia (Ackman, 1999).

A deposição de lípidos nesta classe de vertebrados está relacionada com a constituição do tecido muscular, na medida em que a classificação das fibras musculares leva em consideração duas características funcionais: velocidade de contração (lenta ou rápida) e atividade metabólica (aeróbica/oxidativa ou anaeróbica/ glicolítica) (Altringham & Johnston, 1981). As fibras brancas contêm células adiposas intercaladas enquanto as fibras vermelhas são mais ricas em lípidos e estes encontram-se na própria fibra muscular (Sheridan, 1994).

Nos peixes teleósteos, o músculo natatório constitui grande parte da sua massa corporal. Os músculos axiais permitem a flexão da coluna vertebral e da região caudal, durante a natação, estando divididos em região epiaxial e hipoaxial por meio de um septo lateral ou transversal formado por tecido conjuntivo, localizado na região da linha lateral (Alexander, 1969; Videler, 2011). O músculo estriado esquelético é constituído por unidades morfo funcionais, denominadas miómeros, que se repetem ao longo do corpo do animal e estão inseridas por curtos tendões em bainhas de tecido conjuntivo, os mioseptos (Alexander, 1969). A disposição dos miómeros confere a esses animais uma maior mobilidade durante a realização dos movimentos ondulatórios da locomoção (Leeuwen, 1999). Em relação às fibras musculares elas dividem-se em três tipos principais (fibra vermelha, intermediária e branca). Na maioria dos peixes as mais frequentes são a vermelha e a branca. As fibras musculares vermelhas encontram-se orientadas mais ou menos paralelamente ao eixo do corpo enquanto as fibras musculares brancas formam desvios de aproximadamente 45° em

relação ao eixo do corpo. As fibras musculares vermelhas constituem normalmente entre 5 a 15% de toda a musculatura dos miótomos dos peixes (Altringham & Johnston, 1981) e as brancas correspondem aproximadamente 70% do volume total do tecido muscular (Sänger & Stoiber, 2001). No entanto, essa organização pode variar de acordo com a espécie, a fase de crescimento e o seu modo de natação (Alexander, 1969; Weatherley & Gill, 1987).

O armazenamento e utilização dos lípidos está geralmente associado a alterações sazonais na abundância de alimento e nas exigências metabólicas dos peixes (i.e. locomoção; migração; reprodução) (Guillemot *et al.*, 1985; Soares *et al.*, 2001; FAO, 2005). Por conseguinte, verificam-se alterações na distribuição destas reservas nos órgãos e tecidos corporais (Soares *et al.*, 2001).

De um modo geral, os peixes armazenam lípidos em vários órgãos, como o fígado, músculos e apresentam frequentemente gordura mesentérica. Nestes locais, os lípidos podem representar cerca de 10 a 20% do peso do órgão, sendo de salientar o caso do fígado de bacalhau (*Gadus morhua*), no qual os lípidos podem constituir cerca de 67% do peso. A gordura mesentérica pode ser muito rica alcançando os 90% dos lípidos totais (Sheridan, 1988).

Os peixes marinhos não são uma importante fonte de colesterol na dieta alimentar (Oehlenschläger, 2000; Bandarra *et al.*, 2001; Kotakowska *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2003; Oehlenschläger, 2006), todavia noutros produtos da pesca, como alguns cefalópodes, podem ser atingidos valores superiores a 100 mg/100g. No entanto, estes produtos da pesca são ricos em taurina, um aminoácido livre que reduz a absorção do colesterol, pelo que estes níveis podem não se apresentar como preocupantes (Nunes *et al.*, 2003; Oehlenschläger, 2006). Elvevoll *et al.* (2008) referem que se podem observar consideráveis variações do teor deste esterol entre e dentro da mesma espécie. Assim, no peixe, os níveis de colesterol só podem ser efetivamente avaliados e conhecidos quando se tem em consideração, não só a sua concentração média nos tecidos, mas também diversos fatores, como local de captura, variações sazonais, comprimento, sexo, entre outros (Oehlenschläger, 2000, 2006).

2.4.1. Peixes gordos versus peixes magros

Os peixes podem ser agrupados em quatro categorias de acordo com o seu conteúdo lipídico. Os peixes magros apresentam uma percentagem de lípidos inferior a 2% do peso corporal; os peixes pouco gordos caracterizam-se por um teor em lípidos entre 2 e 4%; nos peixes meio gordos o teor em lípidos varia entre 4 e 8% e nos peixes muito gordos o teor lipídico é superior a 8% do peso do corpo (Ackman, 1989). Todavia, existe outra classificação geralmente mais conhecida na qual os peixes podem ser agrupados nas categorias de magros, semi-gordos e gordos, tendo por base o órgão onde se armazenam os lípidos. Deste modo, consideram-se peixes magros os que depositam a grande maioria dos lípidos no fígado; peixes gordos os que armazenam lípidos em células adiposas distribuídas por vários tecidos corporais nomeadamente no músculo; e peixes semi-gordos todas aquelas espécies que depositam lípidos apenas em algumas partes dos tecidos corporais e/ou em quantidades mais reduzidas (FAO, 2005).

Com base na classificação da FAO os peixes gordos apresentam maior percentagem de fibras vermelhas relativamente aos peixes magros, logo o seu conteúdo em lípidos tende a ser superior ao dos peixes magros e consideravelmente mais variável. No entanto essa variação na percentagem de lípidos está inversamente associada à percentagem de água, podendo esses dois componentes constituir cerca de 80% do músculo (FAO, 2005). Conforme o conteúdo em lípidos aumenta, o conteúdo em água diminui e vice-versa (Murray & Burt, 2001).

As espécies tipicamente magras são geralmente demersais como por exemplo o bacalhau (*Gadus morhua*; *Gadus macrocephalus*), escamudo (*Pollachius virens*) e a pescada (*Merluccius merluccius*). As espécies gordas incluem peixes pelágicos como o atum (*Thunnus thynnus*), cavala (*Scomber japonicus*), o arenque (*Clupea harengus*) e a sardinha (*Sardina pilchardus*) entre outras (FAO, 2005).

2.4.2. Peixes marinhos versus peixes dulçaquícolas

A composição, a distribuição e a relação entre as famílias $\omega 3$ e $\omega 6$ nos peixes são influenciadas principalmente por 3 fatores: genéticos (e.g. espécie, etapa de desenvolvimento) ambientais (e.g. meio marinho, dulçaquícola, temperatura da água, salinidade) e dieta (Ackman, 1982).

Os peixes jovens caracterizam-se por apresentarem menor percentagem de lípidos totais, enquanto os peixes adultos apresentam maiores depósitos de triacilgliceróis, sobretudo como reservas de energia para o desenvolvimento das gónadas (Ackman, 1999). As épocas reprodutivas são outro fator condicionante do teor de ácidos gordos polinsaturados nos peixes, uma vez que nestas épocas estes são mobilizados para as gónadas e reprodução, podendo estas conter mais do dobro do teor encontrado no músculo, com o ácido gordo docosahexaenóico a contribuir para a maior proporção destes ácidos gordos (Ackman, 1982; Ackman, 1999; Tocher 2003).

Associado a este fator encontra-se a perda substancial de lípidos, relacionada com os gastos energéticos, que ocorre durante esta fase. Não só alguns ácidos gordos monoinsaturados são catabolizados durante a migração reprodutiva (em especial o oleico) como os teores de ácidos gordos polinsaturados $\omega 3$ contidos no músculo decrescem em virtude de serem mobilizados para as gónadas (Huynh *et al.*, 2007).

Os fatores ambientais, tais como a salinidade e a temperatura, influenciam o metabolismo dos peixes, afetando as suas exigências em ácidos gordos. Este facto está relacionado com a poiquilotermy (i.e. ausência de um mecanismo interno de regulação da temperatura corporal). Nesse sentido, espécies aquáticas de águas frias apresentam um teor maior em PUFAs do que espécies de regiões tropicais (Henderson & Tocher, 1987).

Embora a influência dos parâmetros ambientais na determinação das exigências lipídicas para peixes seja importante, a alimentação é o fator que mais contribui para o perfil de ácidos gordos dos triacilgliceróis destes animais (Watanabe, 1987). Como tal, a base das cadeias tróficas das diversas espécies de peixes é um fator altamente

condicionante na medida em que os produtores das cadeias tróficas marinhas e dulçaquícolas são distintos em termos de perfil de ácidos gordos. Os produtores de teias alimentares marinhas são algas unicelulares ricas em PUFAs sobretudo da família ω_3 enquanto os produtores das teias alimentares dulçaquícolas apresentam um maior teor em PUFAs da família ω_6 . Esta diferença vai condicionar a composição em ácidos gordos existentes nos músculos e fígado das espécies marinhas e dulçaquícolas (Martino *et al.*, 2002).

A percentagem de ácidos gordos altamente insaturados, apesar de elevada em ambos os casos é inferior nos peixes dulçaquícolas (70%) em relação aos peixes marinhos (85%) (FAO, 2005). Pode assim afirmar-se que os peixes são boas fontes de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (Ackman, 1982; Özogul & Özogul, 2007; Özogul *et al.*, 2011; Hossain, 2011; Jabeen & Chaudhry, 2011; Prato & Biandolino, 2012), no entanto é de realçar a diferente composição entre peixes marinhos e dulçaquícolas (Souza *et al.*, 2007).

Os peixes marinhos caracterizam-se por níveis baixos de LA e ALA, no entanto apresentam níveis elevados de ácidos gordos altamente insaturados ω_3 (Steffens, 1997; Souza *et al.*, 2007; Ozogul *et al.*, 2011), sendo o EPA e DHA os dominantes (Ackman, 1999). Uma vez que os peixes marinhos obtêm elevados teores de PUFAs diretamente na sua dieta, a capacidade de alongar e dessaturar os PUFAs foi sendo reduzida, devido a uma diminuição dos enzimas envolvidos nestes processos (Olsen, 1999; Tocher, 2003). Considerando este facto, pode dizer-se que a capacidade da maioria das espécies marinhas em alongar e dessaturar o LA e o ALA para ácidos gordos de cadeias mais longas (i.e. EPA, DHA e AA) é baixa, insuficiente ou nalguns casos até mesmo nula (Olsen, 1999; Sargent *et al.*, 1999).

Em contrapartida, os peixes dulçaquícolas apresentam níveis superiores de PUFAs com cadeias de 18 carbonos (i.e. AL e ALA), e também apresentam quantidades apreciáveis de AA, EPA e DHA (Steffens, 1997). Este facto encontra-se associado a uma maior capacidade, relativamente aos peixes marinhos, em alongar e dessaturar ácidos gordos da sua cadeia trófica, pois mantiveram os mecanismos enzimáticos (i.e. Δ^5 e Δ^6 desaturases) para a síntese de HUFAs, principalmente devido à baixa proporção destes

últimos na dieta. Nesse sentido, o LA e o ALA satisfazem as necessidades em ácidos gordos essenciais das famílias $\omega 6$ e $\omega 3$ respetivamente (Bell *et al.*, 1986). Todavia é de realçar que estes processos são morosos (Steffens, 1997; Souza *et al.*, 2007).

2.5. O caso particular da lampreia-marinha

2.5.1. Caracterização geral

2.5.1.1. Filogenia e taxonomia

As lampreias pertencem à ordem dos Petromyzontiformes, que juntamente com as Mixinas (ordem: Myxinidae) são os únicos representantes atuais da superclasse Agnatha (peixes desprovidos de mandíbula) (Hardisty, 1986).

A superclasse Agnatha surgiu na era Paleozoica à aproximadamente 400-500 milhões de anos, estando o primeiro fóssil reconhecido de lampreia datado em aproximadamente 360 milhões de anos (Janvier, 2007; Wilkie, 2011). Estas primeiras lampreias apresentavam uma morfologia geral bastante semelhante às lampreias existentes na atualidade, sendo estas últimas consideradas como fósseis vivos devido à sua capacidade de se adaptar e persistir ao longo dos tempos (Janvier, 2007).

De acordo com Nelson (2006) e Janvier (2007), a lampreia-marinha é classificada na seguinte posição filogenética:

Filo Chordata

Subfilo Craniata

Superclasse Petromyzontomorphi

Classe Petromyzontida

Ordem Petromyzontiformes

Família Petromyzontidae

Subfamília Petromyzontinae

Género *Petromyzon*

Espécie *Petromyzon marinus*

A subfamília *Petromyzontinae*, pertencente à família *Petromyzontidae*, encontra-se dividida em 2 géneros, o género *Ichthyomyzon* (com 6 espécies) e o género *Petromyzon* que compreende apenas a espécie *Petromyzon marinus*, Linnaeus, 1758 (figura 8) vulgarmente conhecida como lampreia-marinha (Hubbs & Potter, 1971).



Figura 8 - Ilustração da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, Linnaeus. 1758)

(Adaptado de Iglésias, 2013)

Em Portugal existem 6 espécies de lampreia: a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, Linnaeus, 1758), a lampreia-de-rio (*Lampetra fluviatilis*, Linnaeus, 1758), a lampreia-de-riacho (*Lampetra planeri* Bloch, 1784) e três espécies endémicas de

Portugal, a lampreia-da-costa-da-prata (*Lampetra alavariensis*, Mateus, Alves, Quintella & Almeida, 2013), a lampreia-do-nabão (*Lampetra auremensis*, Mateus, Alves, Quintella & Almeida, 2013) e a lampreia-do-sado (*Lampetra lusitanica*, Mateus, Alves, Quintella & Almeida, 2013), estas últimas descobertas recentemente e cujos nomes remetem para os locais de origem (Mateus *et al.*, 2013).

2.5.1.2. Ciclo de vida da lampreia-marinha

A lampreia-marinha é uma espécie anádroma, isto é, parte do seu ciclo de vida é passado em ambiente marinho e a outra parte em água doce, na qual sobe os rios para acasalar e desovar (Hardisty & Potter, 1971a). Durante o seu ciclo de vida realiza duas migrações, uma trófica e uma reprodutiva (Hardisty & Potter, 1971b). Por estes motivos o ciclo de vida da lampreia (figura 9) pode ser dividido em duas fases distintas, uma fase larvar e microfágica em ambiente dulçaquícola e uma fase adulta e parasítica em ambiente marinho (Hardisty & Potter, 1971b; Quintella, 2006).

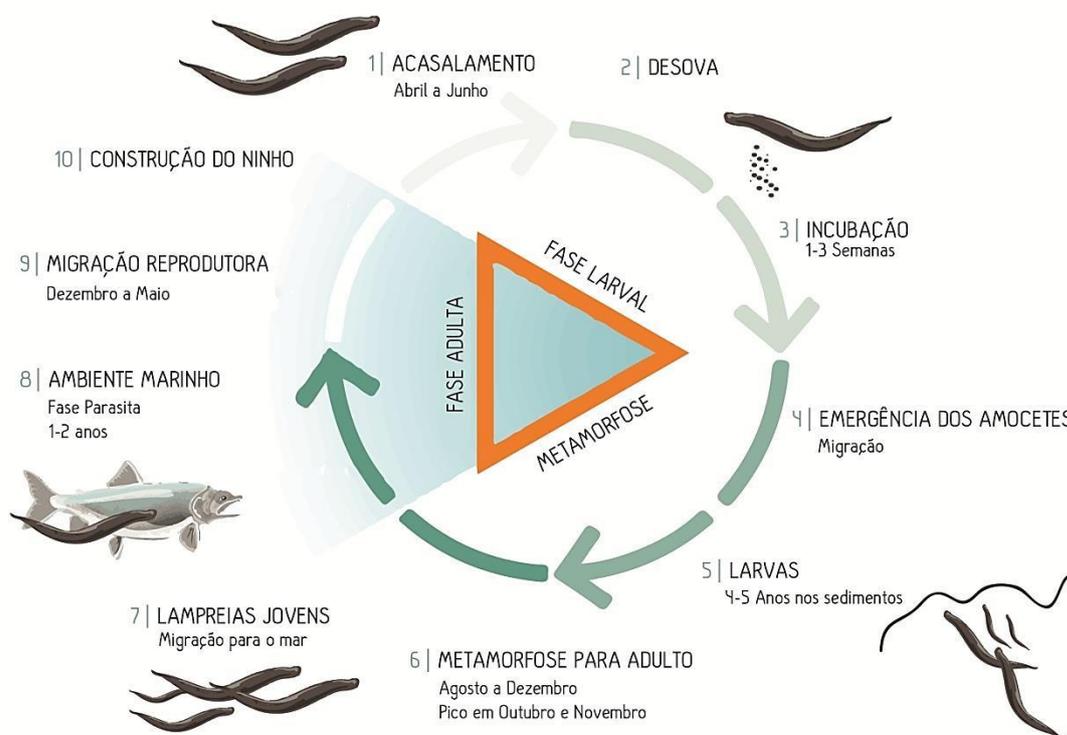


Figura 9 – Esquema do ciclo biológico da lampreia-marinha

(Autoria de Susana Raposo de Almeida, 2014)

A lampreia-marinha é um animal dióico, a fecundação é externa e o desenvolvimento é indireto. Existe um estágio larvar, no qual é denominada amocete e cuja principal característica é ser desprovida de olhos e de dentição. Nos rios portugueses, os amocetes permanecem enterrados em fundos de substrato fino durante 4 a 5 anos (Quintella *et al.*, 2003) alimentando-se por filtração de modo não seletivo, na sua maioria de microrganismos e de partículas orgânicas em suspensão na coluna de água (Hardisty & Potter, 1971a). Após o período de larva, os amocetes sofrem um processo de metamorfose, necessário para preparar os organismos para o seu futuro habitat em ambiente marinho (Youson & Potter, 1979). Ao longo do processo de metamorfose, existem alterações e rearranjos teciduais, sendo os lípidos a principal fonte de energia durante o período não trófico (Youson, 1980). Este processo ocorre quando os amocetes apresentam um comprimento médio de 140mm e decorre em Portugal desde o final do Verão (Agosto/Setembro) até ao meio do Inverno (Janeiro/Fevereiro) com predominância nos meses de Outubro e Novembro (Quintella *et al.*, 2003).

No fim da metamorfose, as larvas transformadas exibem adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Youson, 1980) antes de entrar no lago ou oceano (Beamish, 1980). As lampreias jovens metamorfoseadas iniciam a migração para águas marinhas, e permanecem na plataforma continental até atingir a maturação sexual (Doadrio, 2001). A fase adulta ocorre em meio marinho e tem geralmente a duração de dois anos (Beamish, 1980), mas já foram capturados indivíduos onde se verificou que a duração desta fase foi de apenas 13 meses (Silva *et al.*, 2013).

Durante a fase marinha são parasitas hematófagos, o que significa que se alimentam do sangue dos seus hospedeiros. Para tal fixam-se às secções laterais dos hospedeiros com auxílio do seu disco bucal, alimentando-se de sangue e fluidos de diversas espécies de peixes e cetáceos (Beamish, 1980; Silva *et al.*, 2014). Após um período de 1 a 2 anos de alimentação hematófaga (Hardisty & Potter, 1971b; Silva *et al.*, 2013) as lampreias atingem o tamanho adulto e retornam a ambiente dulçaquícola com fins reprodutivos (Doadrio, 2001).

A lampreia-marinha volta ao rio, com um peso médio de 1,3 kg e 80 cm de comprimento, para iniciar a migração até ao local de acasalamento e desova. A época da migração reprodutiva da lampreia-marinha encontra-se dependente de diversos fatores físicos tais como a latitude, temperatura da água e o caudal de descarga dos rios (Hardisty & Potter, 1971a) e ainda fatores bióticos, sendo de destacar a libertação de feromonas por parte dos machos que induz nas fêmeas comportamentos reprodutivos, preferência pelo local de acasalamento e desova (Li *et al.*, 2002). Em Portugal, a migração reprodutiva ocorre desde os finais de Dezembro até Maio/Junho, com o pico durante os meses de Fevereiro a Março (Almeida *et al.*, 2000).

A partir do momento em que as lampreias iniciam a sua migração reprodutiva deixam de se alimentar. Este período de jejum é caracterizado por diversas alterações no organismo, como a atrofia da maioria dos órgãos e tecidos, que ocorre em simultâneo com o desenvolvimento das gónadas (Larsen, 1980). Os machos são os primeiros a iniciarem a migração e a chegarem aos locais de postura a fim de construir os ninhos (Hardisty & Potter, 1971b). Após a conclusão do ninho, são depositados entre 152 000 e 304 000 ovos juntamente com o fluido espermático e ocorre a fecundação (Hardisty & Potter, 1971b). A população reprodutora acaba por morrer após a postura devido à exaustão das reservas corporais e quebra dos mecanismos de regulação metabólica, falta de substâncias essenciais e acumulação de substâncias tóxicas (Larsen, 1980).

2.5.1.3. Características morfológicas da lampreia-marinha

As lampreias possuem um corpo alongado e anguiliforme desprovido de escamas, mas revestido por epiderme estratificada e com glândulas produtoras de muco. O esqueleto é cartilágneo e não apresentam barbatanas pares. Caracterizam-se por possuírem duas barbatanas dorsais triangulares dispostas longitudinalmente que se fundem numa só de acordo com a maturação sexual e o início do período de desova (Hardisty & Potter, 1971a) e uma barbatana caudal protocérquica. Na superfície dorsal existe um “nostril”, ou abertura naso-hipofisial, que contacta internamente com o sistema naso-hipofisial e caracterizam-se pela presença de sete pares de fendas

branquiais dispostas em serie (Hardisty & Potter, 1971a; Janvier 2007; Wilkie, 2011). Sendo pertencente aos Agnatas, não apresenta mandíbula, possuindo uma boca semelhante a uma ventosa circular onde estão implantados dentes suctórios utilizados para perfurar a pele dos seus hospedeiros e ainda várias placas dentárias e duas placas linguais. A lampreia-marinha produz uma substância anticoagulante a qual é injetada no ferimento do hospedeiro, mantendo-o aberto e evitando que o sangue coagule. Esta espécie quando inicia a migração reprodutiva deixa de ser parasita e os seus dentes degeneram, não se alimentando enquanto adultos, tendo como única função a reprodução (Quintella *et al.*, 2003). As lampreias não possuem um “verdadeiro” estômago, apenas um intestino alargado desde a abertura esofágica até à cloaca, o coração está confinado dentro de uma cápsula cartilágnea periférica e a coluna vertebral é achatada e assenta no notocórdio que confere rigidez ao organismo (Hardisty, 1986).

2.5.2. Distribuição geográfica da lampreia-marinha

A lampreia-marinha encontra-se distribuída geograficamente em ambos os lados do Atlântico Norte (figura 10). A forma anádroma ocorre na costa Este da América do Norte desde o Labrador (Canadá, 53°N) até à Florida (E.U.A., 30°N) e na costa Oeste do Atlântico desde a Península de Kola (Rússia, 70°N) a norte, até à Península Ibérica (38°N) a sudoeste e ao Mar Adriático (40°N) a sudeste (Hardisty, 1986; Beamish, 1980). Ocasionalmente é possível a ocorrência de lampreias na Irlanda, Gronelândia, no Mar do Norte e no Mar Báltico, e também em latitudes inferiores como no Norte de África (Hardisty, 1986). Existem também algumas populações holobióticas (ou seja, que completam o ciclo de vida todo em água doce) de lampreia-marinha nos Grandes Lagos da América do Norte, no entanto não foi reportada nenhuma população na Europa com estas características (Kottelat & Freyhof 2007).

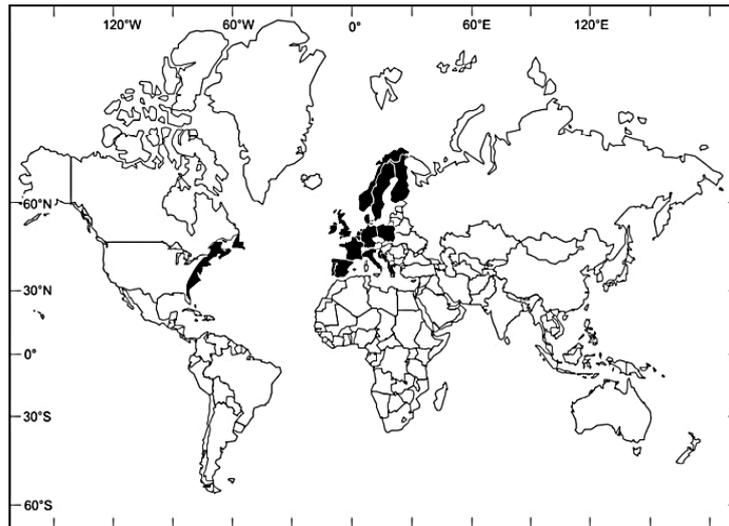


Figura 10 - Distribuição geográfica da lampreia-marinha a nível mundial

(Adaptado de Quintella, 2006)

A lampreia-marinha pode ser encontrada em todas as bacias hidrográficas Portuguesas (Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana), no entanto é mais abundante nas regiões Centro e Norte do País (Almeida *et al.*, 2002b; Quintella *et al.*, 2003).

Em Portugal, a lampreia-marinha encontra-se classificada como vulnerável no Livro Vermelho dos Vertebrados (Rogado *et al.*, 2005) na medida em que enfrenta um risco de extinção elevado. A acentuada diminuição do efetivo populacional encontra-se associada a diversos fatores dos quais se destaca a construção de barragens, destruição do habitat, qualidade e disponibilidade de água e sobre pesca (Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006).

Os principais rios de Portugal, assim como respetivos afluentes, são os habitats da lampreia-marinha (figura 11) e são utilizados pela espécie desde o início do período de migração reprodutiva até ao momento da desova, sendo imprescindíveis para o completar do ciclo de vida (Quintella *et al.*, 2003).

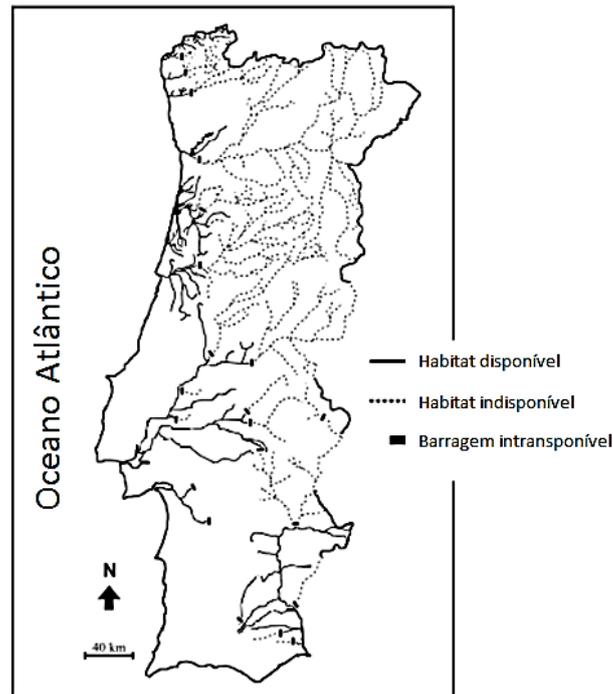


Figura 11 – Habitat disponível para as populações de lampreia-marinha nos rios Portugueses

(Adaptado de Almeida *et al.*, 2002b)

2.6. Caracterização geral das bacias hidrográficas dos rios Mondego e Guadiana

A bacia hidrográfica do rio Mondego é a segunda maior bacia inteiramente Portuguesa, e situa-se na região centro de Portugal (figura 12), sendo limitada pelos paralelos 39°46' e 40°48' de latitude Norte e os meridianos 7°14' e 8°52' de longitude Oeste. Pertence à 4ª região hidrográfica de Portugal Continental juntamente com os rios Vouga, Lis e Ribeiras do Oeste, e ocupa uma área de 6 645 km². O rio Mondego nasce na Serra da Estrela a 1547 m de altitude, percorrendo 258 km até desaguar no Oceano Atlântico junto à Figueira da Foz. Os principais afluentes são, na margem direita, os rios Alva, Arunca, Ceira e Pranto e na margem esquerda, o rio Dão (INAG & ARH CENTRO, 2009). Com a construção do Açude-Ponte em Coimbra, a lampreia-marinha ficou forçada a completar o seu ciclo de vida nos primeiros 35Km a jusante do rio (Quintella *et al.*, 2003), conseguindo transpor este obstáculo apenas em anos com caudais excecionalmente grandes. Desde a construção da escada para peixes no

Açude-Ponte, inaugurada em 2011, a lampreia-marinha consegue migrar com maior facilidade para cursos superiores do rio, entrando em alguns dos seus tributários como o rio Ceira e rio Alva (Almeida *et al.*, 2002a).



Figura 12 – Localização da bacia hidrográfica do rio Mondego
(Autoria de Susana Raposo de Almeida, 2014)

A bacia hidrográfica do rio Guadiana (37° até 40°N e 02° até 08°O) constitui a 7ª região hidrográfica de Portugal em conjunto com as bacias hidrográficas das ribeiras de costa (figura 13). É uma bacia internacional com uma área aproximada de 11 600 km² em território Português (17%) e 55 400 km² em território Espanhol (83%). O rio Guadiana nasce nas lagoas de Ruidera em Espanha, a 868 m de altitude, desenvolvendo-se ao longo de 810 km até à foz, no oceano Atlântico, junto a Vila Real de Santo António. Em Portugal, o rio tem um desenvolvimento total de 260 km e é o coletor principal dos cursos de água do Alentejo Oriental (INAG & ARH ALENTEJO, 2009). Os seus principais afluentes, em Portugal, são os rios Caia, Degebe, Cobres, Vascão e Odeleite, na sua margem direita, e Ardila e Chança na sua margem esquerda (Loureiro *et al.*, 1986).

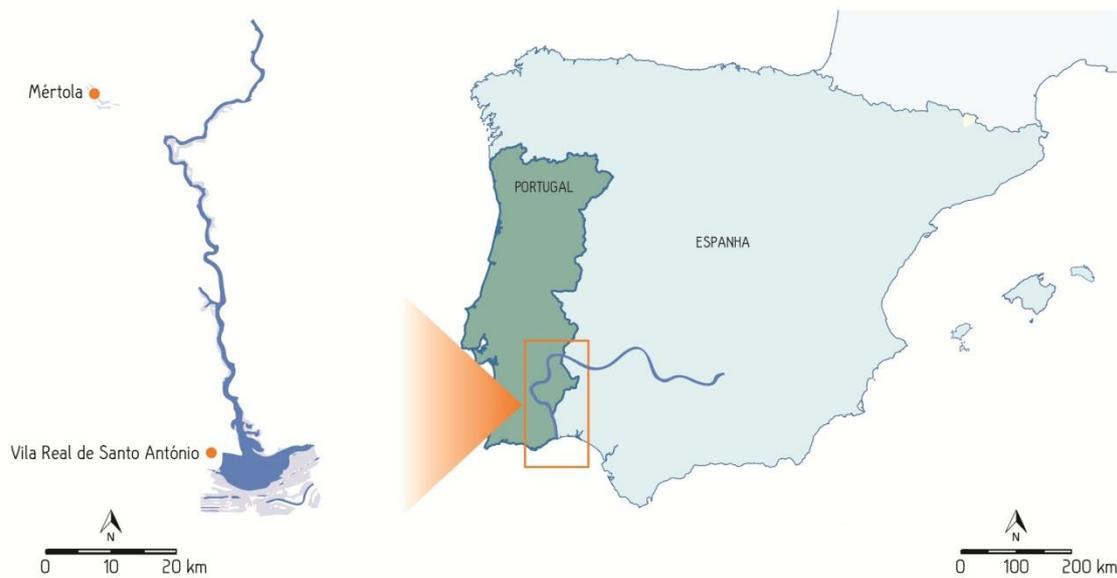


Figura 13 - Localização da bacia hidrográfica do rio Guadiana
(Autoria de Susana Raposo de Almeida, 2014)

Em condições meteorológicas normais, a lampreia-marinha consegue migrar apenas até à falha geológica natural denominada de “Pulo do Lobo” (85 km a montante da foz). Em anos de caudais elevados, há registos de animais capturados a montante deste obstáculo natural, assim como evidências da presença de larvas desta espécie no afluente Vascão (Quintella, 2006).

3. Metodologia

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações presentes no Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório da União Europeia e que em Portugal se encontra representado pelo Decreto – Lei nº 129/92, Portaria nº 1005/92. Todo o procedimento experimental até à obtenção dos tecidos para análise foi assim realizado no Fluviário de Mora, detentor de licença institucional para experimentação animal e sob a direção da orientadora desta dissertação, credenciada como investigadora coordenadora para a prática de experimentação animal desde 2008 pela Direção Geral de Veterinária e portadora de diploma de curso creditado pela FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations), Categoria C.

O quadro fornecido em anexo sumaria os equipamentos (com respetiva marca e modelo) utilizados nos diversos procedimentos.

3.1. Estratégia e captura

Para a realização deste trabalho foi necessário previamente trabalho de campo nas bacias hidrográficas do Mondego e do Guadiana atendendo ao ciclo de vida desta espécie. Esta tarefa permitiu a captura de 15 animais por bacia (30 animais no total), disseção e obtenção de dados biométricos. Após a captura toda a operação se desenvolveu na sala de experimentação animal do Fluviário de Mora e enquadrou-se numa *Call* do ICAAM (Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas).

As capturas foram realizadas por pescadores locais, recorrendo às artes tradicionais de pesca. Todos os indivíduos foram capturados nas áreas utilizadas pelos pescadores sempre que a pesca se destina ao fornecimento para os restaurantes da zona, ou seja, na Figueira da Foz (40° 7' 0" N, 8° 54' 0" W) e na zona de Mértola (37° 38' 0" N, 7° 40' 0" W) no Rios Mondego e Guadiana respetivamente.

Os 15 indivíduos correspondentes a cada uma das duas bacias foram transportados vivos para o Fluviário de Mora, num tanque de polietileno com cerca de 0,4m³ de

capacidade, equipado com bomba oxigenadora. Durante o período de permanência no laboratório instalou-se um sistema de suporte de vida adequado (filtro biológico, refrigerador e oxigenador).

Foi necessário este procedimento prévio atendendo ao período de migração reprodutora da lampreia-marinha, o qual acontece entre Janeiro e Abril de cada ano e, que de outro modo, tornava inviável a realização de amostragens, tratamento laboratorial, tratamento de dados e elaboração da dissertação no período de tempo estipulado.

3.2. Recolha de dados biométricos, tecido muscular e determinação do género

Para cada indivíduo procedeu-se à determinação dos dados biométricos: massa corporal (vulgarmente designada por peso total em g) e comprimento total (mm) medido entre a extremidade do disco oral e a extremidade da barbatana caudal. Procedeu-se à recolha de músculo, extraído sempre na proximidade da linha média dorsal, do flanco esquerdo do animal, junto à barbatana dorsal e correspondente à área do tronco e procedeu-se à lavagem imediata com uma solução de cloreto de sódio a 0.9%. Em seguida efectuou-se a pesagem, envolveu-se em papel vegetal, seguida de folha de alumínio e finalmente guardou-se em sacos de plástico previamente identificados.

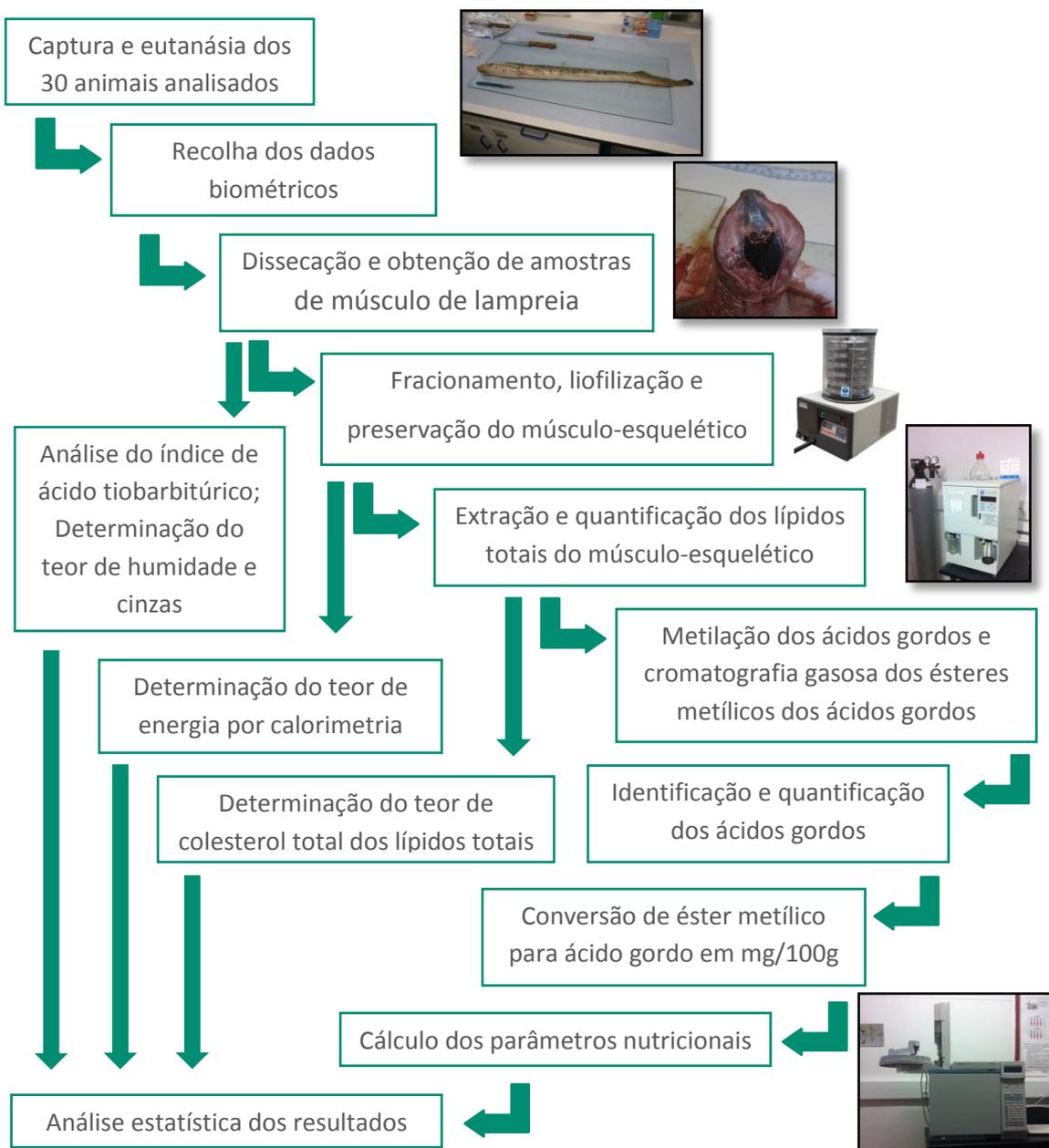
Todas as amostras foram colocadas em *canisters*, mergulhadas em azoto líquido e posteriormente armazenadas em arcas ultracongeladoras a -80°C até à sua utilização, salvo algumas análises, que por terem que se realizar em tecido fresco foram igualmente processadas neste período.

Imediatamente após a disseção foi determinado o género dos indivíduos mediante observação das gónadas. Sempre que existiu alguma dúvida, foram analisadas preparações histológicas no Centro de Oceanografia da Universidade de Lisboa.

Em 2014, durante os meses de Fevereiro a Maio procedeu-se às restantes análises laboratoriais. Todo o trabalho experimental foi realizado nos laboratórios do ICAAM, concretamente no Laboratório de Enologia e nos Laboratórios de Tecnologia e Qualidade dos Produtos Regionais, e de Nutrição e Metabolismo da Universidade de Évora. No mês de Junho foi feita a análise estatística e tratamento dos dados e nos meses de Julho a Setembro procedeu-se à discussão dos resultados e escrita da dissertação.

3.3. Organigrama

De seguida encontra-se o organigrama de forma a permitir a simplificação e racionalização, através da representação esquemática, de todas as etapas que foram executadas de forma a caracterizar-se o perfil lipídico nutricional da lampreia-marinha das bacias dos rios Mondego e Guadiana.



3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade foi determinado de acordo com o método descrito na Norma Portuguesa 2282 (IPQ, 1991). Neste método é feita a dispersão da amostra, secagem à temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ e arrefecimento até peso constante.

As amostras para análise (músculo) foram descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas. Colocaram-se os cadinhos na estufa a 100°C durante 30 minutos e em seguida foram arrefecidos em exsicador e pesados. Pesou-se 10g (± 0.001 g) de amostra homogeneizada para os cadinhos e deixou-se na estufa a 105°C (± 2) durante uma noite. No dia seguinte retirou-se da estufa e colocou-se num exsicador até arrefecer e procedeu-se à pesagem. Esta operação foi repetida até a diferença entre duas pesagens consecutivas ser nula. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

Para determinar a percentagem de humidade das amostras utilizou-se a seguinte equação:

$$100 - \frac{m_{ca} - m_c}{m_a} \times 100$$

Na qual:

m_a – representa a massa da amostra (g);

m_c – representa a massa do cadinho (g);

m_{ca} – representa a massa do cadinho e da amostra após a secagem (g);

3.4.2. Determinação do teor em cinza

O teor de cinza total foi determinado de acordo com o método descrito na Norma Portuguesa 2032 (IPQ, 1988). Neste método a amostra seca (após a determinação do teor de humidade) é carbonizada e incinerada a uma temperatura de $500 \pm 25^\circ\text{C}$ e pesa-se o resíduo.

Após a determinação do teor de humidade, os cadinhos foram colocados na mufla a uma temperatura de $500 \pm 25^\circ\text{C}$ durante 16 horas para inceneração. No final transferiram-se os cadinhos para um exsiccador para arrefecer e registou-se o peso. Cada amostra foi analisada em duplicado.

Calculou-se o teor de cinza total, expresso em percentagem, utilizando a seguinte equação:

$$\frac{m_{cr} - m_c}{m_{ca} - m_c} \times 100$$

Na qual:

m_{cr} – representa a massa do cadinho com o resíduo (g);

m_c – representa a massa do cadinho (g);

m_{ca} – representa a massa do cadinho e da amostra após a secagem (g);

3.4.3. Determinação do grau de oxidação lipídica

O índice de ácido tiobarbitúrico (TBA-i) permite analisar o teor em aldeído malónico (malonaldeído) presente no músculo, que é o principal produto secundário da oxidação lipídica, resultante da degradação de ácidos gordos polinsaturados e da produção de compostos carboxílicos, e que está associado ao aroma e sabor desagradável que alguns alimentos apresentam (Vyncke, 1970; Kong *et al.*, 2008).

O grau de oxidação lipídica foi avaliado pela técnica de determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA), utilizando o método espectrofotométrico descrito no projeto de Norma Portuguesa 3356 (IPQ, 1990). Resumidamente esta determinação tem por princípio a extração do aldeído malónico da amostra com uma mistura de ácido tricloroacético (TCA), galato de propilo e EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético). A reação do aldeído malónico com o ácido tiobarbitúrico forma um complexo corado vermelho, cuja absorvância é medida no espectrofotómetro com um comprimento de onda de 538 nm. Todas as amostras, assim como as curvas padrão de cada ensaio (realizadas paralelamente) foram analisadas/realizadas em duplicado.

O índice de TBA, em mg de aldeído malónico por 1000 g da amostra, foi calculado recorrendo à seguinte equação:

$$TBA = \frac{72 \times c}{m \times V} \times [30 + (m \times H)]$$

Na qual:

c – Concentração de aldeído malónico (μmol)*;

V – Volume utilizado para o ensaio (mL);

H – Teor de Humidade da amostra (%);

m – Massa da amostra (g).

*A concentração de aldeído malónico foi calculada a partir da curva-padrão.

3.4.4. Determinação do teor de energia bruta

O valor energético das amostras foi determinado com base na norma ISO 9831 (1998), através da medição do poder calórico num Calorímetro de combustão isoperibólico automático, com unidade interna de termorregulação e recirculação de água (Parr 6400 Oxygen Bomb Calorimeter).

O valor calorífico (calor de combustão) medido pelo calorímetro resulta da oxidação da amostra mediante combustão em presença de oxigénio puro, numa bomba

calorimétrica, estanque e imersa num depósito com água. O calor produzido durante a combustão da amostra é absorvido pelo metal da bomba e transmitido à água, e quantificado pelo incremento da temperatura da água tendo em conta os calores específicos da água e da bomba.

Pesaram-se 500 mg de amostra de músculo liofilizado e homogeneizado, que foram comprimidos numa prensa (Parr Pellet Press 2811) e colocados dentro de um cadinho de aço inoxidável.

Este cadinho, por sua vez, é colocado dentro da bomba onde se dará a combustão da amostra. Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

Os resultados foram determinados automaticamente pelo equipamento e expressos em megajoule (MJ) por kg de matéria seca. Estes resultados foram convertidos para quilocalorias (Kcal) por 100g de peso húmido de modo a serem comparáveis com os valores nutricionais encontrados na bibliografia de pescado. Para a referida conversão considerou-se o fator de conversão de joules para calorias (1MJ = 239 Kcal) e recorreu-se à seguinte equação:

$$Energia \left(\frac{Kcal}{100g} \right) = \frac{E_{MJ} \times 239}{10} \times M.S.$$

Na qual:

E_{MJ} – Energia da amostra em Megajoules;

M.S. – Matéria seca da amostra;

3.4.5. Determinação dos lípidos totais e análise da composição em ácidos gordos

Para a determinação dos lípidos totais presentes no músculo retirou-se uma amostra de 5 g de músculo e procedeu-se à liofilização durante 48 horas (a uma temperatura de -45 °C e a uma pressão de aproximadamente 10^{-1} mbar), até à obtenção de massa constante. Após pesagem a amostra liofilizada foi homogeneizada para extração dos lípidos totais.

Pesou-se cerca de 200 mg ($\pm 0,002$) de amostra liofilizada previamente triturada, adicionou-se cerca de 2g de agente inerte (Terra de Diatomáceas) e homogeneizou-se. Colocou-se a mistura resultante numa célula de extração de 10mL, com um filtro celulósico previamente aplicado e colocou-se terra de diatomáceas até perfazer o volume total da célula sobre o qual se aplicou o segundo filtro celulósico. Colocou-se a célula no ASE (Accelerated Solvent Extraction, figura 14) que foi programado com as condições indicadas na tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros programados no ASE para a extração dos lípidos totais

Parâmetros	Condições
Temperatura	100°C
Pressão	13.8 MPa
Mistura Solvente	Clorofórmio: metanol (60%: 40%) com BHT (100 mg/L)
Nº Ciclos Extração Estáticos	2
Tempo de ciclo	5 Minutos
Purga das Células	Azoto durante 60 segundos

Após a recolha do extrato lipídico, este foi transferido para um balão de evaporação de 50mL devidamente tarado e identificado, e procedeu-se à evaporação num evaporador rotativo a 50°C. Após a evaporação determinou-se a massa do resíduo seco, correspondente ao teor de lípidos totais da amostra e calculou-se a percentagem de lípidos totais mediante a equação:

$$\text{Lípidos Totais (\%)} = \frac{\text{Massa do Resíduo Seco}}{\text{Massa da Amostra}} \times 100$$

Em seguida, redissolveu-se o extrato seco em 1 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 N) e colocou-se em tubos de metilação (10mL) previamente etiquetados e procedeu-se à transesterificação dos lípidos totais.



Figura 14 - “Accelerated Solvent Extractor”

Para a transesterificação dos lípidos totais submetem-se as amostras aos processos de saponificação e metilação de acordo com o método descrito por Morrison & Smith (1964).

Em traços gerais, após adicionar aos tubos de metilação, que contêm os lípidos totais, 1mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,5 N) deixou-se saponificar a 70°C durante 15 minutos em “hotte”. Deixou-se arrefecer ligeiramente os tubos e adicionou-se 1 mL de trifluoreto de boro em metanol a 14%, agitou-se com o vórtex e colocou-se a metilar a uma temperatura de 70°C durante 10 minutos. Após a metilação deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente antes de abrir os tubos e adicionou-se 3 mL de água destilada, para parar a reação, e 1 mL de éter de petróleo. Em seguida agitou-se os tubos vigorosamente e deixou-se a repousar a 2°C durante 12 horas ou até à separação das duas fases. Recolheu-se o sobrenadante contendo os ésteres metílicos de ácidos gordos para *viás* identificados e adicionou-se 100µL de uma solução de concentração conhecida de padrão interno (éster metílico de C19:0). Cada amostra foi diluída para metade em éter de petróleo. Os *viás* foram selados hermeticamente e armazenados a -20°C até à análise cromatográfica das amostras. Sempre que necessário concentraram-se as amostras sob corrente de azoto.

Os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram analisados num cromatógrafo (Hewlett Packard 6890 GCsystem, figura 15), equipado com injetor split-splitless, detetor de ionização por chama e coluna capilar Omegawax 320 da Supelco (30 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme). O gás

de arraste utilizado foi o hidrogénio com um fluxo de 1 mL/min a 200°C encontrando-se as condições experimentais descritas na tabela 3.



Figura 15 - Cromatógrafo de fase gasosa
(Hewlett Packard 6890 GCsystem)

Tabela 3. Parâmetros programados no GC

Parâmetros	Condições
Temperatura do injetor	260°C
Temperatura do detetor FID	270°C
Temperatura inicial do forno	140°C
Temperatura final do forno	240°C
Rampa de temperatura	4°C/min
Fluxo de Hidrogénio	1.0 mL/min
Tempo de corrida	35 min

As áreas dos picos resultantes foram corrigidas pelos fatores de resposta teóricos relativos do FID (Ackman, 2002). O padrão interno utilizado foi o éster metílico do C19:0, o qual foi adicionado a cada amostra e cromatografado nas mesmas condições experimentais. Em paralelo, foi cromatografado um padrão externo FAME Mix 37 (10mg/mL em diclometano ao qual foi adicionado C22:5 ω 3) (figura 16), nas mesmas condições experimentais.

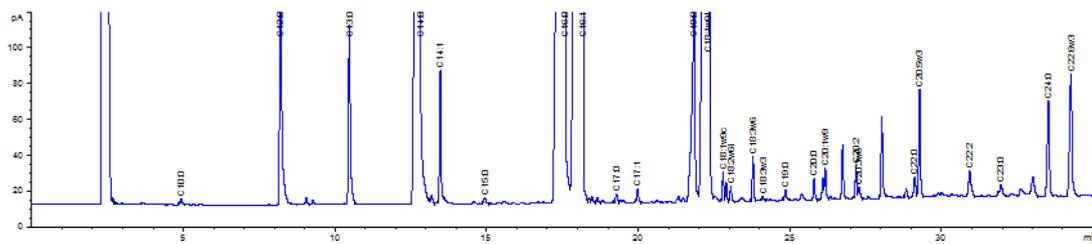


Figura 16- Cromatograma dos ácidos gordos do padrão externo "FAME MIX 37"

Para cada ácido gordo, os valores obtidos foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos identificados na amostra, de modo a eliminar efeitos de concentração de acordo com a equação:

$$\text{Área (\%)} = \frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

Na qual:

A_i = área do pico do componente individual (i);

ΣA = soma de todas as áreas dos picos identificados.

Na medida em que a forma mais adequada para apresentação de resultados em estudos nutricionais é converter os teores dos ácidos gordos em mg de ácido gordo por 100g de músculo peso húmido (mg/100g) (Afonso, 2009), foi necessário determinar previamente um fator de correção teórico para ésteres metílicos de ácidos gordos (F_{CT}) e um fator de conversão de éster metílico para ácido gordo (F_{CEA}) (Visentainer, 2012), de acordo com as equações:

$$F_{CTx} = \frac{F_{CTx}}{F_{CTC19:0}}$$

Na qual:

F_{CTx} = fator de conversão teórico do ácido gordo X;

$F_{CTC19:0}$ = fator de conversão teórico do padrão interno;

$$F_{CEA} = \frac{MM_{EMAG}}{MM_{AG}}$$

Na qual:

F_{CEA} = fator de conversão de éster metílico para ácido gordo;

MM_{EMAG} = massa molecular do éster metílico de ácido gordo;

MM_{AG} = massa molecular do ácido gordo;

Após o cálculo dos fatores de correção e de conversão recorreu-se à equação seguinte (Visentainer, 2012; Kramer *et al.*, 2013) para determinação da massa dos ácidos gordos em mg/g de extrato lipídico:

$$M_X = \frac{M_p \times A_X \times F_{CT}}{A_p \times M_A \times F_{CEA}}$$

Na qual:

M_X = massa do ácido gordo X em mg/g de extrato lipídico;

M_p = massa do padrão interno (C19:0) em mg;

A_X = área do éster metílico de ácido gordo;

F_{CT} = fator de correção teórico;

A_p = área do padrão interno;

M_A = massa da amostra (g);

F_{CEA} = fator de conversão de éster metílico para ácido gordo.

Finalmente, após a apresentação do valor de cada ácido gordo em mg/g de extrato lipídico determinou-se o valor em 100 g de peso húmido de músculo de acordo com a equação:

$$\text{Ácido gordo (mg/100g)} = \left[\frac{(M_X \times M_{LT}) \times 100}{M_{AL}} \right] \times MS$$

Na qual:

M_X = massa do ácido gordo X em mg/g de extrato lipídico;

M_{LT} = massa dos lípidos totais (g);

M_{AL} = massa da toma liofilizada (g);

MS = percentagem de matéria seca da toma.

Os resultados expressos em mg/100g de músculo (peso húmido) foram utilizados no cálculo dos somatórios dos principais tipos e famílias de ácidos gordos e também no cálculo dos índices nutricionais.

Em virtude de a coluna capilar utilizada (Omegawax 320) fazer a coeluição dos ácidos gordos C22:6 ω 3 (docosahexaenóico - DHA) e C24:1 ω 9 (Nervónico) e para evitar sobrestimar-se o valor do DHA, selecionaram-se aleatoriamente algumas amostras para serem analisadas por espectrofotometria de massa a fim de se poder confirmar se estes dois ácidos gordos estavam presentes ou se o pico corresponderia apenas ao DHA. As amostras foram analisadas por GC/MS no laboratório de química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. O padrão utilizado foi o FAME MIX 37 da Supelco.

O equipamento utilizado foi um GC/MS (Bruker Scion 456), equipado com uma coluna BR-Swax de 30 x 0,25 mm x 0,25 μ m de espessura de filme, com um programa de temperatura de 120°C durante 5 minutos, seguido de uma rampa de 4°C/min até 240°C durante 10 minutos. O MS operou em modo de "Full scan" de 40-450 Da. A linha de transferência e fonte ambas as 220°C, a voltagem para acelerar os eletrões foi de 70 eV.

Tabela 4. Parâmetros programados no GC/MS

Parâmetros	Condições
Temperatura do injetor	250°C
Split	20mL/min
Temperatura inicial do forno	120°C
Temperatura final do forno	240°C
Rampa de temperatura	4°C/min
Fluxo de Hélio	1,2 mL/min
Tempo de corrida	45 min

Verificou-se que para todas as amostras analisadas o pico correspondia apenas ao DHA.

3.4.6. Determinação do teor de colesterol total

O conteúdo de colesterol presente do músculo foi determinado com base no método colorimétrico, baseado no princípio descrito por Röschlau *et al.* (1974). Para o método enzimático foi utilizado um *kit* (nº 10 139 050 035 da r-biopharm/Roche) que envolve três reações enzimáticas: i) o colesterol é oxidado em colesteno na reação catalisada pelo enzima colesterol oxidase + H₂O₂ II) na presença do enzima catalase o H₂O₂ reage com metanol dando formaldeído e água III) reação do formaldeído com acetilacetona formando um composto de coloração amarelada na presença de iões de amoníaco. Como controlo para o ensaio, utilizou-se uma solução de colesterol em 2-propanol fornecida pelo *kit*, que serve como controlo nas determinações enzimáticas do colesterol em alimentos. Leu-se a absorvância das amostras e dos padrões a 405 nm.

Após a extração dos lípidos totais (seção 3.4.5.) pesaram-se 100 mg de extrato lipídico para um tubo de 10 mL e adicionou-se 1 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio 2M. Foi a saponificar a 80°C durante 30 minutos em banho com agitação. A reação foi parada mediante a adição de 2 mL de água destilada. Deixou-se arrefecer

até 20-25°C, adicionou-se 2 mL de solução éter/éter de petróleo (1/1; v/v), procedeu-se a agitação vigorosa e deixou-se a separar as fases. 30 minutos após esta operação, desprezou-se a fase inferior correspondente à matéria saponificada e recolheu-se a fase de éter/éter de petróleo, a qual foi evaporada em corrente de azoto a 35°C. Adicionou-se 1 mL de 2-propanol a 20-25°C, procedeu-se a agitação e filtração. A solução límpida foi utilizada no ensaio.

Da solução obtida, pipetou-se 0,400 mL para um tubo de ensaio contendo 5 mL da solução 4 fornecida pelo kit (denominada Mistura de Reagente colesterol e que continha tampão fosfato de amónio; metanol; acetilacetona e o enzima catalase) de forma a ter-se o branco de ensaio. Posteriormente, pipetou-se 2,5 mL do tubo do branco para outro tubo de ensaio, ao qual se adicionou 0,020 mL da solução 3 fornecida pelo kit (colesterol oxidase).

Procedeu-se à mistura e os tubos de ensaio contendo o branco e a amostra foram a incubar em banho de água a 37-40°C durante 60 min. Deixou-se arrefecer até 20-25°C e leram-se as absorvâncias do branco e das amostras na mesma cuvete contra o ar (subtraiu-se a absorvância do branco à absorvância da amostra). Por fim calculou-se a concentração de colesterol de acordo com a equação:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

Na qual:

c = Concentração de colesterol (g/L amostra);

V = Volume final (mL);

v = Volume da amostra (mL);

MW = Peso molecular da substância a ser ensaiada (g/mol);

d = Comprimento da cuvete (cm);

ε = Coeficiente de extinção do corante-lutidina a 405 nm = 7.4 (l × mmol⁻¹ × cm⁻¹);

ΔA = Diferença entre a absorvância da amostra e a absorvância do branco.

Para o cálculo do conteúdo de colesterol presente nos lípidos do músculo (mg/100g) recorreu-se à seguinte equação:

$$\text{Colesterol mg/100g} = c \times \frac{100 \times 50}{W}$$

Na qual:

c = Concentração de colesterol (g/L amostra);

W = Peso da amostra (g).

3.5. Determinação dos parâmetros nutricionais

3.5.1. Índice polinsaturados/saturados

Para o cálculo da relação entre os ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos saturados utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\sum \text{PUFA}}{\sum \text{SFA}} = \frac{(C18:2\omega6 + C18:3\omega6 + C18:3\omega3 + C20:2\omega6 + C20:3\omega6 + C20:3\omega3 + C20:4\omega6 + C20:5\omega3 + C22:5\omega3)}{(C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + C13:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0)}$$

3.5.2. Índice $\omega3/\omega6$

Para calcular o índice $\omega3/\omega6$ utilizou-se a seguinte fórmula (Simopoulos, 2002b):

$$\frac{\omega3}{\omega6} = \frac{C18:3\omega3 + C20:3\omega3 + C20:5\omega3 + C22:5\omega3 + C22:6\omega3}{C18:2\omega6 + C18:3\omega6 + C20:2\omega6 + C20:3\omega6 + C20:4\omega6}$$

3.5.3. Índice de trombogénicidade

Para o cálculo do índice de trombogénicidade (IT) utilizou-se a seguinte expressão, baseada na fórmula proposta por Ulbricht & Southgate (1991):

$$IT = \frac{[14:0 + 16:0 + 18:0]}{[(0,5 \times \sum \text{MUFA}) + (0,5 \times \sum \text{PUFA}\omega6) + (3 \times \sum \text{PUFA}\omega3) + (\frac{\sum \text{PUFA}\omega3}{\sum \text{PUFA}\omega6})]}$$

Onde, Σ MUFA é o somatório dos ácidos gordos monoinsaturados; Σ PUFA ω 3 e Σ PUFA ω 6 representam o somatório dos ácidos gordos polinsaturados da família ω 3 e ω 6 respetivamente. Na fórmula apresentada apenas entram os ácidos gordos saturados de cadeia mais longa (i.e. cadeia superior a 14 carbonos) pois são estes os ácidos gordos que possuem propriedades trombogénicas. Os valores das constantes empíricas de 0,5 e 3 devem-se aos ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados da família ω 6 serem menos antitrombogénicos do que os da família ω 3 (Ulbricht & Southgate, 1991).

3.5.4. Índice de aterogenicidade

Para o cálculo do índice de aterogenicidade (IA) utilizou-se a seguinte expressão (fórmula proposta por Ulbricht & Southgate (1991)):

$$IA = \frac{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0]}{[\Sigma \text{MUFA} + \Sigma \text{PUFA}\omega 3 + \Sigma \text{PUFA}\omega 6]}$$

Nesta fórmula os autores atribuíram aos ácidos gordos C12:0 e C16:0 um fator de 1 e um fator de 4 ao C14:0, de modo a refletir os diferentes graus de aterogenicidade destes três ácidos. Os autores consideraram também que os ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados das famílias ω 3 e ω 6 são igualmente eficientes na redução da aterogenicidade.

3.5.5. Índice hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos

Para o cálculo da razão dos ácidos gordos hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos (h/H) utilizou-se a fórmula descrita por Santos-Silva *et al.* (2002):

$$h/H = \frac{[18:1\omega 9 + 18:2\omega 6 + 20:4\omega 6 + 18:3\omega 3 + 20:5\omega 3 + 22:5\omega 3 + 22:6\omega 3]}{[14:0 + 16:0]}$$

3.6. Análise estatística de dados

Para o tratamento estatístico dos dados procedeu-se à transformação dos mesmos sempre que necessário, de modo a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade.

Para se testar se os parâmetros biométricos (peso e comprimento total) e se os parâmetros químicos analisados (humidade, proteína, lípidos, energia, cinza, colesterol total, ácidos gordos) diferiam quer entre os animais das duas bacias quer entre géneros foi realizada uma análise de modelo geral linear vulgarmente designada nos programas estatísticos por GLM, a qual permitiu a análise de variância para as variáveis dependentes mediante o uso de dois fatores fixos: bacia hidrográfica e género. Deste modo, as variáveis utilizadas dividem a população em grupos e permite testar quer a hipótese nula (H_0 lampreias provenientes de bacias hidrográficas distintas apresentam a mesma caracterização química); sobre o efeito de qualquer das variáveis (bacia hidrográfica ou género) quer a respetiva interação, nas variáveis dependentes para os vários grupos a analisar. A correlação de Pearson foi utilizada para correlacionar as variáveis peso do corpo e comprimento total, os teores de humidade versus teores de lípidos totais do músculo e também os teores de colesterol versus teores de lípidos totais. O nível de significância (p-value) adoptado para os testes estatísticos efetuados foi de 0,05.

Para o tratamento de dados e análise estatística utilizou-se o pacote estatístico para Windows do programa "SPSS Statistics" versão 20.0 (IBM, E.U.A.).

4. Resultados e discussão

4.1. Parâmetros biométricos

Na tabela 5 encontram-se os dados biométricos dos indivíduos referentes às duas bacias hidrográficas analisadas.

Tabela 5. Parâmetros biométricos da lampreia-marinha das bacias hidrográficas do rio Guadiana e do rio Mondego:
Peso Total (PT), Comprimento Total (CT), Género e razão macho/fêmea (M/F).

GUADIANA (n=15)			MONDEGO (n=15)		
PT (g)	CT (cm)	Género	PT (g)	CT (cm)	Género
1072	82,5	M	1356	88,0	F
1232	81,5	F	1449	94,5	M
1376	91,0	M	1233	89,0	M
1658	95,5	M	1508	91,5	F
1360	87,0	F	1382	89,0	M
1404	86,0	F	1460	94,5	M
1245	82,5	F	1355	89,0	M
1390	90,0	M	953	79,0	F
920	76,5	M	1416	90,5	M
1005	80,5	M	1246	87,0	M
1048	81,0	F	1356	91,0	M
1023	82,0	F	1217	92,0	M
883	75,5	M	1368	92,0	M
1055	82,0	F	1073	81,0	M
1087	83,0	M	1668	96,0	F
Média ± desvio padrão		M/F	Média ± desvio padrão		M/F
1183,9 ± 217,9		83,8 ± 5,3	1,1	1336,0 ± 174,7	
				89,6 ± 4,7	
				2,8	

De acordo com a análise estatística realizada verifica-se que para os dados biométricos o fator Bacia ($p= 0.003$) exerceu um efeito significativo para o comprimento total ($p= 0.010$, $\eta^2= 75,8\%$) mas não para o peso do corpo ($p=0,051$) e o fator género não teve qualquer influência significativa nestes parâmetros ($p= 0.203$). O mesmo pode dizer-se para a interação bacia*género ($p=0,651$).

Para os indivíduos de ambas as bacias verificou-se uma correlação positiva e significativa ($p = 0,001$) entre o peso do corpo e o comprimento total (figuras 17 e 18).

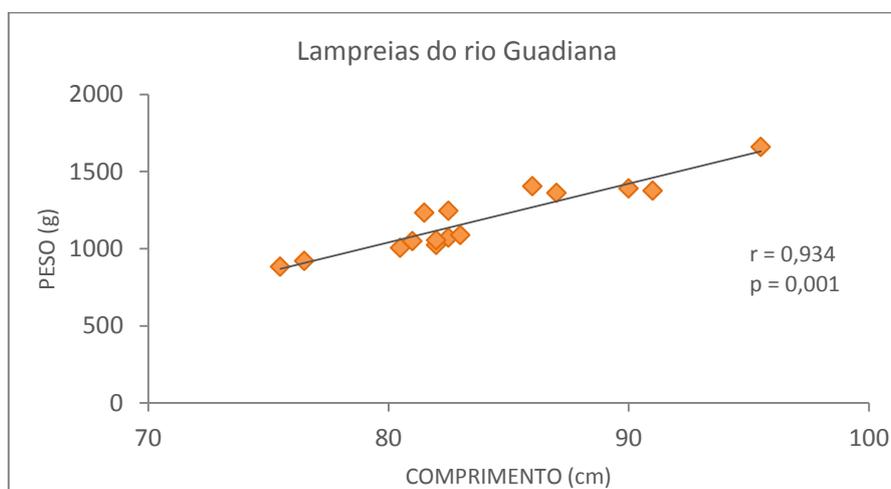


Figura 17 - Relação entre o comprimento e o peso dos animais do rio Guadiana

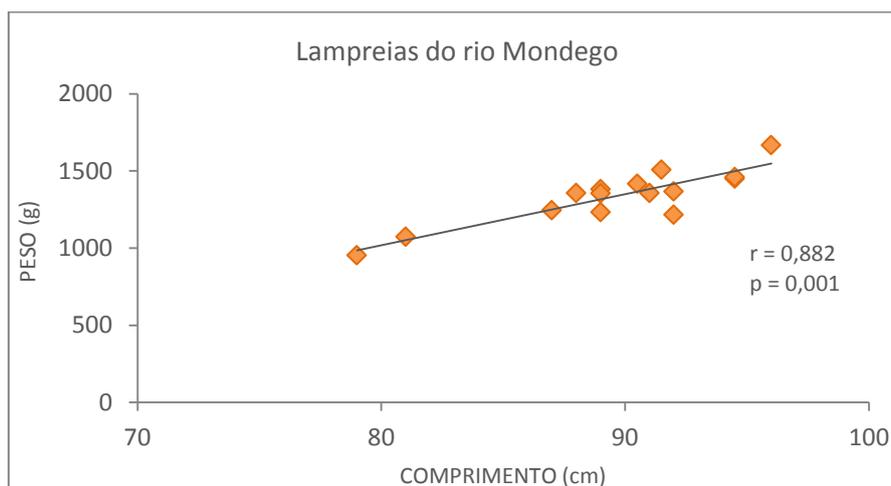


Figura 18 - Relação entre o comprimento e o peso dos animais do rio Mondego

Os valores de peso total não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,051$) entre os animais das duas bacias. Desta forma, pode afirmar-se que o peso médio obtido

para os 30 animais analisados foi de 1259,95g, sendo de destacar o peso mais elevado para um indivíduo do Mondego (1668g) e o valor mais baixo num espécime do Guadiana (883g). Estes resultados estão em concordância com os valores referidos por Duarte *et al.* (2003) e Machado (2010), os quais referem um peso médio entre os 1077 e os 1334g para lampreia-marinhas adultas na mesma fase do ciclo de vida.

Por outro lado no que respeita ao comprimento total, foram encontradas diferenças significativas ($p = 0.010$) entre as duas bacias, sendo os animais do Guadiana mais pequenos (83,8 cm) do que os animais do Mondego (89,6 cm). Estes valores são similares aos obtidos por Machado (2010) nas bacias do Guadiana (87,4 cm) e do Mondego (88,2 cm). O mesmo autor, baseado numa amostra de 152 animais escolhidos aleatoriamente de um total de 251 indivíduos, “agrupa” as lampreias provenientes das 8 bacias hidrográficas Portuguesas em 3 grupos consoante o seu comprimento. As lampreias do Mondego aparecem inseridas no primeiro grupo, que é o que apresenta as maiores dimensões em simultâneo com os animais dos rios Minho e Tejo. Os animais do Guadiana aparecem no segundo grupo, que apresenta valores intermédios em conjunto com os rios Cávado e Lima. O terceiro grupo possui os animais de menores dimensões provenientes dos rios Vouga e Douro. De um modo geral, o comprimento da lampreia-marinha nos rios Portugueses varia entre 70 cm e 105 cm, com um valor médio de 88 cm (Duarte *et al.*, 2003).

Devido à ausência de evidências do fenómeno de *homing* pela lampreia-marinha e ao seu modo de vida parasitário sujeito às deslocações levadas a cabo pelos hospedeiros, não é fácil definir justificações para as diferenças entre populações migratórias em distintas bacias hidrográficas (Araújo, 2011). No entanto parece haver uma relação entre o comprimento total dos indivíduos e a latitude dos rios onde realizam a sua migração reprodutiva, existindo uma tendência para os animais de maior dimensão serem usualmente encontrados em latitudes superiores (Beaulaton *et al.*, 2008).

O género, tal como anteriormente mencionado, não contribuiu com qualquer influência significativa ($p = 0.203$) nos parâmetros anteriormente analisados, à semelhança dos resultados referenciados no estudo de Beamish & Potter (1975).

4.2. Composição química do músculo de lampreia-marinha

Nas tabelas 6 e 7, assim como na figura 20, encontram-se apresentados os resultados obtidos para a composição química geral do músculo dos indivíduos das duas bacias (i.e., humidade, lípidos totais, proteína e cinza), teor de colesterol e valor energético do músculo (expressos em g/100 g de matéria seca, M.S.) considerando-se os hidratos de carbono como irrelevantes (Tocher, 2003; Afonso, 2009).

Tabela 6. Composição química por 100g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.

GUADIANA (n=15)					
% Humidade	Lípidos (g/100g)	Proteína* (g/100g)	Cinza (g/100g)	Colesterol (mg/100g)	Energia Bruta (Kcal/100g)
63,26	48,32	50,16	0,94	56,91	632,30
67,43	48,30	61,14	1,00	56,08	642,33
59,51	59,92	42,75	0,83	54,08	708,36
62,88	57,74	42,97	0,88	43,47	712,62
68,03	54,46	52,74	1,01	48,98	679,85
64,04	60,45	47,74	0,94	23,46	692,31
71,72	37,73	56,44	0,95	67,26	599,74
67,61	53,20	51,74	0,93	51,17	676,95
72,79	30,48	68,16	0,88	61,73	548,82
68,08	46,52	53,89	0,93	33,36	646,08
69,84	48,74	58,75	0,98	50,37	628,12
72,99	44,72	57,68	0,75	44,19	635,97
71,68	36,40	60,82	0,85	93,01	597,15
77,30	20,40	70,05	0,87	81,86	567,39
70,54	39,74	56,49	0,86	69,29	634,82

* Os dados referentes à Proteína (%) foram obtidos e cedidos por outros elementos do projeto, como tal, os métodos utilizados (AOAC, 1990) para a sua obtenção não se encontram desenvolvidos na presente dissertação.

Tabela 7. Composição química por 100g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Mondego.

MONDEGO (n=15)					
% Humidade	Lípidos (g/100g)	Proteína* (g/100g)	Cinza (g/100g)	Colesterol (mg/100g)	Energia Bruta (Kcal/100g)
68,63	55,72	47,42	0,99	56,35	695,39
58,09	58,96	41,42	0,80	60,71	739,85
62,57	51,97	41,62	0,91	74,90	703,27
51,67	56,90	44,08	0,71	69,24	726,94
66,51	55,31	43,99	0,92	22,84	735,18
56,40	62,83	43,04	0,81	57,33	754,58
63,50	52,18	48,66	0,82	45,79	712,47
65,13	45,25	51,47	0,93	71,26	675,06
57,95	54,62	41,43	0,87	64,98	730,77
61,07	53,34	44,33	0,87	66,19	735,36
65,08	56,02	48,51	0,92	75,53	724,24
61,09	73,26	40,58	0,85	66,12	745,57
60,74	56,57	42,50	0,82	69,72	855,02
64,09	48,66	44,09	0,86	45,82	674,37
57,65	50,29	44,66	0,77	45,05	722,22

* Os dados referentes à Proteína (%) foram obtidos e cedidos por outros elementos do projeto, como tal, os métodos utilizados (AOAC, 1990) para a sua obtenção não se encontram desenvolvidos na presente dissertação.

Verifica-se que o fator bacia exerceu um efeito significativo ($p = 0,006$) sobre a humidade ($p = 0,000$, $\eta^2 = 40,3\%$), lípidos totais ($p = 0,027$, $\eta^2 = 17,5\%$), energia bruta ($p = 0,000$, $\eta^2 = 44,3\%$) e proteína bruta ($p = 0,000$, $\eta^2 = 43,2\%$). Para os teores de cinza e de colesterol, não se verificou qualquer efeito significativo exercido pelo mesmo fator ($p = 0,067$, $p = 0,517$, respetivamente). O fator sexo e a interação bacia*sexo também não exerceram qualquer efeito significativo nestes parâmetros ($p = 0,353$ e $p = 0,827$ respetivamente). Mediante a análise estatística podemos concluir que as maiores diferenças encontradas no músculo dos animais das duas bacias

hidrográficas são devidas aos teores de energia bruta (eta = 44,3%), seguidas pelos teores de proteína bruta (eta = 43,2%) e pelos valores de humidade (eta = 40,3%).

Os valores de humidade presente no músculo dos indivíduos das duas bacias, oscilaram entre 51,7 e 77,3%, sendo o valor médio 68,5% para os animais do rio Guadiana e 61,3% para os indivíduos do rio Mondego.

Estes valores encontram-se de acordo com os resultados obtidos por Araújo (2011), em lampreias capturadas em diferentes troços do Rio Minho, 64,7% (junto à foz), 68,3% (35 km a montante) e 69,8% (65 km a montante).

Como referido a percentagem de lípidos totais do músculo também apresentou diferenças significativas ($p = 0,027$) entre os indivíduos das duas bacias, sendo os valores médios de 45,8 g/100g (Guadiana) e de 55,5 g/100g (Mondego).

Na maior parte das espécies de pescado, o teor de lípidos está inversamente relacionado com o teor de humidade presente no músculo (Huss, 1995; Osman *et al.*, 2001). No presente trabalho obteve-se uma correlação negativa e altamente significativa (figura 19) entre os teores de lípidos totais e humidade para os animais do Guadiana ($r = -0,876$). Todavia nos indivíduos do Mondego este resultado não se verificou. A correlação entre o teor de lípidos do músculo e o teor de humidade já tinha sido igualmente verificada por Lança *et al.* (2013).

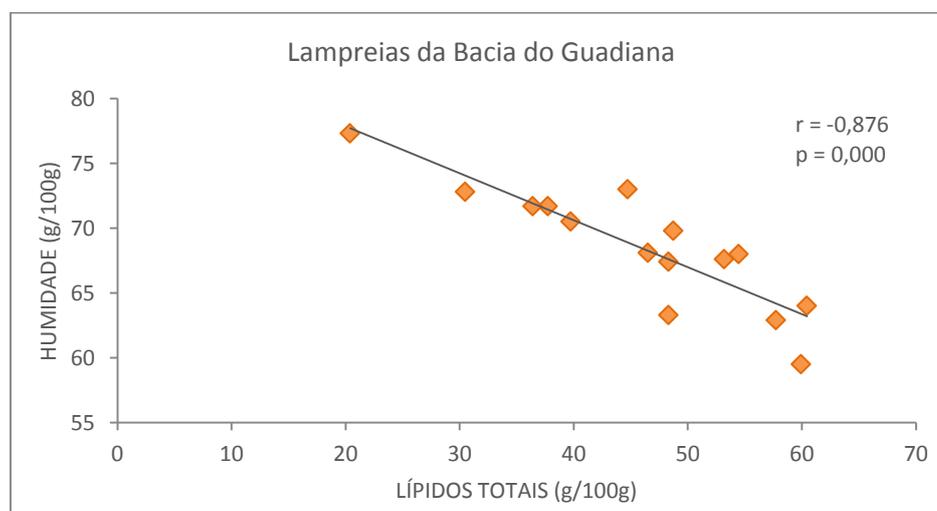


Figura 19 - Correlação negativa e significativa entre o teor de lípidos totais e o teor de humidade do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.

Relativamente aos teores de proteína, verificou-se que os valores obtidos para o músculo dos indivíduos das duas bacias foram significativamente diferentes ($p = 0,001$), com um valor médio de 55,44 g/100g nos animais do Guadiana e de 44,52 g/100g nos animais do Mondego.

Os teores de cinza não diferiram significativamente ($p = 0,067$) entre os indivíduos das duas bacias, caracterizando-se o músculo dos indivíduos do Guadiana por um valor médio de 0,91 g/100g e o músculo dos indivíduos do Mondego por 0,86 g/100g. Os valores encontrados são semelhantes aos valores obtidos por Araújo (2011) no ponto de amostragem junto à foz do rio Minho.

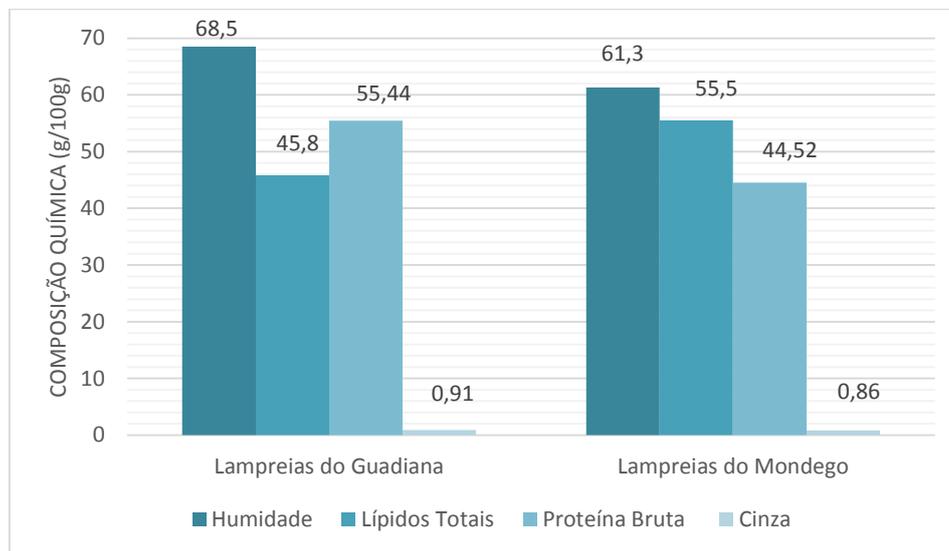


Figura 20 - Composição química média em g/100g de matéria seca de músculo dos animais das duas bacias hidrográficas em estudo.

Considerando que o tecido muscular dos peixes se caracteriza por quantidades diminutas de hidratos de carbono (Tocher, 2003), o valor energético que o pescado confere é fornecido principalmente pelo conteúdo em lípidos, seguido pelo teor em prótidos.

Tendo em consideração que no presente estudo houve diferenças significativas ($p = 0,001$) para o valor energético do músculo entre animais das duas bacias (i.e. uma média de 640,19 kcal/100g de músculo para o Guadiana e uma média de 728,69 kcal/100g de músculo para o Mondego), estas diferenças são atribuídas aos diferentes

teores de lípidos do músculo (figura 20), o que é confirmado pela existência de uma correlação positiva e altamente significativa (figura 21) entre o teor de lípidos totais e a energia bruta do músculo dos animais do Guadiana. Relativamente aos animais do Mondego, também se verificou uma tendência para uma correlação positiva entre os dois teores referidos, no entanto esta não foi estatisticamente significativa.

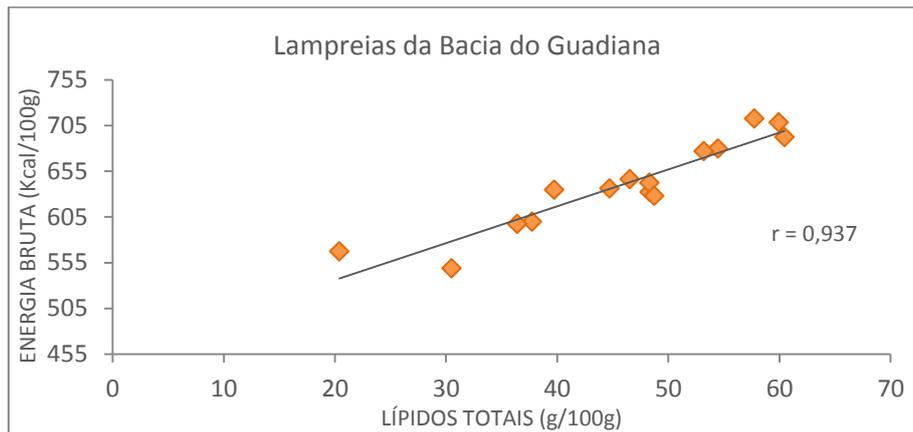


Figura 21 - Correlação positiva e significativa entre o teor de lípidos totais e o teor de energia bruta do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.

Os teores de colesterol do músculo dos animais de ambas as bacias hidrográficas em estudo não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,517$), possuindo um valor médio, de 55,68 mg/100 g para os animais do Guadiana e de 59,46 mg/100 g para os animais do Mondego. O valor médio obtido para os 30 animais analisados foi de 57,12 mg/100g de músculo. Para as lampreias do Guadiana verificou-se uma correlação significativa negativa (figura 22) entre o teor de colesterol e o teor de lípidos totais.

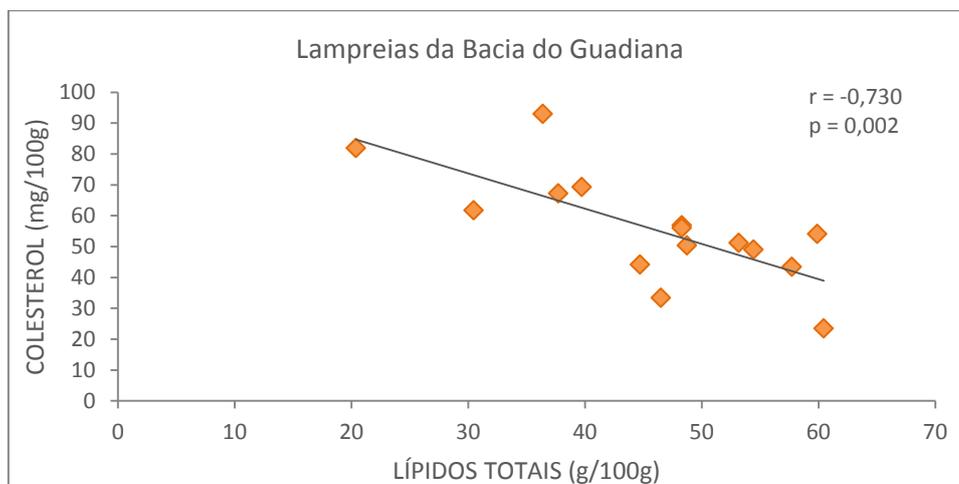


Figura 22 - Correlação negativa e significativa entre o teor colesterol e o teor de lípidos totais do músculo (M.S.) de lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Guadiana.

4.2.1. Perfil de ácidos gordos do músculo

O perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo dos animais das bacias hidrográficas analisadas encontra-se na tabela 8.

Tabela 8. Perfil em ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) do músculo de lampreia-marinha das bacias hidrográficas dos rios Guadiana e Mondego.

SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos moninsaturados; HUFA – ácidos gordos altamente insaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.

Ácidos Gordos	Guadiana (n=15)	Mondego (n=15)
C6:0	0,15 \pm 0,01	0,011 \pm 0,005
C8:0	0,008 \pm 0,008	0,007 \pm 0,004
C10:0	0,03 \pm 0,01	0,025 \pm 0,002
C12:0	2,55 \pm 0,27	1,98 \pm 0,33
C13:0	0,18 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03
C14:0	17,80 \pm 1,60	16,79 \pm 1,13
C15:0	0,08 \pm 0,04	0,07 \pm 0,08
C16:0	14,61 \pm 2,00	16,51 \pm 1,59
C17:0	0,03 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02
C18:0	2,47 \pm 0,84	2,29 \pm 0,020
C20:0	0,23 \pm 0,11	0,14 \pm 0,04
C22:0	0,11 \pm 0,17	0,10 \pm 0,07
Σ SFA	38,25	38,24
C14:1	1,16 \pm 0,35	0,93 \pm 0,25
C16:1 ω 7	36,37 \pm 7,84	39,09 \pm 1,55
C17:1	0,15 \pm 0,04	0,14 \pm 0,09
C18:1 ω 9	15,92 \pm 1,88	17,01 \pm 1,19
C20:1 ω 9	0,44 \pm 0,21	0,29 \pm 0,07
C22:1 ω 9	0,19 \pm 0,15	0,06 \pm 0,03
Σ MUFA	54,23	57,52
C18:2 ω 6	0,25 \pm 0,10	0,18 \pm 0,03
C18:3 ω 6	0,03 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
C18:3 ω 3	0,10 \pm 0,06	0,06 \pm 0,02
C20:2 ω 6	0,08 \pm 0,05	0,03 \pm 0,02
C20:3 ω 6	0,20 \pm 0,11	0,08 \pm 0,05
C20:3 ω 3	1,06 \pm 0,60	0,51 \pm 0,06
C20:4 ω 6	0,13 \pm 0,10	0,04 \pm 0,03
C20:5 ω 3	1,57 \pm 1,04	1,20 \pm 0,18
C22:5 ω 3	1,47 \pm 0,75	0,88 \pm 0,14
C22:6 ω 3	2,84 \pm 1,70	1,42 \pm 0,38
Σ PUFA	7,73	4,42
$\Sigma \omega$ 3	7,04	4,07
$\Sigma \omega$ 6	0,69	0,35

O fator bacia exerceu um efeito significativo no perfil lipídico ($p=0,017$) do músculo das lampreias analisadas. No que se refere ao fator género, este não apresentou qualquer influência significativa ($p=0,112$), assim como a interação bacia*género ($p=0,727$). Foram encontradas diferenças no total de ácidos gordos $\omega 3$ ($p= 0,007$ e $\eta^2= 24,6\%$), no total de $\omega 6$ ($p=0,001$ e $\eta^2= 32,9\%$), no total de MUFAs ($p= 0,044$ e $\eta^2= 14,7\%$), no total de PUFA's ($p=0,005$ $\eta^2=27,1\%$). Em contrapartida, o total de SFA's não apresentou diferenças significativas entre os animais das duas bacias ($p = 0,707$ e $p = 0,327$, respetivamente).

Com base na análise estatística realizada para o perfil de ácidos gordos, pode afirmar-se que as maiores diferenças entre bacias estão principalmente relacionadas com o total de ácidos gordos $\omega 6$ ($\eta^2 = 32,9\%$) e o total de PUFA's ($\eta^2 = 27,1\%$). Para todos os parâmetros analisados verificou-se que os animais do Guadiana tinham valores significativamente superiores de total de $\omega 3$, total de $\omega 6$, total de PUFA's relativamente aos animais do Mondego com exceção para o total de MUFAs que apresentaram valores superiores nos animais do Mondego.

Através da análise da tabela 8 é possível verificar que as lampreias de ambas as bacias hidrográficas apresentaram percentagens médias mais elevadas de ácidos gordos insaturados do que de ácidos gordos saturados, verificando-se uma predominância dos ácidos gordos monoinsaturados (55,9%) relativamente aos ácidos gordos saturados (38,3%) e ácidos gordos poliinsaturados (6,1%). Estas proporções encontram-se de acordo com os valores obtidos por Lança *et al.* (2011) em lampreia-marinha no início da migração reprodutora, provenientes de 4 bacias hidrográficas portuguesas. Esta distribuição do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo é característica para diversos peixes gordos e comprova que a maioria das espécies de peixe acumula reservas lipídicas compostas maioritariamente por SFA e MUFA (Kozlova & Klotimchenko, 2000; Pinela *et al.* 2009).

Analisando os ácidos gordos saturados, verifica-se que não apresenta grandes variações entre as duas bacias. Para os animais de ambas as regiões em estudo, o ácido mirístico (C14:0) foi o mais abundante seguido do ácido palmítico (C16:0).

Também em destaque, embora em percentagens claramente mais reduzidas do que os ácidos referidos anteriormente, encontram-se os ácidos láurico (C12:0) e esteárico (C18:0). Os restantes ácidos gordos saturados encontram-se em pequenas percentagens, para ambas as bacias.

É frequente existirem valores elevados de C16:0 na medida em que este ácido gordo é uma fonte potencial de energia metabólica, muito utilizado durante as migrações e no desenvolvimento das gónadas das fêmeas (Henderson *et al.*, 1984).

Relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados dos lípidos totais do músculo, foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,044$) entre as duas bacias, sendo que os animais do Mondego apresentaram o teor mais elevado (57,52%). Em ambas as bacias o ácido predominante foi o C16:1 ω 7, seguido pelo C18:1 ω 9 (representando respetivamente, 67,07% e 29,36% do total de MUFAs no Guadiana e 67,96% e 29,57% do total de MUFAs no Mondego).

Os valores elevados de C18:1 ω 9, à semelhança dos ácidos saturados com teor mais elevado, justificam-se por constituírem uma fonte de energia metabólica para os peixes migradores, sobretudo durante o período de desenvolvimento das gónadas (Henderson *et al.*, 1984), sendo o ácido oleico monoénico predominante nos lípidos de diversas espécies de peixes marinhos, correspondendo usualmente a 60 a 75 % do total de MUFAs (Özogul *et al.*, 2007).

No que respeita aos ácidos gordos polinsaturados dos lípidos totais do músculo, verificaram-se diferenças significativas ($p = 0,005$) entre as duas bacias em estudo, concretamente para os níveis totais de PUFAs, total de ácidos gordos da família ω 3 e total de ácidos gordos da família ω 6, os quais apresentaram-se significativamente maiores nos animais do Guadiana, tal como já referido anteriormente (figura 23).

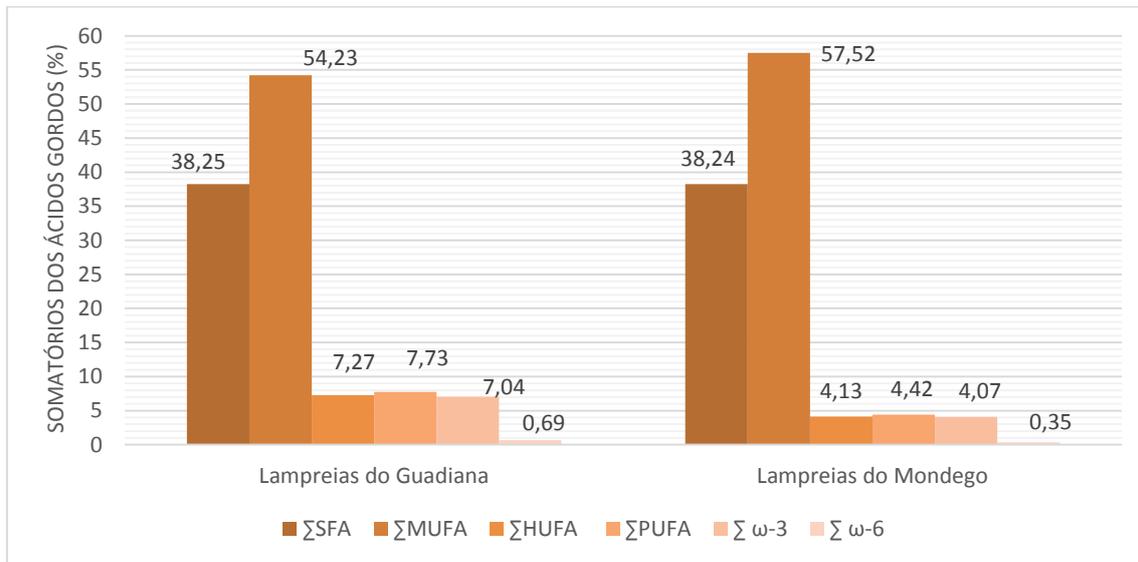


Figura 23 - Percentagens dos somatórios dos principais ácidos gordos presentes no músculo (M.S.) das lampreias das duas bacias hidrográficas em estudo.

Os PUFAs predominantes no músculo das lampreias estudadas pertencem à família $\omega 3$ e que representam 91,07% do total de PUFAs nos animais do Guadiana e 92,08% do total de PUFAs nos animais do Mondego. Os ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) são os dominantes, representando respetivamente 40,34% e 22,3% do total de $\omega 3$ nos animais do Guadiana e 34,89% e 29,48% do total de $\omega 3$ nos animais do Mondego. A predominância de DHA em relação ao EPA no músculo de lampreia-marinha nesta fase do ciclo de vida tem sido descrita por diversos autores como Pinela *et al.* (2009), Lança *et al.* (2011) e Lança *et al.* (2013) e verificada em diversas espécies de peixes tal como referido nos trabalhos de Özogul *et al.* (2007), Afonso (2009), Özogul *et al.* (2011) e Prato & Biandolino (2012). É de esperar porções elevadas de EPA e DHA, uma vez que estes ácidos encontram-se envolvidos tanto no crescimento e desenvolvimento, incluindo a reprodução, como também na estrutura e função das membranas celulares dos peixes (Cejas *et al.*, 2004). As percentagens superiores de DHA em relação às de EPA poderão ser devidas a uma possível oxidação seletiva de EPA pelos músculos natatórios à semelhança do que acontece com os ácidos gordos saturados e monoinsaturados, levando a uma retenção seletiva de DHA (Tocher, 2003).

No presente estudo, à semelhança do que sucede com algumas espécies de peixe (Afonso, 2009), verificou-se uma correlação negativa entre os teores de DHA e os teores de lípidos totais presentes no músculo. A correlação foi significativa para os animais da bacia hidrográfica do Guadiana ($r = -0,785$; $p = 0,001$) e do Mondego ($r = -0,575$; $p = 0,025$). Esta correlação comprova que apesar dos animais estarem a consumir lípidos durante a migração reprodutiva, estão a preservar DHA, que desempenha funções ao nível das gonadas e no desenvolvimento da futura descendência (Tocher, 2003).

Em relação aos ácidos gordos da família $\omega 6$, o mais abundante no perfil do músculo em ambas as bacias, foi o ácido linoleico (LA, C18:2 $\omega 6$), perfazendo 3,23 e 2,33% do total de PUFA, para os animais do Guadiana e do Mondego respetivamente. As percentagens obtidas de LA foram semelhantes aos valores obtidos por Pinela *et al.* (2009), Lança *et al.* (2011) e Lança *et al.* (2013) no músculo de lampreia-marinha de diversas bacias hidrográficas portuguesas.

4.3. Composição nutricional da parte edível

Considerando que os animais analisados foram capturadas no início da migração reprodutiva, o músculo destes animais apresenta um elevado teor de lípidos, composto por um teor elevado em ácidos gordos insaturados. Estes lípidos, sobretudo os ácidos gordos insaturados, quando expostos a diversos fatores, nomeadamente o aumento da temperatura, catalisadores orgânicos férricos (hemoglobina) e enzimas lipolíticas, tornam-se muito suscetíveis e perecíveis aos processos de oxidação (Huss, 1997; Geada, 2012). O teste de TBA é utilizado usualmente na análise da oxidação lipídica dos alimentos ao longo do período de armazenamento, o que não sucede no caso da lampreia-marinha, visto que estes animais são consumidos no próprio dia em que são abatidos. No entanto, pelos motivos referidos anteriormente realizou-se este teste para avaliar o estado de oxidação lipídica do músculo de lampreia marinha em fresco. O teor médio de aldeído malónico obtido nos animais analisados foi de 4,34 ($\pm 1,53$) mg/1000g de músculo.

Günsen *et al.* (2011) indica que o teor de malonaldeído para um produto de boa qualidade não deve ser superior a 5 mg/1000 g. Considerando o valor estipulado por estes autores, o músculo fresco das lampreias de ambas as regiões hidrográficas pode ser considerado de boa qualidade alimentar do ponto de vista da estabilidade lipídica.

Os resultados obtidos para a composição nutricional (humidade, lípidos, proteína e cinza) e para o valor energético da parte edível dos animais estudados encontram-se apresentados na tabela 9. Na mesma tabela encontra-se indicada a composição nutricional da parte edível de algumas espécies de pescado vulgarmente consumidas em Portugal, de modo a permitir uma comparação entre estas e a lampreia-marinha. Por convenção, os laboratórios quando analisam a parte edível do pescado expressam os resultados em peso húmido. Desta forma e, atendendo a que o teor de humidade presente no músculo de lampreia-marinha foi similar ao intervalo de humidade presente na tabela seguinte para várias espécies consumidas em Portugal, torna-se lícito proceder à comparação dos nossos resultados com os descritos na literatura.

Tabela 9. Composição nutricional aproximada da parte edível de lampreia-marinha e de algumas espécies de peixes gordos e semi-gordos, descritas na “Tabela da Composição de Alimentos” do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (valores divulgados pelo INSA, 2006).

Espécie	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinza (%)	Valor Energético (Kcal/100g)	Referência
Lampreia-marinha	64,9	18,2	17,1	0,9	243	Presente estudo
Cavala	64,3	13,4	20,3	1,40	202	Bandarra <i>et al.</i> , 2004
Dourada	68,9	9,8	19,7	1,40	167	
Salmão	60,5	21,9	16,2	1,30	262	
Sardinha	63,4	16,4	18,4	1,70	221	
Enguia	57,4	27,7	13,4	1,20	303	
Atum	68,7	4,9	24,1	1,50	140	

Em traços gerais, os resultados obtidos estão em concordância com os referidos para as espécies gordas de pescado (Bandarra *et al.*, 2004).

Com base nos resultados obtidos e segundo a classificação proposta por Ackman (1989), podemos considerar a lampreia-marinha, nesta fase do seu ciclo de vida, na

categoria dos peixes muito gordos, ou seja, com um teor de lípidos superior a 8% do peso do corpo (tabela 9).

No que diz respeito aos lípidos, os resultados obtidos eram esperados na medida em que é no músculo que a lampreia-marinha acumula grande quantidade de lípidos durante a fase marinha do seu ciclo de vida. Considerando que os animais capturados se encontravam no início da época de migração reprodutiva (Fevereiro e Março), é normal apresentarem as reservas lipídicas elevadas já que as mesmas atuam como fonte primária de energia durante a migração reprodutiva e são fundamentais para o desenvolvimento das gónadas e da descendência (Sheridan 1988, Bird *et al.* 1993).

De acordo com Nunes *et al.* (2003) o teor de colesterol na maioria dos produtos de pesca marinhos é pouco significativo, sobretudo ao nível dos peixes. No mesmo estudo os autores obtiveram valores entre as 20 e as 85mg/100g para algumas das espécies de peixe consumidas em Portugal. Na tabela 10 encontra-se o teor de colesterol correspondente ao músculo de lampreia-marinha ($20,1 \pm 6,3$ mg/100g de parte edível) e em algumas das espécies de peixes gordos, meio gordos, pouco gordos e magros mais consumidos.

Tabela 10. Teor de colesterol por parte edível de lampreia-marinha e de algumas espécies de peixes vulgarmente consumidos em Portugal (valores divulgados pelo INSA, 2006).

Espécie	Colesterol (mg/100g)	Referência
Lampreia-marinha	20	Presente estudo
Atum*	30	Bandarra <i>et al.</i> , 2004
Cavala*	45	
Carapau**	36	
Corvina**	50	
Dourada*	51	
Enguia*	26	
Linguado**	44	
Peixe-espada-preto**	24	
Pescada Europeia**	19	
Salmão*	40	
Sardinha*	20	
Tamboril**	42	

* Espécies gordas e meio gordas de pescado.

** Espécies magras e pouco gordas de pescado.

Pela análise da tabela 10, podemos verificar que os valores de colesterol que a lampreia-marinha apresentou são inferiores à maioria dos teores apresentados por diversas espécies de peixes presentes na dieta dos Portugueses. A título de comparação, os valores que mais se aproximam com os resultados obtidos no presente trabalho são o da Pescada Europeia e o da Sardinha (consumo recomendado pela “Fundação Portuguesa e Cardiologia”), com 19 e 20 mg/100g respetivamente.

Muitas vezes os consumidores associam que alimentos com teores de lípidos (gordura) elevados possuem também elevados teores de colesterol (Oehlenschläger, 2000). No entanto, vários autores (Mathew *et al.*, 1999; Oehlenschläger, 2000; Osman *et al.*, 2001) à semelhança do que encontramos no presente estudo com a lampreia-marinha, não verificaram nenhuma correlação positiva entre o teor de colesterol e o teor de lípidos do pescado. Oehlenschläger (2000) indica também a existência de uma correlação linear negativa entre o teor de lípidos e o teor de colesterol no músculo de

espécies gordas de peixe. O autor atribui esta correlação ao facto de o colesterol ser um constituinte das membranas celulares do tecido muscular e deste esteroide não se acumular ao nível do tecido adiposo do peixe.

4.3.1. Caracterização nutricional do perfil lipídico

Do ponto de vista nutricional, o consumo de pescado é amplamente recomendado por diversas autoridades, fundações e associações da saúde (European Food Safety Authority, 2004; Fundação Portuguesa de Cardiologia, s.d.; European Society of Cardiology, s.d.; American Heart Association, s.d.) por ser uma fonte benéfica de ácidos gordos da família $\omega 3$.

Para a caracterização nutricional do perfil lipídico do músculo de lampreia-marinha foram determinados e analisados diversos índices apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Índices nutricionais associados aos lípidos da parte edível da lampreia-marinha: Razão entre ácidos gordos polinsaturados e ácidos gordos saturados, Razão entre as famílias de ácidos gordos $\omega 3$ e $\omega 6$, Índice de Trombogenicidade, Índice de Aterogenicidade e Índice hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos.

Índices Nutricionais	Lampreia-marinha (n=30)
Polinsaturados/Saturados	0,15
Índice de hipocolesterolémicos/hipercolesterolémicos	0,63
$\omega 3/\omega 6$	11,15
Índice de Trombogenicidade	0,81
Índice de Aterogenicidade	1,46

O índice resultante da razão entre o somatório dos ácidos gordos polinsaturados e somatório dos ácidos gordos saturados é bastante utilizado para avaliar a qualidade nutricional do perfil lipídico, sendo a razão mínima recomendada para uma dieta equilibrada 0,45 (Department of Health, 1994). Este valor é superior ao encontrado na parte edível das lampreias em estudo. Os resultados obtidos são muito inferiores aos valores usualmente obtidos em espécies de peixes marinhos, que oscilam em média entre 0,64 e 1.92 (Özogul *et al.*, 2011).

Uma razão polinsaturados/saturados com valor reduzido pode estar associada a um aumento dos níveis de colesterol, pelo que se estima que uma razão inferior a 0,45 seja pouco recomendada para o consumidor (Department of Health, 1994; Santos-Silva *et al.*, 2002). Contudo deve salientar-se que no cálculo desta *razão* apenas se tem em consideração a estrutura química dos ácidos gordos, considerando que todos os ácidos saturados induzem o aumento de colesterol e menosprezando os efeitos dos ácidos gordos monoinsaturados, com destaque para o ácido oleico (Santos-Silva *et al.*, 2002).

Em virtude do exposto anteriormente, muitos autores preferem a utilização de índices baseados nos efeitos funcionais dos ácidos gordos, como por exemplo a razão hipocolesterolemico/hipercolesterolemico. Neste índice é feita a razão entre o valor nutricional dos ácidos gordos com propriedades hipocolesterolémicas e o valor nutricional dos ácidos gordos com propriedades hipercolesterolémicas, assumindo-se que quanto mais elevado seja o valor do índice, menor risco de desenvolvimento de colesterolémia (Santos-silva *et al.*, 2002).

Os valores obtidos são inferiores aos valores usualmente encontrados em algumas espécies de pescado. Afonso (2009) obteve valores entre 1,14 e 2,82 para espécies magras de pescado, como o Areeiro (*Lepidorhombus whiffiagonis*), a pescada europeia (*Merluccius merluccius*) e o peixe-espada-preto (*Aphanopus carbo*). Num estudo realizado por Martelli *et al.* (2013) em corvina-legítima (*Argyrosomus regius*), obteve-se um índice igualmente superior, variando em média entre os 2,42 e o 2,64.

Embora não exista na literatura um valor de referência para esta razão, o facto de ter sido obtido um valor muito inferior aos mencionados para outras espécies leva a concluir que o músculo de lampreia-marinha caracteriza-se pela predominância dos ácidos gordos com carácter hipercolesterolémico.

O cálculo da razão entre os somatórios dos ácidos gordos da família $\omega 3$ e família $\omega 6$ é igualmente muito utilizado para avaliar o valor nutricional dos lípidos presentes nos alimentos (Simopoulos, 2006). A importância desta razão encontra-se relacionada com o facto de as dietas das sociedades ocidentais modernas apresentarem um consumo

deficiente de ácidos gordos da família $\omega 3$ e um consumo excessivo da família $\omega 6$ (Simopoulos, 1999b,c). Esta razão situa-se na ordem dos 1 ($\omega 3$) : 15 ($\omega 6$), valor muito diferente do encontrado na dieta original do ser humano e para a qual os seus padrões genéticos foram estabelecidos, a qual se caracterizava por um valor na ordem de 1 ($\omega 3$) : 1 ($\omega 6$). Uma razão $\omega 3/\omega 6$ muito reduzida está associada à génese de diversas doenças, tais como cardiovasculares, cancro, inflamatórias e autoimunes (Simopoulos 2006; Simopoulos, 2008).

No presente trabalho a razão $\omega 3/\omega 6$ presente na parte edível foi bastante superior ao valor mínimo recomendado de 0,25, com um valor médio de 11,15. Estes valores demonstram uma predominância da família $\omega 3$, sobretudo de EPA e DHA, relativamente aos ácidos gordos da família $\omega 6$. Este resultado vem confirmar que a carne de lampreia-marinha apresenta uma riqueza inerente em ácidos gordos $\omega 3$, os quais resultam dos hospedeiros das quais se alimenta durante a sua fase oceânica e que poderá ser importante na dieta dos portugueses enquanto fonte de EPA e DHA.

Os resultados obtidos foram superiores aos constatados por Lança *et al.* (2013), e encontra-se dentro do intervalo de valores usualmente referenciados para espécies marinhas, oscilando entre 4,7 e 14,4 (Henderson & Tocher, 1987; Steffens, 1997; Parrish, 2009).

Em relação aos índices de trombogenicidade e de aterogenicidade, considera-se que quanto menor for o valor de ambos os índices, de maior qualidade será a fração lipídica do alimento (Ulbricht & Southgate, 1991). No caso do primeiro, é tido em consideração o efeito individual de cada ácido e não de uma família de ácidos gordos, relacionando os teores dos ácidos saturados C14:0, C16:0 e C18:0 (i.e. os ácidos gordos pró-trombóticos) com os teores de ácidos monoinsaturados e polinsaturados com propriedades anti-trombóticas. Relativamente ao índice de aterogenicidade, este entra em linha de conta com o efeito que os ácidos gordos exercem no colesterol plasmático ao nível da formação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e/ou lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Senso *et al.*, 2007).

Os valores do índice de trombogenicidade em pescado, vulgarmente consumido em Portugal, variam usualmente entre 0,21 no peixe-espada branco (*Lepidopus caudatus*) e 0,51 na pescada europeia (*Merluccius merluccius*) (Afonso, 2009). O índice obtido na lampreia-marinha está próximo destes valores, sendo o valor médio para os 30 animais em estudo de 0,81, o que sugere uma boa qualidade da fração lipídica, do ponto de vista anti trombótico.

Relativamente ao valor do índice de aterogenicidade obtido na lampreia-marinha (1,46), este foi superior aos valores vulgarmente encontrados em diversas espécies de peixes marinhos, como por exemplo 0,29 na dourada, 0,45 no robalo e 0,55 no bacalhau (Rueda *et al.*, 2001; Valfré *et al.*, 2003; Senso *et al.*, 2007). No entanto, são semelhantes aos IA de algumas espécies como a anchova (1,35) e inferiores aos da raia-lenga (2,37) (Valfré *et al.*, 2003; Turan *et al.*, 2007).

Os valores obtidos não são de surpreender na medida em que no nosso país a lampreia-marinha é sempre capturada para consumo na época em que realiza a migração reprodutiva. Nesta fase do ciclo de vida existe uma mobilização muito grande de ácidos gordos da família ω -3 para as gónadas pois estes desempenham funções essenciais quer no desenvolvimento das gónadas quer na descendência. Desta forma, o músculo é caracterizado por ácidos gordos que desempenham outras funções, nomeadamente enquanto fornecedores de energia para a natação e para o esforço de migração reprodutiva, de destacar o C18:1 ω 9, C18:0 e C16:0 (Tocher, 2003). Atendendo a que os animais foram capturados no início da migração reprodutiva e próximo do estuário, não é de surpreender que o perfil de ácidos gordos encontrado, onde a percentagem de C18:1 ω 9, C18:0, C16:0 e também de C14:0 é muito expressiva, tenha vindo a condicionar o resultado dos índices anteriormente calculados.

Se apenas considerarmos os valores referentes ao pescado indicados pela literatura, pode dizer-se que a carne de lampreia-marinha apresenta elevado índice aterogénico, todavia é importante salientar mais uma vez que não existem valores recomendados para este índice e assim sendo não se pode inferir que estes valores estejam associados a riscos acrescidos para a saúde.

4.3.2. Qualidade nutricional do perfil lipídico

Este ponto surge com o objetivo de fornecer uma informação nutricional do perfil lipídico da parte edível da lampreia-marinha das bacias do Guadiana e do Mondego. Deste modo, é apresentado na tabela 12 a composição em g/100g de parte edível e dos principais componentes lipídicos, de forma a possibilitar a comparação dos valores obtidos com os valores diários de referência (VDRs).

Tabela 12. Percentagem do VDR (valor diário de referência) de energia, lípidos, colesterol e EPA+DHA por 100g de parte edível de lampreia-marinha (média \pm desvio padrão).

	Por 100g	VDR	Em % VDR
Energia	242,8 \pm 57,5 Kcal	2000 Kcal*	12,1 \pm 2,9 %
Lípidos	18,2 \pm 5,8 g	70 g*	26 \pm 8,3 %
Colesterol	20,1 \pm 6,3 mg	300 mg**	6,7 \pm 2,1 %
EPA+DHA	62,3 \pm 19,0 mg	650 mg***	9,6 \pm 2,9 %

* Valores diários de referência propostos pela SCF/EC (2003).

** Valor diário de referência indicado pela European Society of Cardiology (s.d.).

*** Valor diário de referência proposto por Simopoulos *et al.* (1999) e pela ISSFAL (s.d.) para uma dieta de 2000 Kcal/dia.

Considerando que um ser humano adulto e saudável deverá ingerir uma dieta diária com um valor energético de 2000 Kcal (Simopoulos *et al.*, 1999), pode constatar-se que uma porção de 100g de carne de lampreia-marinha, não apresenta valores significativamente elevados (12,1%). Todavia convém salientar que uma dose individual servida num restaurante poderá incluir mais do dobro desta quantidade (Araújo, 2011). Considerando que as porções usualmente consumidas de pescado são em média 160 g (Afonso, 2009), uma refeição de lampreia-marinha conterá em média 388,48 Kcal fornecidos apenas pela carne de lampreia, excluindo o valor energético proveniente dos alimentos servidos como acompanhamento. Este valor corresponde a 19,36% do VDR para a energia, e tendo em conta que durante a época de pesca da lampreia-marinha, as famílias dos pescadores locais podem consumir este ciclóstomo 2 a 3 vezes por semana (Suissas, 2010), o aporte energético fornecido pelo consumo de lampreia-marinha pode ser bastante significativo. Por último, este facto associado ao

teor de lípidos fornecidos, alcançando 41,6% do VDR poderá ser significativo na dieta, podendo o valor diário considerado saudável para um ser humano adulto ser facilmente ultrapassado em épocas em que o consumo deste ciclóstomo é uma prática recorrente.

Segundo a American Heart Association (s.d.), IOM (2005) e a European Society of Cardiology (s.d.) é considerado adequado em termos de colesterol uma dieta que não exceda os 300 mg/dia. Considerando os resultados obtidos e tendo em conta as porções usualmente consumidas de 160 g, uma porção de músculo de lampreia-marinha contém em média 32,1 mg/100g, valor que corresponde a 10,7 % do valor diário recomendado, podendo concluir-se que não representa uma contribuição significativa na dieta dos consumidores.

No que diz respeito aos ácidos gordos, os teores de EPA e DHA fornecidos por parte edível de lampreia-marinha são muito inferiores comparativamente ao recomendado para a prevenção de doenças cardiovasculares, com valores de EPA e DHA da ordem dos 650 mg/dia (Simopoulos *et al.*, 1999). Se considerarmos novamente uma porção média de 160g por refeição, os valores destes ácidos gordos fornecidos pela lampreia-marinha como alimento seriam de 15,4 %, o que continua a ser um valor pouco representativo relativamente ao respetivo valor diário de referência. Estes teores diferem dos valores usualmente encontrados em pescado. No estudo realizado por Afonso (2009) em algumas espécies magras de pescado, os valores da soma dos ácidos gordos EPA e DHA variaram entre 84 e 431 mg/100g de parte edível.

5. Conclusão

A análise da composição química do músculo de lampreia-marinha capturada no início da migração reprodutora revelou que os indivíduos da bacia do Guadiana são distintos dos provenientes da bacia do Mondego.

O músculo dos animais do Guadiana revelou teores significativamente superiores de proteína bruta e humidade face aos animais do Mondego, os quais registaram valores significativamente superiores de lípidos totais e energia bruta.

No que diz respeito ao perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha, verificou-se que este se caracteriza por uma predominância dos ácidos gordos monoinsaturados relativamente aos saturados e polinsaturados. Os indivíduos do Guadiana apresentaram valores significativamente superiores de ácidos gordos das famílias ω -3 e ω -6.

No que concerne à qualidade nutricional lipídica da parte edível, a lampreia-marinha exibiu valores que a aproximam de algumas espécies gordas de pescado com destaque para o elevado teor lipídico e energético. É importante realçar que o teor de colesterol se apresentou semelhante ao descrito para diversas espécies de pescado.

Da análise dos índices nutricionais, pode afirmar-se que a carne de lampreia-marinha se caracteriza por uma relação polinsaturados/saturados inferior ao recomendado; uma razão hipocolesterolémico/hipercolesterolémico reduzido; um índice de aterogenicidade elevado face ao que se encontra usualmente descrito para algumas espécies de pescado. Em contrapartida, apresentou uma relação ω 3/ ω 6 bastante superior ao valor mínimo recomendado e um índice de trombogenicidade reduzido, que sugere uma boa qualidade da fração lipídica do ponto de vista anti-trombótico. Importa realçar que para alguns destes índices não existem valores de referência, daí que não seja lícito inferir se a carne de lampreia-marinha apresenta qualidade inferior ou superior face ao pescado.

Atendendo a que uma porção de lampreia-marinha contém em média 160 g de carne, constatou-se que os níveis de colesterol, o valor energético e os lípidos totais se situam

dentro dos valores diários recomendados, todavia os teores de EPA+DHA são inferiores aos valores de referência.

Estes resultados sugerem que a carne de lampreia-marinha apresenta qualidade nutricional em termos de perfil lipídico. Todavia, o consumo desta espécie pode revelar-se uma prática menos saudável para os apreciadores, na medida em que estes consomem lampreia-marinha com uma frequência elevada durante os dois a três meses em que é permitida a sua captura em território nacional.

6. Referências

- Ackman, R. G. (1982) Fatty Acid Composition in Fish Oil. In: Barlow, S. M. & Stansby, M. E. (eds.) *Nutritional Evaluation of Long-Chain Fatty Acids in Fish Oil*. New York, Academic Press. pp. 25–28.
- Ackman, R. G. (1989) Seafood lipids and fatty acids. *Food Reviews International*, 6, 617–646.
- Ackman, R. G. (1999) Comparison of Lipids in Marine and Freshwater Organisms. In: Art, M. T. & Wainman, B. C. (eds.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer. pp. 263–298.
- Ackman, R. G. (2002) The gas chromatograph in practical analysis of common and uncommon fatty acids for the 21st century. *Analytica Chimica Acta*, 465, 175–192.
- Afonso, C. I. M. (2009) Produtos da pesca capturados na costa portuguesa: Benefícios e perigos associados ao seu consumo. Tese de Doutoramento em Farmácia (Bromatologia). Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Lisboa. 243 pp.
- Afonso-Dias, M., Pinto, J., Carvalho, A. & Muzavor, S. (2001) *As artes de Pesca do Baixo Guadiana*. Faro, Universidade do Algarve.
- Alexander, R. (1969) The orientation of muscle fibers in the myomeres of fishes. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 49, 263–290.
- Almeida, P. R., Quintella, B. R. & Dias, N. M. (2002a) Movement of radio-tagged anadromous sea lamprey during the spawning migration in the River Mondego (Portugal). *Hydrobiologia*, 483, 1–8.
- Almeida, P. R., Quintella, B. R., Dias, N. M. & Andrade, N. (2002b) The Anadromous Sea Lamprey in Portugal: Biology and Conservation Perspectives. In: Moser, M., Bayer, J., & MacKinlay, D. (eds.) *Symposium Proceedings of the International*

- Congress on the Biology of Fishes – The Biology of Lampreys*. University of British Columbia. Vancouver. pp. 49–58.
- Almeida, P. R., Silva, H. T. & Quintella, B. (2000) The migratory behaviour of the sea lamprey *Petromyzon marinus* L., observed by acoustic telemetry in River Mondego (Portugal). In: Moore, A. & Russel, I. (eds) *Advances in fish telemetry*. Suffolk, U.K., CEFAS: Lowestoft. pp. 99–108.
- Altringham, J. D., & Johnston, I. A. (1981) Quantitative histochemical studies of the peripheral innervation of cod (*Gadus morhua*) fast myotomal muscle fibres. *Journal of Comparative Physiology A*, 143(1), 123-127.
- American Heart Association (s.d.) [Online] Disponível em: www.americanheart.org [Acedido em 17 de Agosto de 2014].
- Andrade, N. O., Quintella, B. R., Ferreira, J., Pinela, S., Póvoa, I., Pedro, S. & Almeida, P. R. (2007) Sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) spawning migration in the Vouga river basin (Portugal): poaching impact, preferential resting sites and spawning grounds. *Hydrobiologia*, 582, 121–132.
- Araújo, M. J. F. (2011) *Ecologia e Composição Nutricional da Lampreia-Marinha (Petromyzon marinus, L.) No Rio Minho Internacional*. Dissertação de Mestrado em Ciências do Mar - Recursos Marinhos. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar - Universidade do Porto, Porto. 102 pp.
- AOAC (1990) Protein (Crude) in Animal Feed: Combustion Method. (990.03) 15th Edition. Official methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.
- Bandarra, N. M., I. Batista, J. Tafula & M. L. Nunes (2001) Valor Nutricional de Produtos da Pesca In: *Produtos da Pesca. Qualidade, Segurança e Inovação Tecnológica*. Atas das Jornadas Técnicas e Científicas do IPIMAR. Publicações Avulsas IPIMAR. pp. 75-87.
- Bandarra, N. M., Calhau, M. A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M. G., Bártolo, H., Faria, M. R., Fonseca M. C., Gonçalves, J., Batista, I. & Nunes, M. L. (2004) Composição

e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. INIAP/IPIMAR, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Beamish, F. W. H. (1980) Biology of the North American anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 1924–1943.

Beamish, F. W. H. & Potter, C. I. (1975) The biology of the anadromous Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in New Brunswick. *Journal of Zoology*, 177, 57–72.

Beaulaton, L., Taverny, C. & Castelnaud, G. (2008) Fishing, abundance and life history traits of the anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in Europe. *Fisheries Research*, 92, 90–101.

Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2004) *Food Chemistry*. Berlin, Springer-Verlag, 1070 p.

Bell, M. V., Henderson, R. J. & Sargent, J. R. (1986) The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83, 711–719.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002) *Biochemistry, Fifth Edition*. New York, Freeman, pp 603–631.

Bird D. J., Ellis D. J., Potter I. C. (1993) Comparisons between the fatty acid composition of the muscle and ovary of the nonparasitic lamprey *Lampetra planeri* (Bloch) and their counterparts in the anadromous and parasitic *Lampetra fluviatilis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105 B, 327–332.

Broughton, K. S. & Wade, J. W. (2002) Total fat and (n-3):(n-6) fat ratios influence eicosanoid production in mice. *The Journal of Nutrition*, 132, 88–94.

Campos, L. (2008) *Entender a Bioquímica*. 5ª Edição, Lisboa, Escolar Editora.

Cejas, J. R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Samper, M. & Lorenzo, A. (2004). Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 138, 91–102.

- Correia, A. A. D. & Correia, J. H. R. D. (1985) *Bioquímica Animal*. 2ª Edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Correia, F. & Fonseca, C. (2009) *Penacova, o Mondego e a Lampreia*. Coimbra, Câmara Municipal de Penacova.
- Department of Health (1994) Committee on Medical Aspects of Food Policy, Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease, Report on Health and Social Subjects. *Her Majesty's Stationery Office*, London. [Online] Disponível em: www.legislation.gov.uk [Acedido em 17 de Agosto de 2014].
- De Meester, F. (2013) Introduction: The Economics of Omega-6/3. In: De Meester, F., Watson, R. R. & Zibaldi, S. (eds.) *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives*. New York, Humana Press, Springer Science + Business Media. pp. 3–11.
- DGPA (2007) *Programa operacional pesca 2007-2013*. Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, p 98. [Online] Disponível em: www.ifap.min-agricultura.pt [Consultado em 20 de Julho de 2014].
- Doadrio, I. (2001) *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Madrid, Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Museo Nacional de Ciencias Naturales. p. 364.
- Duarte, A. C. L., Jorge, I., Sobral, M. P., Rebordão, F. R., Martins, R. & Carneiro, M. (2003) *Rendimento do botirão usado na captura da lampreia *Petromyzon marinus* L. 1758 no estuário do Rio Mondego*. IPIMAR. Relatório nº: 8.
- Dyerberg, J., Bang, H. O. & Hjerne, N. (1975) Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 28 (9), 958–966.
- Eaton S. B. & Konner M. (1985) Paleolithic nutrition: A consideration of its nature and current implications. *The New England Journal of Medicine*, 312, 283–289.

- Elvevoll, E. O., Eilertsen, K-E., Brox, J., Dragnes, B. T., Falkenberg, P., Olsen, J. O., Kirkhus, B., Lamglait, A. & Østerud, B. (2008) Seafood diets: Hypolipidemic and antiatherogenic effects of taurine and n-3 fatty acids. *Atherosclerosis*, 200 (2), 396-400.
- European Food Safety Authority (2004) Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to nutrition claims concerning omega-3 fatty acids, monounsaturated fat, polyunsaturated fat and unsaturated fat. *The EFSA Journal*, 253, 1-29.
- European Society of Cardiology (s.d.) [Online] Disponível em: www.escardio.org [Acedido em 4 de Agosto de 2014].
- FAO (2005) *Fisheries and Aquaculture topics - Lipids*. Rome, FAO Fisheries and Aquaculture Department. [Online] Disponível em: www.fao.org [Acedido em 15 de Julho de 2014].
- FAO (2007) *FAO Yearbook - Fishery Statistics*. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 237. [Online] Disponível em: www.fao.org [Acedido em 2 de Agosto de 2014].
- Fundação Portuguesa de Cardiologia (s.d.) [Online] Disponível em: www.fpcardiologia.pt. [Acedido em 17 de Agosto de 2014]
- Geda, A. C. G. (2012) Filetes de sardinha (*Sardina pilchardus*): efeito da suplementação de antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa. Tese de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar - Instituto Politécnico de Leiria, Leiria. 92 pp.
- Guillemot, P. J., Larson, R. J., Lenarz, W. H. (1985) Seasonal cycles of fat and gonad volume in five species of northern california rockfish (*Scopoenidad Sebastes*). *Fishery Bulletin*, 83, 299-311.
- Guiné, R. & Henriques, F. (2011) O papel dos ácidos gordos na nutrição humana e desenvolvimentos sobre o modo como influenciam a saúde. *Millenium*, 40, 7–21.

- Günşen, U., Özcan, A. & Aydın, A. (2011) Determination of Some Quality Criteria of Cold Stored Marinated Anchovy under Vacuum and Modified Atmosphere Conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 233–242.
- Hardisty, M. W. (1986) *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758. In: Holčík, J. (ed.) *The freshwater fishes of Europe* Vol. 1, Part I. Wiesbaden, Aula-Verlag. pp. 94–116.
- Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (1971a) The behaviour, ecology and growth of larval lampreys. In: Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (eds.) *The biology of lampreys, Volume I*. London, Academic Press. pp. 85–125.
- Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (1971b) The general biology of adult lampreys. In: Hardisty M. W. & Potter, I. C. (eds.) *The biology of lampreys, Volume I*. London, Academic Press. pp. 127–206.
- Henderson, R. J., Sargent, J. R., Hopkins, C. C. E. (1984) Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin, *Mallotus villosus*, during sexual maturation and spawning. *Marine Biology*, 78, 255–263.
- Henderson, J. R. & Tocher, D. R. (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, 26, 281–347.
- Holub, B. J. (2002) Clinical nutrition: 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Canadian Medical Association Journal*, 166, 608–615.
- Horrobin, F. (1993) Fatty acid metabolism in health and disease : the role of Δ -6-desaturase. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 732–737.
- Hossain, M. A. (2011) Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild ? *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3, 455–466.
- Hubbs, C. L. & Potter, I. C. (1971) Distribution, Phylogeny and Taxonomy. In: Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (eds.) *The biology of lampreys, Volume I*. London, Academic Press. pp. 1–65.

- Huss, H. H. (1995) *Quality and quality changes on fresh fish*. Rome, FAO, Fisheries Technical paper number: 348.
- Huss, H. H. (1997) *Garantia da qualidade dos produtos da pesca*. FAO, Documento Técnico sobre as Pescas número: 334.
- Huynh, M. D., Kitts, D. D., Hu, C. & Trites, A. W. (2007) Comparison of fatty acid profiles of spawning and non-spawning Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 504–511.
- ICN (2006) *Fauna, peixes*. Plano Sectorial da Rede Natura 2000, Lisboa, Instituto da Conservação da Natureza.
- Iglésias S. P. (2013) Chondrichthyans and Cyclostomata from the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (A natural classification based on collection specimens, with DNA barcodes and standardized photographs). *Muséum National d’Histoire Naturelle*, versão provisória 07. p. 105. [Online] Disponível em: <http://www.mnhn.fr/iccanam>. [Acedido em 4 de Setembro de 2014].
- INAG & ARH ALENTEJO (2009) Questões Significativas da Gestão da Água. Região Hidrográfica do Guadiana. Participação Pública. [Online] Disponível em: www.apambiente.pt [Acedido em 5 de Maio de 2014].
- INAG & ARH CENTRO (2009) Questões Significativas da Gestão da Água. Região Hidrográfica do Vouga, Mondego, Lis e Ribeiras do Oeste. Participação Pública. [Online] Disponível em: www.apambiente.pt [Acedido em 5 de Maio de 2014].
- INSA (2006) Tabela da composição de alimentos. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa. p. 355. [Online] Disponível em: www.insa.pt [Acedido em 12 de Agosto de 2014].
- IOM - Institute of Medicine of the National Academies (2005) Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington D.C., The National Academic Press.

- IPQ (1988) Norma Portuguesa 2032 – Pescado: Determinação do teor de cinza. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- IPQ (1990) Projeto de Norma Portuguesa 3356 – Pescado: Determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (T.B.A.): método espectrofotométrico. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- IPQ (1991) Norma Portuguesa 2282 – Pescado: Determinação do teor de humidade. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- IPQ (2009) Norma Portuguesa 1972 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de matéria gorda livre. Lisboa, Instituto Português da Qualidade.
- ISO 9831 (1998) Animal feeding stuffs, animal products, and faeces or urine — Determination of gross calorific value — Bomb calorimeter method, International Organization for Standardization.
- ISSFAL - International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (s.d.) [Online] Disponível em: www.issfal.org. [Acedido em 17 de Agosto 2014].
- Iwasaki, M. & Harada, R. (1984) Cholesterol content of fish gonads and livers. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50 (9), 1623.
- Jabeen, F. & Chaudhry, A. S. (2011) Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991–996.
- Janvier, P. (2007) Living primitive fishes and fishes from deep time. In: McKenzie, D. J., Farrel, A. P., & Brauner, C. J. (eds.) *Primitive Fishes*. San Diego, Academic Press. pp. 1–51.
- Kořakowska, A., Olley, J. & Dunstan, G. A., (2003) Fish lipids. In: Sikorski, Z. E., Kořakowska, A. (eds.) *Chemical and functional properties of food lipids*. New York, CRC Press. pp. 221-264.

- Kołakowska, A. & Sikorski, Z. E. (2003) The role of lipids in food quality. In: Sikorski, Z. E., Kołakowska, A. (eds.) *Chemical and functional properties of food lipids*. New York, CRC Press. pp. 1-8.
- Kong, F., Oliveira, A., Tang, J., Rasco, B., Crapo, C. (2008) Salt effect on heat-induced physical and chemical changes of salmon fillet (*O. gorbuscha*). *Food Chemistry*, 106, 957–966.
- Koolman, J. & Roehm, K. H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*. Second edition. New York, Thieme.
- Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) *Handbook of European Freshwater Fishes*. Berlin, Germany.
- Kozlova, T. A., Klotimchenko, S. V. (2000) Lipids and fatty acids of two pelagic cottoid fishes (*Comephorus* spp) endemic to lake Baikal. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 126, 477–485.
- Kramer, K., Tseng, C. & Ma, K. (2013) Measuring the Levels of EPA and DHA in Nutraceutical Oils. In: De Meester, F., Watson, R. R. & Zibaldi, S. (eds.) *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives*. New York, Human Press, Springer Science + Business Media. pp. 3–11.
- Lança, M. J., Machado, M., Ferreira, R., Alves-Pereira, I., Quintella, B. R. & Almeida, P. R. (2013) Feeding strategy assessment through fatty acid profiles in muscles of adult sea lampreys from the western Iberian coast. *Scientia Marina*, 77, 281–291.
- Lança, M. J., Rosado, C., Machado, M., Ferreira, R., Alves-Pereira, I., Quintella, B. R. & Almeida, P. R. (2011) Can muscle fatty acid signature be used to distinguish diets during the marine trophic phase of sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.)? *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 159, 26–39.
- Lands, B. (2013) Attention to Prevention. In: De Meester, F., Watson, R. R. & Zibadi, S. (eds.) *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and*

- Perspectives*. New York, Humana Press, Springer Science, Business Media. pp. 13–26.
- Lands, W. E. M., Libelt B., Morris A., Kramer N. C., Prewitt T. E., Bowen P., Schmeisser, D., Davidson, M. H., & Burns, J. H. (1992) Maintenance of lower proportions of n-6 eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary n-3 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1180, 147–162.
- Larsen, L. O. (1980) Physiology of Adult Lampreys, with Special Regard to Natural Starvation, Reproduction, and Death after Spawning. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 1762–1779.
- Leeuwen, J. L., (1999) A mechanical analysis of myomere shape in fish. *Journal of Experimental Biology*, 202, 3405–3414.
- Li, X., Fan, X., Han, L. & Lou, Q. (2002) Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry*, 59 (2), 157-161.
- Loureiro, J. J. M., Nunes, M. L. R. & Machado, M. L. R. (1986) Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana. In: *Monografias Hidrológicas dos principais cursos de água de Portugal Continental*. Lisboa, Direcção Geral dos Recursos e Aproveitamentos Hidráulicos. pp. 339–407.
- Machado, M. A. P. A. (2010) Determinação e utilização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para caracterização de populações de *Petromyzon marinus*, L. nas várias bacias hidrográficas portuguesas. Tese de Mestrado em Bioquímica. Escola de Ciências e Tecnologia - Universidade de Évora, Évora. 93 pp.
- Martelli, R., Parisi, G., Lupi, P., Bonelli, A., Dalle Zotte, A., Franci, O. (2013) Effect of rearing system on body traits and fillet quality of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801) chilled for a short time. *Italian Journal of Animal Science*, 12, 186–195.

- Martino, R. C., Cyrino, J. E. P., Portz, L. & Trugo, L. (2002) Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, 209, 233-246.
- Mateus, C. S., Alves, M. J., Quintella, B. R. & Almeida, P. R. (2013) Three new cryptic species of the lamprey genus *Lampetra* Bonnaterra, 1788 (Petromyzontiformes: Petromyzontidae) from the Iberian Peninsula. *Contributions to Zoology*, 82, 37–53.
- Mathew, S., Ammu, K., Nair, P. G. V. & Devadasan, K. (1999) Cholesterol content of Indian fish and shellfish. *Food Chemistry*, 66, 455–461.
- Mayes, P. A. & Botham, K. M. (2003) Lipids of Physiologic Significance. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (eds.) *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th Edition. McGraw-Hill Companies. pp. 111–121.
- Mohrhauer H. & Holman R. T. (1963) Effect of linolenic acid upon the metabolism of linoleic acid. *Journal of Nutrition*, 81, 67–74.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5 (1-3), 600–608.
- Murray, J. & Burt, J. R. (2001) *The Composition of Fish*. Torrey Research Station. Torrey Advisory Note number: 38.
- Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the World*. New Jersey, John Wiley & Sons.
- Nunes, M. L., Bandarra, N. M. & Batista, I. (2003) Fish products: contribution for a healthy food. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 453–457.
- Oehlenschläger, J. (1997) Marine fish – A source for essential elements?! In: Luten, J. B., Børresen, T., Oehlenschläger, J. (eds.) *Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality*. Amsterdam, Elsevier Science. pp. 641-651.

- Oehlenschläger, J. (2000) Cholesterol content in edible part of marine fatty pelagic fish species and other seafood. In: Georgakis, S. A. (ed.) *Proceedings 29th WEFTA Meeting*. Greek Society of food Hygienists and Technologist. Pieria, Greece. pp. 107-115.
- Oehlenschläger, J. (2006) Cholesterol content in seafood, data from the last decade: A review. In: Luten, J. B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Saebø, A., Oehlenschläger, J. (eds.) *Seafood research from fish to dish. Quality, safety and processing of wild and farmed fish*. The Netherlands, Wageningen Academic Publishers. pp. 41-57.
- Olsen, Y. (1999) Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: what can freshwater ecologists learn from mariculture? In: Wetzel, R. G. (ed.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer-Verlag. pp. 161–202.
- Osman, H., Suriah, A.R. & Law, E.C. (2001) Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chemistry*, 73, 55–60.
- Özogul, Y. & Özogul, F. (2007) Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*, 100, 1634–1638.
- Özogul, Y., Özogul, F. & Alagoz, S. (2007) Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chemistry*, 103, 217–223.
- Ozogul, Y., Polat, A., Uçak, İ. & Ozogul, F. (2011) Seasonal fat and fatty acids variations of seven marine fish species from the Mediterranean Sea. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1491–1498.
- Parrish, C. C. (2009) Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs. In: Arts, M. T., Brett, M. T. & Kainz, M. J. (eds.) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York, Springer. pp. 309–326.

- Pedro, S., Caçador, I., Quintella, B. R., Lança, M. J. & Almeida, P. R. (2014) Trace element accumulation in anadromous sea lamprey spawners. *Ecology of Freshwater Fish*, 23, 193–207.
- Pinela, S., Quintella, B., Almeida, P. & Lança, M. J. (2009) Comparison of the fatty acid profile of muscle neutral lipids and phospholipids of up-river anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) from three Portuguese river basins. *Scientia Marina*, 73, 785–795.
- Prato, E. & Biandolino, F. (2012) Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. *Food Chemistry*, 131, 1233–1239.
- Quintella, B. R., Andrade, N. O. & Almeida, P. R. (2003) Distribution, larval stage duration and growth of the sea lamprey ammocoetes, *Petromyzon marinus* L., in a highly modified river basin. *Ecology of Freshwater Fish*, 12, 286–293.
- Quintella, B. S. R. (2006) Biologia e conservação da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L.) em Portugal. Tese de Doutoramento em Biologia (Biologia da Conservação). Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal - Universidade de Lisboa, Lisboa. 281 pp.
- Rogado, L., Alexandrino, P., Almeida, P. R., Alves, J., Bochechas, J., Cortes, R., Domingos, I., Felipe, F., Madeira, J. & Magalhães, F. (2005) *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal Vol. II - Peixes Dulciaquícolas e Migradores*. Lisboa, Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza. p 55.
- Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W. (1974) Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum. *Z Klin Chem Klin Biochem*, 12, 403-407.
- Rueda, F. M., López, J. A., Martínez, F. J., Zamora, S., Divanach, P., Kentouri, M. (2001) Fatty acids in muscle of wild and farmed red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture Nutrition*, 3, 161-165.

- Sänger, A., & Stoiber, W. (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. In: Johnston, I. A. (ed.) *Fish physiology*. Elsevier. pp. 187–250.
- Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B. & Santos-Silva, F. (2002) Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs II. Fatty acid composition of meat. *Livestock Production Science*, 77, 187–194.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estevez, A. (1999) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, 191–199.
- Sargent, J. R. (1995) (n-3) Polyunsaturated fatty acids and farmed fish. In: Hamilton, R. J. & Rice, R. D. (eds.) *Fish Oil: Technology, Nutrition and Marketing*. Bridgewater, P. J. Barnes and Associates. pp. 67–94.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R. & Bell, J. G. (1989) The Lipids. In: Halver, J. E. & Hardy, R. W. (eds.) *Fish Nutrition*. pp. 181–257.
- SCF/EC (2003) *Opinion of the Scientific Committee on Food on the revision of reference values for nutrition labeling*. Health & Consumer protection directorate-general, Scientific Committee on Food, European Commission. p 17.
- Scrimgeour, C. M. & Harwood, J. L. (2007) Fatty Acid and Lipid Structure. In: Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Dijkstra, A. J. (eds.) *The Lipid Handbook*. 3rd edition, New York, CRC Press. pp. 1–36.
- Senso, L., Suárez, M. D., Ruiz-Cara, T., Garcia-Gallego, M. (2007) On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101, 298–307.
- Sheridan, M. A. (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90, 679–690.
- Sheridan, M. A. (1994) Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 107, 495–508.

- Silva, J. M. C. (2000) *Colesterol, Lípidos e Doença Vascular*. LIDEL, Edições Técnicas Lda. Lousã. pp. 17-35.
- Silva, S., Araújo, M. J., Bao, M., Mucientes, G. & Cobo, F. (2014) The haematophagous feeding stage of anadromous populations of sea lamprey *Petromyzon marinus*: low host selectivity and wide range of habitats. *Hydrobiologia*, 734 (1), 187–199.
- Silva S., Servia M. J., Vieira-Lanero R., Barca S. & Cobo F. (2013) Life cycle of the sea lamprey *Petromyzon marinus*: duration of and growth in the marine life stage. *Aquatic Biology*, 18, 59-62.
- Simopoulos, A. P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 438–463.
- Simopoulos, A. P. (1999a) Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 60, 421–429.
- Simopoulos, A. P. (1999b) Genetic variation and evolutionary aspects of diet. In: Papas, A. (ed.) *Antioxidants in Nutrition and Health*. Boca Raton, CRC Press. pp. 65–88.
- Simopoulos, A. P. (1999c) New products from the agri-food industry: The return of n-3 fatty acids into the food supply. *Lipids*, 34, 297–301.
- Simopoulos, A. P. (2002a) Genetic variation and dietary response: nutrigenetics/nutrigenomics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11(6), 117–128.
- Simopoulos, A. P. (2002b) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56, 365–379.
- Simopoulos, A. P. (2006) Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 502–507.
- Simopoulos, A. P. (2008) The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 674–688.

- Simopoulos, A. P. & Childs, B. (1990) Genetic Variation and Nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel: Karger, 63.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A. & Salem, N. J. (1999) Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *The Journal of the American College of Nutrition*, 18, 487–489.
- Simopoulos, A. P. & Nestel, P. J. (1997) Genetic Variation and Dietary Response. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel: Karger, 80.
- Simopoulos, A. P. & Ordovas J. M. (2004) Nutrigenetics and Nutrigenomics. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel: Karger, 93.
- Simopoulos, A. P. & Pavlou, K. N. (2001) Nutrition and Fitness 1: Diet, Genes, Physical Activity and Health. *World Review of Nutrition and Dietetics*, Basel: Karger, 89.
- Simopoulos, A. P. & Robinson, J. (1999) The Omega Diet: The Lifesaving Nutritional Program Based on the Diet of the Island of Crete. New York, HarperCollins.
- Six, D. A. & Dennis, E. A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488 (1-2), 1-19.
- Soares, M. C. F., Urbinati, E. C. & Malheiros, E. B. (2001) Estocagem Tecidual e utilização de lipídeos em Matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Acta Amazonica*, 31, 661–671.
- Souto, H. (2003) *Comunidades de pesca artesanal em Portugal*. Academia de Marinha, p 27.
- Souza, S., Anido, R. & Tognon, F. (2007) Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 6, 63–71.
- Steffens, W. (1997) Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151 (1-4), 97–119.

- Suissas, C. P. E. (2010) Avaliação da viabilidade da exploração comercial de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L.) nas bacias hidrográficas do Minho e Tejo. Tese de Mestrado em Gestão e Conservação de Recursos Naturais - Universidade de Évora, Évora. 153pp.
- Tidwell, J. H. & Allan, G. L. (2001) Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Reports*, 2, 958–963.
- Tocher, D. R. (2009) Issues surrounding fish as a source of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 21 (1), 13–16.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 (2), 107–184.
- Turan, H., Sonmez, G. & Kaya, Y. (2007) Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black sea. *Journal of Fisheries Sciences*, 1, 97-103.
- Ulbricht, T. L. & Southgate, D. (1991) Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338 (8773), 985–992.
- Valfré, F., Caprino, F., Turchini, G. M. (2003) The health benefit of seafood. *Veterinary Research Communications*, 27, 507-512.
- Vanek, C. & Connor, W. E. (2007) Do n–3 Fatty Acids Prevent Osteoporosis? *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(3), 647-648.
- Videler, J. J. (2011) An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(2), 337-343.
- Visentainer, J. V. (2012) Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274 – 279.
- Voet, D. & Voet, J. D. (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.

- Vyncke, W. (1970) Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, 12, 1084–1087.
- Wąsowicz, E. (2003) Cholesterol and phytosterols. In: Sikorski, Z. E. & Kołakowska, A. (eds.) *Chemical and functional properties of food lipids*. NW, CRC Press. pp. 93-105.
- Watanabe, T. (1987) Requerimientos de ácidos graxos y nutrición lipídica en los peces. *Nutrición en Acuicultura II*, 319, 99-166.
- Weatherley, A. H., & Gill, H. S. (1987) *The Biology of Fish Growth*. London, Academic press. pp. 2 – 442.
- Weil, J. H. (1983) *Bioquímica Geral*. 4^a edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Wilkie, M. P. (2011) Lampreys: Energetics and Development. In: Farrel, A. P., Cech, J. J., Richards, J. G. & Stevens, E. D. (eds.). *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press. pp. 1779–1786.
- Youson, J. & Potter, I. (1979) A description of the stages in the metamorphosis of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Canadian Journal of Zoology*, 57, 1808–1817.
- Youson, J. H. (1980) Morphology and Physiology of Lamprey Metamorphosis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 1687–1710.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D. R., Panserat, S., Dickson, C. A. , Bergot, P. & Teale, A. J. (2004) Characterization and comparison of fatty acyl Delta 6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139, 269–279.
- Zhou, L. & Nilsson, A. (2001) Sources of eicosanoid precursor fatty pools in tissue. *Journal of Lipid Research*, 42, 1521-1542.
- Živković, D., Perić, V., Barać, M. & Perunović, M. (2002) Cholesterol content in meat of some cyprinidae. *Journal of Agricultural Science*, 47, 179-187.

Anexo

Anexo. Lista de equipamento com respetiva marca e modelo

Equipamento	Marca e modelo
ASE – “Accelerated Solvent Extractor”	Dionex (ASE 100)
Balança técnica	KERN (DS 65K1)
Balança analítica	Precisa 205 AS; Sartorius analytic A210P
Balão de vidro de evaporação	Labbox (50 ml, 19-26)
Banho termostaticado	Memmert (790 059)
Bomba oxigenadora	AIRMAX (DB-30A)
Calorímetro	Parr (6400)
Cadinhos de porcelana	Labbox
Cuvetes 10mm	Hellma Analytics (100-05)
Células de extração de 10 ml	Dionex (ASE 100)
Coluna capilar	Supelco (Omegawax 320)
Coluna capilar	Bruker (BR-Swax)
Cromatógrafo	Hewlett Packard (6890 GCsystem)
Cromatógrafo/Espectrómetro de massa	Bruker (Scion 456)
Espectrofotómetro	Beckman (DU 530)
Estufa de secagem, regulável a $105 \pm 2^\circ\text{C}$	Memmert (UE 500)
Evaporador Rotativo	BÜCHI (Rotavapor systems, R-114, B-480, B-177, F25)
Filtros celulósicos para células de extração de 10 ml	Dionex (ASE 100)
Homogeneizador	IKA-WERK (Ultra-turrax-T25)
Liofilizador	Edwards (Modulyo benchtop freeze dryer)
Mufla, regulável a $500 \pm 25^\circ\text{C}$	Carbolite Furnaces (CSF 1200)
Picadora	FLAMA (1705FL)
Placa de aquecimento	Thermolyne SyBran (17600)
Prensa	Parr (Pellet Press)
Tanque em polietileno	Rena (Aqualife 200)
Tubos de ensaio (10 mL/20 mL)	Pyrex/Normax
Vórtex	IKA (TT52)