



***Efeito da dieta alimentar no perfil bioquímico do crustáceo
decápode Palaemon elegans (Rathke, 1837)***

Rita de Jesus Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Sérgio Miguel Franco Martins
Leandro, Professor Adjunto da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Instituto
Politécnico de Leiria

[2011]

**Efeito da dieta alimentar no perfil lipídico do crustáceo decápode *Palaemon elegans*
(Rathke, 1837)**

Copyright © Rita de Jesus Sousa

“A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

AGRADECIMENTOS

Aos todos os residentes do GIRM do Mestrado em Aquacultura e Mestrado de Biotecnologia de Recursos Marinhos pela companhia e inter-ajuda demonstrada durante o último ano.

Aos Técnicos de Laboratório, pelo auxílio e gestão de equipamentos e espaços nas horas de aperto.

Ao David Pereira, pelo seu carácter, sensatez e humildade. Foi um enorme prazer conhecer-te.

Ao Rúben Pinho, obrigado por tudo e pela pessoa que és.

À Márcia Caramalho, vizinha obrigada por toda a paciência, ajuda, cumplicidade e claro o suporte das inseguranças de última hora.

À honrosa Rainha dos PIABS Cristina Salas, obrigada por tudo, pela ajuda, companheirismo, cumplicidade, amizade e sobretudo pela confiança que depositas em mim.

À Professora Carla Tecelão e ao Tiago Simões, por toda a ajuda dada durante as análises realizadas no GC.

À Ângela Vicente, um “enorme” obrigada por toda a ajuda que me deste no desenvolvimento experimental deste Projecto, foi sem dúvida alguma muito importante.

Ao Hugo Monteiro, muito OBRIGADO pela convivência dos últimos meses, por toda a ajuda/esclarecimentos que me deste. Sim, eu sei que também foi preciso alguma paciência.

Ao meu orientador Doutor Sérgio Leandro, quero agradecer-lhe por toda a ajuda que deu no último ano e por todos os ensinamentos dados.

À Filipa, “...onde só chega, quem não tem medo de naufragar...”.

Aos meus Pais, muito obrigado por tudo o que me deram até aos dias de hoje, por todo o esforço que tiveram de fazer para que pudesse continuar a estudar, pela paciência de tantos dias, pela educação e pelos valores e ideais transmitidos.

A espécie de *Palaemon elegans* encontra-se largamente distribuída pelo ambiente marinho e numa grande variedade de habitats rochosos. Os indivíduos pertencentes a esta espécie toleram uma vasta gama de salinidade e temperatura, apresentando uma grande versatilidade no que diz respeito aos itens alimentares. Neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito da dieta alimentar na composição bioquímica (proteína bruta, gordura total, ácidos gordos e aminoácidos) do tecido muscular de *P. elegans* e nos respectivos parâmetros de crescimento (incremento em peso, taxa específica de crescimento e taxa de sobrevivência).

Para tal, foram consideradas três dietas alimentares (mexilhão, ração semi-seca e ração semi-húmida), as quais foram fornecidas a juvenis de *P. elegans* cultivados durante 54 dias em condições laboratoriais (temperatura = 24°C, salinidade = 35‰). Paralelamente ao estudo e servindo como grupo controlo, em 2010 e 2011 foram capturados no campo indivíduos selvagens de *P. elegans* para os quais foi igualmente estabelecido o respectivo perfil bioquímico.

Com o presente estudo, foram evidenciadas elevadas correlações entre o tamanho *versus* peso e taxa de crescimento dos *P. elegans*. A análise ANCOVA demonstrou a existência de diferenças significativas ($P < 0.001$) entre todas as taxas de crescimento específicas, sendo a ração semi-seca aquela que proporcionou valores mais elevados (0.044 d^{-1}). A taxa de sobrevivência com maior destaque neste estudo resultou da alimentação dos crustáceos com ração semi-seca (aproximadamente 96%).

No perfil bioquímico do músculo de *P. elegans* as diferenças com maior relevância incidem-se na quantificação de ácidos gordos e aminoácidos, comparativamente com as dietas fornecidas durante o presente estudo. Quanto aos ácidos gordos, constatam-se diferenças notórias entre a quantidade existente nas dietas fornecidas e no músculo de *P. elegans* para os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico na ordem de 95% e 96%, respectivamente.

Relativamente à quantificação de aminoácidos, evidenciam-se diferenças estatísticas para prolina existente no músculo de *P. elegans* alimentados com dieta semi-seca ($40,529 \pm$

1,9510 mg/g) e mexilhão ($29,213 \pm 5,8577$ mg/g) comparativamente com os indivíduos capturados em meio selvagem ($6,660 \pm 0,1650$ mg/g).

Este estudo sugere que a dieta que oferece maior benefício para o crescimento sustentável da espécie e rentável para a aquacultura é a dieta semi-seca, a qual deverá ser ajustada pontualmente com ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) e polinsaturados (PUFA), bem como de aminoácidos essenciais.

Palaemon elegans is widely distributed species throughout the marine environment occurring in a great variety of rocky habitats. These individuals tolerate a wide range of salinity and temperature, showing great versatility to food items. The present study, intended to evaluate the diet of *P. elegans* on muscle tissue's biochemical composition (crude protein, total fat, fatty acids and amino acids) and respective growth parameters (increase in weight, specific growth rate and survival rate).

To this end, three different diets were considered (mussel, semi-dry ration and semi-wet ration), which were provided to juvenile *P. elegans* grown for 54 days under laboratory conditions (temperature = 24°C, salinity = 35). In parallel to this study, wild individuals were captured in 2010 and 2011 and used as control group for the establishment of a biochemical profile.

Results evidenced high correlations between the size vs weight and growth rate for this animal. Statistic analyses showed significant differences ($P < 0,001$) between all specific growth rates, and ration diet presented higher values ($0,044 \text{ d}^{-1}$). Semi-dry ration diet presented the highest results of survival rate (96%).

Biochemical profile of *P. elegans* muscle revealed high differences in amino acids and fatty acids quantification for the different diets tested in this study. Regarding fatty acids, the main differences between the provided diets and *P. elegans* muscle are in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic with 95% and 96%, respectively.

Regarding amino acids quantification, *P. elegans* fed with semi-dry ($40,529 \pm 1,9510 \text{ mg/g}$) and mussels ($29,213 \pm 5,8577 \text{ mg/g}$) showed statistical differences for proline comparatively with wild individuals captured ($6,660 \pm 0,1650 \text{ mg/g}$).

The data obtained with the present study suggests that the semi-dry diet is the most benefic for sustainable growth and, therefore, most profitable for aquaculture. Nevertheless, the addition of highly unsaturated fatty acids (HUFA), polyunsaturated (PUFA) and essential amino acids are recommended since, in our study, these presented low values according to other authors.

Keywords: *Palaemon elegans*, diets, amino acids, ácidos gordos

ÍNDICE DE MATÉRIAS

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE MATÉRIAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XV
LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XVII
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1. Biologia da Espécie	3
1.2. Distribuição Geográfica.....	5
1.3. Dieta em meio selvagem	6
1.4. Ecologia da Espécie	7
1.5. Reprodução em meio selvagem.....	9
1.6. Requisitos Nutricionais de Crustáceos Decápodes (1.1)	12
1.7. Composição Bioquímica de Crustáceos Decápodes (1.2)	16
1.8. Objectivos do Estudo.....	17
CAPÍTULO II - METODOLOGIA	19
2.1. Captura de Indivíduos Selvagens e Crescimento Larvar	21
2.2. Sistema de Cultivo de Decápodes	22
2.3. Aclimação de Juvenis.....	23
2.4. Ensaio com Dietas.....	23
2.5. Estimativa do Crescimento	26
2.6. Análises Bioquímicas	27
2.6.1. Proteína Bruta	28
2.6.2. Gordura Total	29
2.6.3. Perfil Lipídico.....	30
2.6.4. Perfil de Aminoácidos	32
2.7. Análise Estatística.....	34
CAPÍTULO III - RESULTADOS	37
3.1. CRESCIMENTO DE JUVENIS	39
3.2. PROTEÍNA BRUTA	43
3.3. GORDURA TOTAL.....	45
3.4. PERFIL LIPÍDICO	46
3.5. PERFIL DE AMINOÁCIDOS.....	48

CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO DE RESULTADOS	51
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	57
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Variação da frequência de ocorrência de machos e fêmeas de <i>P. elegans</i> ao longo do ciclo anual	10
Figura 2 – Características das larvas de <i>P. elegans</i>	12
Figura 3 – Locais de amostragem utilizados na captura de indivíduos selvagens de <i>P. elegans</i>	21
Figura 4 – Técnicas e metodologias aplicadas na análise bioquímica.....	27
Figura 5 – Fórmula geral da reação com os aminoácidos presentes.....	32
Figura 6 – Relação tamanho-peso para juvenis de <i>P. elegans</i> alimentados com (A) miolo de mexilhão (RM), (B) ração semi-seca (RSS) e (C) ração semi-húmida (RSH).....	39
Figura 7 – Relação tamanho-peso para juvenis de <i>P. elegans</i> capturados em meio selvagem nos anos de 2010 e 2011	40
Figura 8 – Efeito da dieta no incremento em peso de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).	41
Figura 9 – Relação do comprimento (mm) e o tempo de cultivo (dias) de <i>P. elegans</i> para as três dietas utilizadas (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).	42
Figura 10 – Taxa de sobrevivência (% , valor médio \pm SE) de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a 3 dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e ao longo de 54 dias do ensaio.....	43
Figura 11 – Conteúdo em proteína bruta (% , valor médio \pm SE) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).....	44
Figura 12 – Conteúdo em proteína bruta (% , valor médio \pm SE) de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS)	44
Figura 13 – Conteúdo em gordura total (% , valor médio \pm SE) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).....	45
Figura 14 – Conteúdo em gordura total (% , valor médio \pm SE) de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS).	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Diferenças morfológicas das espécies do género Palaemon que ocorrem nas águas Europeias	4
Tabela II – Percentagem de fêmeas ovígeras e respectivo tamanho máximo e mínimo	11
Tabela III – Requisitos de aminoácidos essenciais (EAA) em termos percentuais de duas espécies do género Penaeus	14
Tabela IV – Composição de aminoácidos essenciais na composição do músculo de camarão em percentagem (%) de proteína para a espécie <i>Litopenaeus vannamei</i>	17
Tabela V – Composição das rações semi-seca e semi-húmida utilizadas nos ensaios alimentares....	24
Tabela VI – Composição em ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso húmido) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).	47
Tabela VII – Composição em ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a três dietas diferentes e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS).....	48
Tabela VIII – Perfil de Aminoácidos livres (mg/g de peso húmido) das rações oferecidas como dietas alimentares	49
Tabela IX – Perfil de Aminoácidos livres (mg/g de peso seco) de juvenis de <i>P. elegans</i> submetidos a três dietas diferentes e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS)	50
Tabela X – Efeito da dieta no tamanho, em mm, de <i>P. elegans</i> alimentados com 3 dietas diferentes durante 54 dias.....	69
Tabela XI – Efeito da dieta no peso, em mg, de <i>P. elegans</i> alimentados com 3 dietas diferentes durante 54 dias.....	70
Tabela XII – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens de <i>P. elegans</i> capturados nos anos de 2010 e 2011.	71
Tabela XIII – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens de <i>P. elegans</i> capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.....	72
Tabela XIV – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens <i>P. elegans</i> capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.	73
Tabela XV – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens <i>P. elegans</i> capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.	74
Tabela XVI – Peso ganho e taxa de crescimento específico, em percentagem, em <i>P. elegans</i> submetidos a 3 dietas diferentes durante 54 dias.	74
Tabela XVII – Taxa de sobrevivência em <i>P. elegans</i> submetidos a 3 dietas diferentes durante 54 dias.	75

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DHA - docosahexaenoic acid	<i>P. monodon</i> – <i>Penaeus monodon</i>
EAA – Essential amino acids	<i>P. paulensis</i> – <i>Penaeus paulensis</i>
EPA - eicosapentaenoic acid	<i>P. serratus</i> – <i>Palaemon serratus</i>
Eq. – Equação	<i>P. stylirostris</i> - <i>Penaeus stylirostris</i>
ESTM – Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar	PeM – <i>Palaemon elegans</i> alimentados com miolo de mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)
F. – Fórmula	PeS - <i>Palaemon elegans</i> capturados em meio selvagem
<i>F. indicus</i> – <i>Fenneropenaeus indicus</i>	PeSH – <i>Palaemon elegans</i> alimentados com ração semi-húmida
FMOC-Cl – 9-fluorenilmetil-cloroformato	PeSS – <i>Palaemon elegans</i> alimentados com ração semi-seca
GC – Cromatógrafo Gasoso	PUFA – Polyunsaturated fatty acid
GIRM – Grupo de Investigação de Recurso Marinhos	RM – Ração com miolo de mexilhão
HPLC – High Performance Liquid Chromatography	RSH – Ração semi-húmida
HUFA – Highly unsaturated fatty acids	RSS – Ração semi-seca
<i>L. vannamei</i> – <i>Litopenaeus vannamei</i>	SEM – Standard error of the mean (Erro padrão médio)
NEAA – Non-essential amino acid	SGR – Specific Growth Rate
<i>P. elegans</i> – <i>Palaemon elegans</i>	UV – ultravioletas
<i>P. indicus</i> – <i>Palaemon indicus</i>	WG – Weight Gain
<i>P. japonicus</i> – <i>Penaeus japonicus</i>	
<i>P. merguensis</i> – <i>Penaeus merguensis</i>	

CAPÍTULO I

Introdução

1.1. BIOLOGIA DA ESPÉCIE

O crustáceo decápode *Palaemon elegans*, Rathke 1837 possuiu outrora variados sinónimos para a denominação da espécie, como exemplo *Leander squilla elegans*, Rathke 1837 (Janas, 2005), *Palaemon squilla*, Rathke (Berglund & Bengtsson, 1981; Berglund, 1982), *Leander squilla typica* e *Palaemon (Paleander) elegans* (Gonzalez-Gordillo *et. al.*, 2001), atualmente extinguidos.

De acordo com a sua classificação taxonómica, a espécie *P. elegans* surge do subfilo Crustacea, da ordem Decapoda, da infra-ordem Caridea e da família e sub-família Palaemonidae (Reuschel *et. al.* 2010).

P. elegans habita frequentemente em rochas com fundos rasos de areia (Daniel & Boyden, 1975; Berglund, 1982; Dalla Via, 1985; Taylor & Spicer, 1987; Morais *et. al.*, 2002; Janas *et. al.* 2004; Janas, 2005), habitualmente na presença de algas da espécie *Zostera marina* (Daniel & Boyden, 1975; Berglund, 1981; Bilgin *et. al.*, 2008; Bilgin *et. al.*, 2009) e/ou género *Posidonia* e *Cymodocea* (González-Ortegón & Cuesta, 2006).

O camarão *P. elegans* apresenta como características distintas o facto do tórax e do abdómen possuírem normalmente bandas acastanhadas e o *rostrum* apresentar uma elevada curvatura com 7-9 “dentes” dorsais (Hayward & Ryland, 1996, Janas *et. al.*, 2004).

Na parte posterior da extremidade da órbita surgem 3, ocasionalmente 2 “dentes” dorsais (Hayward & Ryland, 1996; Hayward *et. al.*, 1996; Janas *et. al.*, 2004; González-Ortegón & Cuesta, 2006) e na carapaça constam antenulas e espinhos branquiostegiais (Hayward & Ryland, 1996).

As características anteriormente mencionadas encontram-se descritas na Tabela I, a qual proporciona a comparação entre diferentes espécies do mesmo género (adaptado de González-Ortegón & Cuesta, 2006).

Tabela I – Diferenças morfológicas das espécies do género *Palaemon* que ocorrem nas águas Europeias (adaptado de Gonzalez-Ortegón & Cuesta, 2006).

Estrutura	<i>P. adspersus</i>	<i>P. elegans</i>	<i>P. longirostris</i>	<i>P. macrodactylus</i>	<i>P. serratus</i>	<i>P. xiphius</i>
Rostrum						
“Dentes” dorsais (normalmente)	5-7	7-9	7-10 (8)	9-15 (10-13)	6-8 (7)	6-8 (7)
“Dentes ventrais” (normalmente)	3	3	3-5 (4)	3-5 (4)	5	5
“Dente” pós-orbital	1	3	2	3, raramente 2 ou 4	2	2
Linhas de <i>setae</i> ao longo da margem inferior	Simples	Simples	Simples	Duplo	Simples	Simples
Forma da margem superior	Lisa	Lisa ou levemente côncava	Lisa ou levemente côncava	Lisa	Côncavo	Côncavo
Coloração	Manchas vermelhas ou linhas na parte inferior	Sem coloração	Sem coloração	Sem coloração	Sem coloração	Sem coloração
Posição dos espinhos branquiostegiais	Na margem anterior	Na margem anterior ou ligeiramente disperso	Na margem anterior	Ligeiramente atrás da margem anterior	Na margem anterior	Distintamente atrás da margem anterior
N.º de artigos nos palpos mandibulares	3	2	3	3	3	3
Comp. total (mm)						
Fêmea	27-71	30-63	50-77	70	27-90	21-71
Macho	23-51	28-50	35-77	26-40	25-63	23-69

Na espécie *P. elegans*, o cefalotórax e o abdómen contêm listas com padrão de cor negra, enquanto as subdivisões dos pleópodes apresentam cor amarela e azul (González-Ortegón & Cuesta, 2006).

A diferenciação do sexo de *P. elegans* baseia-se na análise dos apêndices, sendo que nos machos o segundo pleópode apresenta um apêndice interno e um apêndice masculino, ao passo que nas fêmeas o segundo pleópode apenas é evidente no apêndice interno (Janas *et. al.*, 2004).

De acordo com diversos autores, o comprimento máximo apropriado atinge valores na ordem dos 63mm (Hayward & Ryland, 1996; Hayward *et. al.*, 1996).

No entanto, no estudo desenvolvido por Yazdani e colaboradores subsiste a indicação do comprimento máximo de 65mm na Europa Ocidental, 58mm no Mar Negro (Başçınar *et. al.*, 2002), 43,4mm no Mar Cáspio (Yazdani *et. al.*, 2010) e 30 a 65mm na costa Portuguesa (Morais *et. al.*, 2002).

1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A distribuição geográfica do camarão *P. elegans* é vasta nas zonas costeiras, como anteriormente mencionado, sendo os seguintes locais os de maior ocorrência da espécie: Escócia, Noruega, Suécia, Mauritânia, Ilhas Canárias (Reuschel *et. al.*, 2010, Janas & Mańkucka, 2010), Portugal, Marrocos (Bilgin & Samsun, 2006), Ilhas de Cabo Verde (Gonzalez-Ortegón & Cuesta, 2006) e África (Başçınar *et. al.*, 2002; Bilgin *et. al.*, 2008; Reuschel *et. al.*, 2010; Janas & Mańkucka, 2010).

De acordo com diversos autores, o camarão *P. elegans* foi incluído na fauna em diversos locais, nomeadamente no Mar Cáspio onde foi acidentalmente introduzido em 1930 e no Mar Aral em 1950 (Aladin *et. al.*, 2001; Janas, 2005; Reuschel *et. al.*, 2010; Janas & Mańkucka, 2010; Yazdani *et. al.*, 2010).

No ano de 2000 foi reportado o aparecimento da espécie no Mar Báltico (Janas *et. al.*, 2004, Grabowski, 2006; Janas & Mańkucka, 2010), demarcando-se a sua ocorrência em 2001 no Golfo de Gdańsk (Janas, 2005) através da introdução pelas águas Germânicas (Jazdżewski,

et. al., 2005; Janas, 2005; Janas & Barańska, 2008).

No início do século XXI, a espécie foi colonizada no sul do Mar Báltico (Janas *et. al.*, 2004; Grabowski *et. al.*, 2005; Jażdżewski *et. al.*, 2005; Grabowski, 2006; Reuschel *et. al.*, 2010; Janas & Mańkucka, 2010) distribuindo-se para leste e norte deste mesmo mar (Janas & Mańkucka, 2010). Em Maio de 2004, *P. elegans* foi encontrado ao longo de toda a costa Polaca de Szczecin à Lagoa de Vístula (Jażdżewski *et. al.*, 2005; Janas, 2005).

Em suma, os dados cronológicos evidenciam claramente uma vasta distribuição deste crustáceo ao longo das águas costeiras dos Continentes Europeu e Africano.

1.3. DIETA EM MEIO SELVAGEM

O decápode *P. elegans* caracteriza-se como sendo um organismo omnívoro, sofrendo a sua dieta alterações de acordo com o seu habitat (Janas & Barańska, 2008).

Os indivíduos da espécie *P. elegans* que habitam o Golfo de Gdańsk alimentam-se de plantas e de outros animais. Todavia a maior frequência e percentagem de conteúdo estomacal são detritos (Albertoni *et. al.*, 2003; Janas & Barańska, 2008). Em águas Europeias, os detritos são frequentemente referidos como sendo uma componente significativa da dieta destes crustáceos (Albertoni *et. al.*, 2003; Janas & Barańska, A., 2008).

No entanto, os residentes na Lagoa Puck (Golfo de Gdańsk) pelo facto de terem à sua disposição vários organismos bentónicos como ostracodes, chironomidas, harpacticoides (copépode), políquetas (Bilgin *et. al.*, 2008), larvas de peixe e briozoários (Janas *et. al.*, 2004), apresentam um consumo diminuto em detritos (Janas *et. al.*, 2004; Bilgin *et. al.*, 2008; Janas & Barańska, 2008). Adicionalmente, na dieta de *P. elegans* consta um largo número de pequenos crustáceos ou outros organismos bentónicos como é o caso de algumas algas características de determinado habitat (Janas & Barańska, 2008).

Na costa Britânica, as algas filamentosas como a *Pylaiella littoralis* e a *Laminaria spp.* predominam na dieta de *P. elegans*, contrariamente ao que acontece na zona costeira da Suécia onde prevalece a alga *Enteromorpha intestinalis* L. (Janas & Barańska, 2008).

Todavia, Morais e colaboradores (2002) mencionam que no verão a espécie *P. elegans* consome em larga escala filamentos de algas e durante o período de inverno inicia a alimentação em pequenos crustáceos, particularmente ciprinídeos e *Balanus sp.* nauplii.

A presença de algas no habitat de *P. elegans* é recorrente e variada, o que enriquece a sua dieta pela ampla quantidade de nutrientes, como exemplo os lípidos, tornando-se um importante componente de reserva para a fase reprodutiva (Janas & Barańska, 2008).

Embora os autores Janas & Barańska (2008) refiram que a composição da dieta não exhibe sazonalidade, referem que os diferentes componentes da dieta ao apresentar variação no meio (Janas & Barańska, 2008), provocam um condicionalismo ao nível da disponibilidade alimentar em certos períodos.

O *P. elegans* apresenta-se como um dos recursos de maior abundância dentro dos crustáceos nectónicos no Mar Báltico, o que propicia aos seus predadores uma importante e rica fonte de alimento para os níveis superiores da cadeia trófica marinha (Janas & Bruska, 2010).

Durante o Inverno, a diminuição das temperaturas provoca um declínio nos requisitos alimentares da família Palaemonidae uma vez que é demonstrado um decréscimo no nível da atividade, designadamente nas taxas metabólica, de consumo e de crescimento (Berglund & Bengtsson, 1981; Janas & Barańska, 2008). A migração do *P. elegans* é demarcada no período de Inverno sobretudo para profundidades elevadas, com o intuito de diminuir a sua atividade e consumo alimentar (Janas & Barańska, 2008).

No entanto, em laboratório verifica-se que os camarões demonstram grande capacidade de captura e deteção da presa, sejam elas peixes ou moluscos (Janas & Barańska, 2008).

1.4. ECOLOGIA DA ESPÉCIE

O camarão *P. elegans* classifica-se como uma espécie eurihalina e euritérmica (Janas & Spicer, 2008; Janas & Bruska, 2010; Janas & Mańkucka, 2010), características essas que permitem à espécie sobreviver às oscilações de salinidade, temperatura e oxigénio existente no meio (Berglund & Bengtsson, 1981; Lumare *et. al.*, 2009; Reuschel *et. al.*, 2010).

Nos períodos noturnos, o crustáceo encontra-se regularmente exposto à escassez de oxigénio, no entanto as suas características fisiológicas permitem a sua sobrevivência com relativa facilidade (Taylor & Spicer, 1987).

A espécie pode ser encontrada em zonas com salinidades muito distintas, nomeadamente lagoas hipersalinas, poças de maré e estuários (Lumare *et. al.*, 2009; Reuschel *et. al.*, 2010). No norte do Mar Báltico, o *P. elegans* está sujeito a variações extremas de salinidade, onde se evidencia a diminuição da salinidade consoante a deslocação de norte para sul, com uma variação de 15-20‰ a sul, 6-8‰ a norte e na extremidade mais a norte realça-se 2‰ (Janas & Mańkucka, 2010). Todavia Janas e colaboradores (2004), também referenciam um intervalo tolerável de salinidade para *P. elegans* entre 5 a 45‰ e entre 25 a 40‰ no Mar Adriático (Dalla Via, 1985).

Relativamente à disponibilidade de oxigénio, *P. elegans* suporta facilmente condições de hipoxia, obtendo maior taxa de sobrevivência comparativamente a *P. adspersus* (Berglund & Bengtsson, 1981), evidenciando também uma maior capacidade de tolerância às flutuações de temperatura e salinidade a que é sujeito (Berglund, 1982; Bilgin *et. al.*, 2008). De igual forma, *P. elegans* demonstra maior capacidade de tolerância à anóxia total sobrevivendo durante 4h, comparativamente ao *P. serratus* que apenas resiste durante 1h (Taylor & Spicer, 1987).

Nas mesmas condições, a produção de energia por parte do *P. elegans* pode, pontualmente, passar pela utilização das vias anaeróbias, podendo no entanto não corresponder à totalidade das necessidades energéticas deste crustáceo, levando-o à morte num curto período (Taylor & Spicer, 1987).

Ao nível da profundidade, os estudos desenvolvidos relativamente à distribuição espaço-temporal das espécies *P. adspersus* e *P. elegans* referem que ocorrem sobretudo em águas pouco profundas, inferiores a 10 metros, onde realçaram uma densidade de 44,9% de indivíduos (Bilgin *et. al.*, 2008).

Podendo no entanto ocorrer a profundidades até 30m em períodos de forte restrição alimentar, exibindo deste modo um comportamento migratório (Bilgin *et. al.*, 2008).

Uma vez que a localização preferencial de *P. elegans* é o substrato rochoso intertidal de

águas pouco profundas é frequentemente exposto a elevadas temperaturas (Dalla Via, 1985). Por exemplo, no Mar Báltico a uma profundidade inferior a 5 metros pode atingir uma temperatura aproximada de 26°C (Janas & Mańkucka, 2010).

Como mencionado anteriormente, *P. elegans* encontra-se exposto a variações de temperatura diurnas e sazonais, tendo sido constado na Lagoa de Lesina (Itália) uma flutuação entre os 5-31°C, oscilando diariamente entre 24-30°C e 16-23°C dentro do mesmo mês (Dalla Via, 1985). No mar Báltico, a temperatura da água pode variar entre 0-20°C (Janas & Mańkucka, 2010).

1.5. REPRODUÇÃO EM MEIO SELVAGEM

Os crustáceos apresentam diferenças evidentes na sua capacidade reprodutiva, onde se destacam as diferenças no tamanho da fêmea comparativamente ao macho. No entanto, os fatores bióticos ou abióticos, como o tamanho do ovo, a variação latitudinal e sazonal de temperatura e a adaptação ao habitat podem influenciar significativamente a época reprodutiva (Bilgin & Samsun, 2006).

Schulte (1975) indica para *P. elegans* uma duração do ciclo biológico de 230 dias a 20°C, desde do ovo à sua primeira postura (Sanz, 1987). Segundo Bilgin e colaboradores (2008), os períodos reprodutivos de *P. elegans* ocorrem essencialmente durante as estações da primavera e verão.

No Mediterrâneo Ocidental, as fêmeas de *P. elegans* iniciam o seu aparecimento no decorrer do mês de abril, transportando os ovos nos pleópodes (Sanz, 1987), como se evidencia na Figura 1 abaixo. Na orla costeira Portuguesa, o aparecimento de fêmeas ovíferas podem ser encontradas desde fevereiro a setembro (Calado & Narciso, 2002; Morais *et. al.* 2002). Quanto à postura de *P. elegans*, esta prolonga-se até ao mês de setembro e atinge o seu máximo de percentagem de fêmeas ovíferas durante o mês de junho na Costa Ibérica (Sanz, 1987).

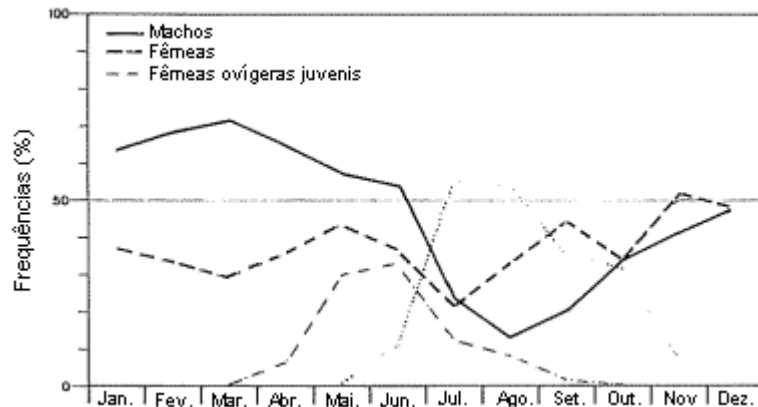


Figura 1 – Variação da frequência de ocorrência de machos e fêmeas de *P. elegans* ao longo do ciclo anual (Sanz, 1987).

Na zona costeira da Suécia, Høglund (1943) assinala que este crustáceo decápode reproduz-se entre os meses de junho a setembro, enquanto Forster (1951) na orla costeira Britânica entre os meses de abril a junho (Sanz, 1987). O mesmo autor ressalva a presença de fêmeas ovígeras na costa de Marrocos durante o mês de fevereiro (Sanz, 1987).

As diferenças de duração da postura são evidentes consoante a sua distribuição, pois este fator limita as condições ambientais características de um determinado habitat (Sanz, 1987). Não obstante tal variabilidade, no Mar Cáspio atribui-se o período reprodutor ao tempo compreendido entre março e outubro (Sanz, 1987).

No que diz respeito ao período de incubação dos ovos, o intervalo que dista da incubação à eclosão dos ovos é de três semanas, no entanto este processo é fortemente dependente da temperatura, o que promove um prolongamento das fases larvares entre três a cinco semanas (Sanz, 1987).

Tendo como base o estudo desenvolvido por Sanz (1987), que decorreu no Golfo de Valência, no qual capturaram fêmeas ovígeras e fêmeas sem ovos nos pleópodes no mesmo local, verificou-se que estas últimas demonstravam desenvolvimento das gónadas, o que presumivelmente comprova a existência de mais uma postura por ciclo reprodutivo anual.

Na Tabela II estão representados os tamanhos máximos e mínimos das fêmeas ovígeras

registados em diferentes meses de estudo. Da sua análise, é possível observar que, no mês de abril as fêmeas são claramente mais pequenas quando comparadas com o mês de junho (Sanz, 1987).

Tabela II – Percentagem de fêmeas ovígeras e respectivo tamanho máximo e mínimo (Sanz, 1987).

Meses	N	%	Tamanho (mm)		
			Máximo	Mínimo	Média
Abril	11	18,03	49,5	40,5	45,23±0,88
Maio	37	68,51	49,6	39,0	43,90±0,44
Junho	57	91,93	54,0	38,1	44,67±0,48
Julho	52	56,52	52,9	38,3	45,02±0,45
Agosto	24	25,26	51,5	29,0	43,72±1,31
Setembro	6	3,42	49,7	30,6	45,25±3,00

Estes indivíduos mais pequenos pertencem à população bentónica do mês de junho, os quais atingem a maturação sexual rapidamente, efetuando a postura antes de finalizar a estação de verão, conjuntamente com a geração previamente existente.

A rápida maturação sexual que incide na população referida anteriormente ocorre maioritariamente devido às condições de temperatura da água existente no mediterrâneo ocidental, sendo superior a 25°C, o que promove o seu rápido desenvolvimento (Sanz, 1987).

Os crustáceos decápodes e outros invertebrados bentónicos marinhos com ciclos de vida complexos desenvolvem-se através de fases larvares planctónicas e fases juvenil-adulta bentónica (Torres *et. al.*, 2002).

O crescimento larvar caracteriza-se pela existência de diferentes estádios de desenvolvimento - zoea, os quais são em número variável dependendo da temperatura e salinidade (Morais *et. al.*, 2002; Reuscher *et. al.*, 2010). No entanto, em meio selvagem compreendem-se entre 6-9 estádios-zoea (Fincham & Figueras, 1986), destacando para a costa Portuguesa 9 estádios-zoea (Fincham & Williamson, 1978; Morais *et. al.* 2002).

Fincham & Figueras (1986) caracterizaram e descreveram sucintamente 9 estados zoea e um estágio *post-larvae* (Figura 2).



Figura 2 – Características das larvas de *P. elegans*. 5a, zoea I com vista dorsal; 5b, zoea I em vista lateral; 5c, zoea II em vista dorsal; 5d, zoea II em vista lateral; 5e, zoea III em vista lateral; 5f, zoea IV em vista lateral; 5g, zoea II – rostrum; 5h, zoea III – telson; 5i, zoea IV – antena 2; 5j, zoea IV – telson; 5k, zoea V – apêndice 4º; 5l, m e n – desenvolvimento da quela no 1º e 2º apêndice (5l, zoea IV leg 1; 5m, zoea VI; 5n, zoea VIII). Escala: linhas representam 0,05mm nas Figuras 5g, 0-2mm nas Figuras 5h-n e 0,5 mm nas Figuras 5a-f (Adaptado de Fincham & Williamson, 1978).

1.6. REQUISITOS NUTRICIONAIS DE CRUSTÁCEOS DECÁPODES (1.1)

O desenvolvimento sustentado de crustáceos depende na sua grande maioria da composição nutricional do alimento disponível no habitat, sendo a mesma ingerida e absorvida através da água (New, 1980).

Para que o crescimento dos crustáceos decorra de forma contínua e sem condicionalismos, a presença de determinados nutrientes na dieta revela-se de extraordinária importância, entre os quais destacam-se as proteínas, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono.

Adicionalmente, acrescenta-se a importância da fase de crescimento da espécie, uma vez que os requisitos nutricionais são altamente específicos e variam ao longo dos estádios de desenvolvimento.

As primeiras abordagens aos requisitos nutricionais de crustáceos decápodes mencionam

que para a espécie *Litopenaeus vannamei* 30-35% da dieta das *post-larvae* deverá conter uma fonte proteica (Colvin & Brand, 1977).

No que diz respeito às fórmulas juvenis da mesma espécie os requisitos rondam os 30% (Colvin & Brand, 1977), ao passo que para os adultos 32% (Kureshy & Davis, 2002; Cuzon *et. al.*, 2004).

Nos estudos realizados por Kureshy & Davis (2002) para a espécie *L. vannamei* foram estimadas exigências diárias em termos proteicos em torno dos 1,8-3,8mg de proteína por grama de peso corporal por dia.

No caso de *Palaemon serratus*, foram registadas elevadas taxas de crescimento em indivíduos cujas dietas alimentares apresentavam valores de proteína bruta entre os 30 e 40% (Hasan, 2001), sendo estes análogos à espécie referida anteriormente.

Nos crustáceos decápodes a correlação entre a proteína ingerida e a sua deposição nos tecidos não é tão elevada como a que se verifica nos vertebrados. Tal deve-se à síntese de quitina, polissacarídeo extremamente importante ao nível da formação do exosqueleto e que contém 43% de equivalentes de azoto na quantificação de proteína bruta (Cuzon, *et. al.*, 2004).

Nos camarões, a proteína representa cerca de 16% da massa corporal. Após a ingestão de alimento, ocorre um aumento de síntese de proteínas e uma diminuição da proteólise, verificando-se um ganho de proteínas e uma consequente preservação das proteínas na massa muscular. Igualmente ao que ocorre nos peixes, apenas 40% de proteína na dieta é retida e 60% perdido ou oxidado (Cuzon *et. al.*, 2004).

Os aminoácidos ocupam uma posição central no metabolismo celular, uma vez que diversas reações bioquímicas são catalisadas por enzimas compostas por aminoácidos e que intervêm ao nível do metabolismo de hidratos de carbono e lípidos, estas são importantes para a síntese de proteínas e assumem-se como fonte alternativa de energia metabólica (Tacon, 1987).

Numa perspetiva nutricional, os aminoácidos encontram-se divididos em dois grupos: aminoácidos essenciais (EAA) e aminoácidos não essenciais (NEAA). Os EAA não são

passíveis de ser sintetizados pelos organismos ou a síntese é insuficiente para suprimir as necessidades fisiológicas exigidas, sendo obtidos através da dieta. Em contrapartida, os NEAA são sintetizados no organismo a partir de uma fonte adequada de carbono e grupos amina, tendo por base outros aminoácidos ou compostos simples (Tacon, 1987).

Para atingir um crescimento equilibrado em *P. serratus*, New (1980) enumerou os aminoácidos essenciais: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina e valina.

O mesmo autor refere ainda como resultados preliminares a exigência de aminoácidos específicos na dieta, incluindo 1,4% de lisina, 1,3% de arginina, 3,0% de metionina e 0,6% de triptofano (New, 1980).

As exigências nutricionais em termos de aminoácidos variam de espécie para espécie. Para duas espécies do género *Penaeus* – *P. japonicus* e *P. paulensis*, Tacon (1987) verificou-se a existência de diferenças entre os valores percentuais de EAA (Tabela III).

Tabela III – Requisitos de aminoácidos essenciais (EAA) em termos percentuais de duas espécies do género *Penaeus* (Adaptado de Tacon, 1987).

EAA	<i>P. japonicus</i> (juvenis) (%)	<i>P. paulensis</i> (juvenis) (%)
Treonina	8,2	6,7
Valina	8,3	13,6
Metionina	5,4	7,0
Isoleucina	8,6	6,9
Leucina	15,0	12,6
Fenilalanina	9,0	9,2
Lisina	15,8	15,4
Histidina	4,5	4,4
Arginina	15,2	14,3
Triptofano	n.a.	n.a.
Cistina	2,1	3,0
Tirosina	7,8	6,7

n.a. – dados indisponíveis.

A deficiência de aminoácidos não conduz a alterações visíveis ou doenças nos camarões, à excepção da erosão da cauda devido à deficiência em triptofano. Contudo esta

condicionante promove igualmente a redução das taxas de crescimento (Cuzon *et. al.*, 2004).

No que diz respeito aos lípidos, estes desempenham um importante papel na dieta de crustáceos incluindo a sua deposição durante a maturação, sendo crucial para a reprodução e o desenvolvimento larvar (Cavalli *et. al.*, 2001).

Além de ser uma importante fonte de energia (Deering *et. al.*, 1997; Lim *et. al.*, 1997) e a principal forma de armazenamento da mesma, os lípidos também fornecem ácidos gordos necessários para manutenção e integridade das membranas celulares (Cavalli *et. al.*, 2001; González-Félix & Perez-Velazquez, 2002), bem como os precursores de esteróides e hormonas (Cavalli *et. al.*, 2001).

Os ácidos gordos das famílias *n*-6 (ácidos gordos polinsaturados - PUFA) e *n*-3 (ácidos gordos altamente insaturados - HUFA) são essenciais na dieta alimentar dos camarões, tendo influência na maximização do seu crescimento (Wouters *et. al.*, 1997; González-Félix & Velazquez, 2002), na eficiência alimentar e sobrevivência. Alguns estudos evidenciam igualmente que os derivados do ácido araquidónico são importantes no processo de muda dos crustáceos, influenciando o seu crescimento (González-Félix & Velazquez, 2002).

Para a espécie *Penaeus monodon*, os requisitos de ácidos gordos essenciais conferem um considerável potencial para o melhoramento do crescimento através de um eficiente restabelecimento dos lípidos totais e ácidos gordos essenciais, entre os quais os ácidos linolénico (18:3n-3), docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3) e eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) (Glencross *et. al.*, 2002).

Os diferentes estudos nesta temática mostram que os ácidos linoleico (18:2n-6) e linolénico são essenciais para um significativo conjunto de espécies, nomeadamente *Penaeus aztecus*, *P. japonicus*, *P. monodon*, *P. merguensis*, *P. indicus*, *P. stylirostris* e *P. serratus* (Lim *et. al.*, 1997; Deering *et. al.*, 1997).

No entanto, os camarões demonstram uma limitação na capacidade de sintetizar dos ácidos gordos das famílias *n*-6 e *n*-3, incluindo os ácidos polinsaturados linoleico e linolénico, araquidónico (20:4n-6), EPA e DHA (González-Félix & Velazquez, 2002).

Diversos autores referem que os camarões podem requerer algumas combinações de ácidos gordos (*n*-3 e *n*-6) na sua dieta de forma a otimizar o seu crescimento. Este aspecto foi evidenciado para *Fenneropenaeus chinensis* e *F. indicus*, alimentados com os ácidos linoleico e linolénico (contendo 0,5% de cada na dieta). Para *P. monodon* definiu-se um rácio ótimo de 2:3 de ácido linoleico e linolénico (González-Félix & Velazquez, 2002).

1.7. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE CRUSTÁCEOS DECÁPODES (1.2)

A composição bioquímica de decápodes sofre variações de acordo com a posição filogenética e os fatores ambientais como a temperatura, a disponibilidade de alimento e a salinidade (Torres *et. al.*, 2002).

No caso da temperatura, esta pode afetar as reservas acumuladas durante o crescimento através de mudanças simultâneas, na taxa de crescimento instantâneo e no tempo de desenvolvimento (Torres *et. al.*, 2002).

As mudanças na composição bioquímica das larvas de crustáceos decápodes foram estudadas em diferentes espécies, tendo demonstrado uma elevada percentagem de proteína (>30%), lípidos (<20%), quitina (<15%) e hidratos de carbono livres (<5%) (Torres *et. al.*, 2002).

Dentro desta composição insere-se o perfil de aminoácidos do músculo, o qual tem sido utilizado como referência para formulação da dieta, embora a preponderância na maioria das dietas de farinha de peixe processado apresentem uma quantidade essencial de aminoácidos para sustentar o crescimento (Tabela IV) (Cuzon *et. al.*, 2004).

Tabela IV – Composição de aminoácidos essenciais na composição do músculo de camarão em percentagem (%) de proteína para a espécie *Litopenaeus vannamei* (adaptado de Cuzon *et. al.*, 2004).

Aminoácido	Valor (%)
Lisina	6,4
Arginina	7,5
Histidina	1,9
Leucina	6,5
Isoleucina	3,6
Valina	3,8
Treonina	3,4
Metionina (Met)	2,6
(Met + cistina)	3,3
Fenilalanina	3,6
Triptofano	1,1

Sob condições de stress nutricional grave, nos camarões ocorre preferencialmente a degradação das fracções lipídicas, enquanto as reservas lipídicas internas podem complementar a insuficiência nutricional no crescimento e morfogénese durante a desnutrição moderada (Torres *et. al.*, 2002).

1.8. OBJECTIVOS DO ESTUDO

As espécies *Palaemon adspersus*, *P. elegans* (Bilgin & Samsun, 2006) e *Palaemonetes antennarius* (Lumare *et. al.*, 2009), são espécies importantes sob o ponto de vista ecológico e económico (Bilgin & Samsun, 2006).

Em termos comerciais, a espécie que representa a maioria dos desembarques em porto de pesca a nível mundial é *P. serratus*, sendo o *P. elegans* a espécie em menor quantidade, com aproximadamente 1% (Fahy *et. al.*, 2006). No entanto e apesar do seu tamanho pequeno, *P. elegans* é altamente valorizada pelos consumidores (Lumare *et. al.*, 2009).

Para além das particularidades do decápoide *P. elegans*, este também possui potencial noutras vertentes de interesse científico e social, entre os quais na promoção da aquacultura

promovendo o cultivo da espécie com fins de repovoamento nas zonas costeiras evitando o declínio da espécie no meio selvagem, assim como a extração de biopolímeros com interesse na indústria farmacêutica e biomédica, nomeadamente quitina e astaxantina.

Face ao exposto anteriormente, este estudo tem como objetivo principal o estudo da variabilidade da composição bioquímica do músculo da espécie *P. elegans* quando sujeita a três dietas diferentes. Pretendeu-se igualmente estimar a acumulação no músculo dos nutrientes fornecidos na dieta e definir a dieta que permita otimizar o seu crescimento em condições de cultivo controlado.

CAPÍTULO II

Metodologia

2.1. CAPTURA DE INDIVÍDUOS SELVAGENS E CRESCIMENTO LARVAR

Entre os meses de março a junho do ano de 2010, foram capturados indivíduos selvagens de *P. elegans* com o auxílio de camaroeiros nas poças de maré das praias rochosas do Abalo e Papoa, ambas situadas no Concelho de Peniche (Figura 3).



Figura 3 – Locais de amostragem utilizados na captura de indivíduos selvagens de *P. elegans* (1 - Praia do Abalo, 2 – Papoa).

Os indivíduos capturados foram transportados para o Laboratório de Aquacultura da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar em Peniche, em recipientes plásticos contendo água salgada do local de amostragem. No laboratório, procedeu-se à separação dos indivíduos capturados por tamanhos e estágios de desenvolvimento (reprodutores e juvenis). Posteriormente, os indivíduos foram aclimatados, sendo para tal colocados no sistema de cultivo descrito detalhadamente no item 3.2.

Por cada tanque do sistema de reprodutores (descrito no item 3.2.) foi colocada uma fêmea, completando um total de 9 fêmeas disponíveis em fase de desova. As fêmeas foram mantidas nos tanques até à desova e alimentadas duas vezes por dia com miolo de mexilhão congelado (*Mytilus galloprovincialis*) em *ad libitum*.

Após desova, as larvas foram retiradas (geração F1), no período mais curto quanto possível evitando assim canibalismo associado e transferidas para um sistema paralelo denominado por sistema de desenvolvimento larvar.

O alimento fornecido às larvas incluía o fornecimento *ad libitum* duas vezes ao dia de

náuplios de artémia (*Artémia* sp.) enriquecidas com Red Pepper® (Bernaqua).

A permanência de *P. elegans* no sistema larvar dava-se até atingirem o estado de crescimento larvar equivalente ao zoea 9 ou *post-larvae* (de acordo com a classificação descrita por Fincham & Figueras, 1986), o que correspondeu aproximadamente ao 30º dia de cultivo.

Decorridos os 30 dias, todas as *post-larvae* eram transferidas para o sistema de crescimento de juvenis (descrito no item 3.3.) até que os ensaios com dietas fossem iniciados.

2.2. SISTEMA DE CULTIVO DE DECÁPODES

O sistema de cultivo de decápodes utilizado no presente estudo contém paralelamente três sistemas individualizados em funcionamento simultâneo e contínuo de água salgada, nomeadamente sistema de reprodutores, desenvolvimento larvar e crescimento de juvenis. Cada um destes sistemas possui a mesma metodologia de funcionamento e a mesma operacionalidade de equipamentos, com a exceção do volume de água e da estrutura/forma dos tanques.

Os tanques referentes ao sistema de reprodutores e no sistema de juvenis eram ambos em vidro e de formato retangular e com um volume total de 15L e 30L, respetivamente. Para o sistema larvar, os tanques apresentavam um formato cilindro-cónico constituídos por fibra de vidro e com um volume máximo de 20L.

Cada um dos sistemas apresentava nove tanques com recirculação fechada de água salgada, a qual era direcionada para uma *sump* de 100L. Toda a água dos sistemas era submetida a uma filtração sequencial, envolvendo filtros de leito de fluido e filtros biológicos (biobolas), culminando na passagem por um escumador de proteínas e desinfeção por UV com potência de 25W.

Para o controlo de temperatura da água do sistema era dotado de um refrigerador e resistência de aquecimento.

Tendo em conta a manutenção da boa qualidade da água, os parâmetros básicos como pH,

amónia, salinidade (35‰), nitratos, nitritos, temperatura e oxigénio foram monitorizados regularmente e mantidos a níveis adequados para sobrevivência dos indivíduos.

2.3. ACLIMATAÇÃO DE JUVENIS

Segundo o que consta no item 2.1. e atingidas as características de *post-larvae* por parte da geração F1, estas eram transferidas para o sistema de juvenis, onde permaneceram em crescimento até à conclusão do ensaio.

No tempo mediante, a colocação dos indivíduos no tanque e o início dos ensaios, estes eram alimentados duas vezes ao dia com ração em *ad libitum* e mantidos a uma temperatura igual a 24°C.

Em cada tanque destinado ao ensaio com dietas foram colocados 40 indivíduos fazendo com que a densidade existente por tanque fosse de 1,5 indivíduos por litro.

2.4. ENSAIOS COM DIETAS

Os ensaios alimentares foram realizados com a utilização de três dietas cujas composições eram diferentes, assim como o modo de apresentação: ração semi-seca, uma ração semi-húmida e miolo de mexilhão congelado.

À excepção do miolo de mexilhão, as rações enunciadas anteriormente foram produzidas em exclusivo de acordo com os critérios definidos entre o GIRM/ESTM e a Empresa Sparos para a realização do ensaio e deste modo, fazer face aos requisitos exigidos para o crescimento da espécie em foco.

A ração semi-seca possuía um formato cilíndrico (denominado por *pellet*), sob a forma de extrudido e com tamanho igual a 2mm. A ração semi-húmida continha uma forma cilíndrica de tamanhos irregulares e o seu armazenamento incluía temperaturas de congelação (aproximadamente, -18°C).

As rações referidas anteriormente continham na sua constituição diferentes ingredientes de

origem proteica e lipídica, promotores do crescimento da espécie, componentes vitamínicos e minerais essenciais para o funcionamento dos órgãos vitais dos camarões. O miolo de mexilhão congelado fornecido como dieta aos indivíduos era da espécie *Mytillus galloprovincialis* e de fácil aquisição nos espaços comerciais comuns.

Na Tabela V transcreve-se a composição percentual dos ingredientes existente na ração fornecida (semi-seca e semi-húmida).

Tabela V – Composição das rações semi-seca e semi-húmida utilizadas nos ensaios alimentares cedida pela Empresa Sparos.

Ingredientes (Matéria Seca)	Valor (%)
Fishmeal 70 LT	17,50
Fishmeal 65	5,00
CPSP 90	5,00
Squid meal	5,00
Soybean meal	13,00
Aquatex G2000	19,50
Wheat meal	20,00
Fish oil	6,00
Vit & Min Premix	2,00
Di-calcium phosphate	1,00
Soy lecithin	1,00
Binder	5,00

Os ensaios decorreram ao longo de 54 dias sucessivos. Para cada dieta em estudo foram realizadas três replicados, no total de 120 indivíduos (40 x 30).

No decorrer de cada ensaio foi avaliado a cada três dias o comprimento dos indivíduos, sendo a medição realizada entre a linha pós-orbital até ao final anterior do telson (Berglund & Bengtsson, 1981; Berglund, 1982) e tido em conta o peso húmido individual.

Com o intuito de fornecer a quantidade de alimento necessário para o desenvolvimento dos indivíduos durante o ensaio procedeu-se à correção da percentagem de alimento semanalmente. Deste modo, a média do peso dos indivíduos medidos era contabilizada e extrapolada a quantidade de alimento a fornecer por dia. Para tal e adaptado de Bautista &

Subosa (1997), Mente *et. al.* (2002) e Palma *et. al.* (2008), o alimento fornecido aos *P. elegans* durante o ensaio considerou 11% do peso corporal dos mesmos, do qual resultaria duas doses diárias de alimento.

Numa visão individual dos ensaios, estes tiveram inícios temporais diferentes, visto que, o stock inicial de indivíduos da geração F1 não era suficiente para desenvolver os três ensaios em simultâneo, bem como a disponibilidade física do Sistema de Cultivo de Decápodes.

Os ensaios designados por 1 e 2 consideraram as rações semi-seca e semi-húmida, respetivamente, onde decorreram em simultâneo tendo início no dia 25 de Outubro de 2011 e término no dia 18 de Dezembro do mesmo ano. Relativamente ao ensaio 3, o alimento fornecido aos *P. elegans* foi miolo de mexilhão congelado, tendo-se iniciado a dia 20 de Janeiro e terminado dia 12 de Março do ano 2011.

Findo cada ensaio, os *P. elegans* foram todos contabilizados e contidos em frascos de plástico apropriados durante um período permanente de três horas em gelo até à medição dos mesmos. Decorrido este tempo, os indivíduos foram submetidos a medição individual do tamanho (Tabela XI em anexo) e pesagem (Tabela XIII em anexo), de igual forma ao referido anteriormente.

Posteriormente, a contabilização de *P. elegans* no final do ensaio permitiu estabelecer relações entre o peso e comprimento, analisar o incremento de peso e taxa de crescimento (Tabela XIV em anexo) e a taxa de sobrevivência (Tabela XV em anexo) obtida para cada dieta em estudo.

Efetuada as análises métricas, a cada indivíduo era retirado o exoesqueleto, cefalotórax e os conteúdos estomacais dos mesmos, tendo como intuito separar o tecido muscular.

O tecido muscular foi colocado numa caixa de Petri devidamente identificada, onde continha o peso dos músculos obtidos de cada tanque e armazenada na câmara de congelação a -80°C, até utilização para as análises bioquímicas. Não obstante, as amostras armazenadas à temperatura referida foram posteriormente submetidas a liofilização de modo a corresponder à especificidade das análises bioquímicas efetuadas, como sendo o perfil lipídico e o perfil de aminoácidos.

Paralelamente ao mencionado para *P. elegans* submetidos a estudo com dietas diferentes, procedeu-se de forma análoga aos indivíduos capturados em meio selvagem nos meses de agosto e setembro dos anos 2010 e 2011. Este grupo de indivíduos capturados em meio selvagem foram considerados neste estudo como grupo controlo relativamente aos demais, para efeitos comparativos nas análises elaboradas.

2.5. ESTIMATIVA DO CRESCIMENTO

O efeito da dieta no crescimento dos juvenis de *P. elegans* foi estimado através da aplicação das seguintes fórmulas específicas para avaliar os parâmetros de crescimento, das quais se destacam o incremento de peso, a taxa de crescimento específico e a taxa de sobrevivência (Habashy, 2009):

Incremento de Peso (Weight gain, WG):

$$WG = \text{peso corporal final (g)} - \text{peso corporal inicial (g)} \quad (\text{Eq.1})$$

Incremento de Peso, % (Weight gain, %):

$$\% WG = WG \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Taxa de Crescimento Específico, SGR (d^{-1}):

A taxa de crescimento específico (SGR) foi estimada através do declive da reta (m) da regressão lineare entre o comprimento (y, mm) de *P. elegans* e o tempo de ensaio (x, dias).

$$y = mx + b \quad (\text{Eq.3})$$

Taxa de sobrevivência (%):

$$\text{Taxa de sobrevivência} = \frac{\text{número de indivíduos final}}{\text{número de indivíduos inicial}} \times 100$$

(Eq.4)

2.6. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Na componente bioquímica deste estudo pretendia-se verificar se o alimento fornecido aos *P. elegans* durante o seu crescimento era revertido para o músculo e deste modo realçar a sua importância nutricional para consumo humano e de outras espécies em meio selvagem e de aquacultura. Para tal, efetuaram-se as mesmas análises às rações fornecidas durante os ensaios e ao músculo dos indivíduos submetidos ao estudo.

Numa forma sucinta, a Figura 4 explicita as técnicas e metodologias desenvolvidas no decorrer da componente bioquímica do estudo.

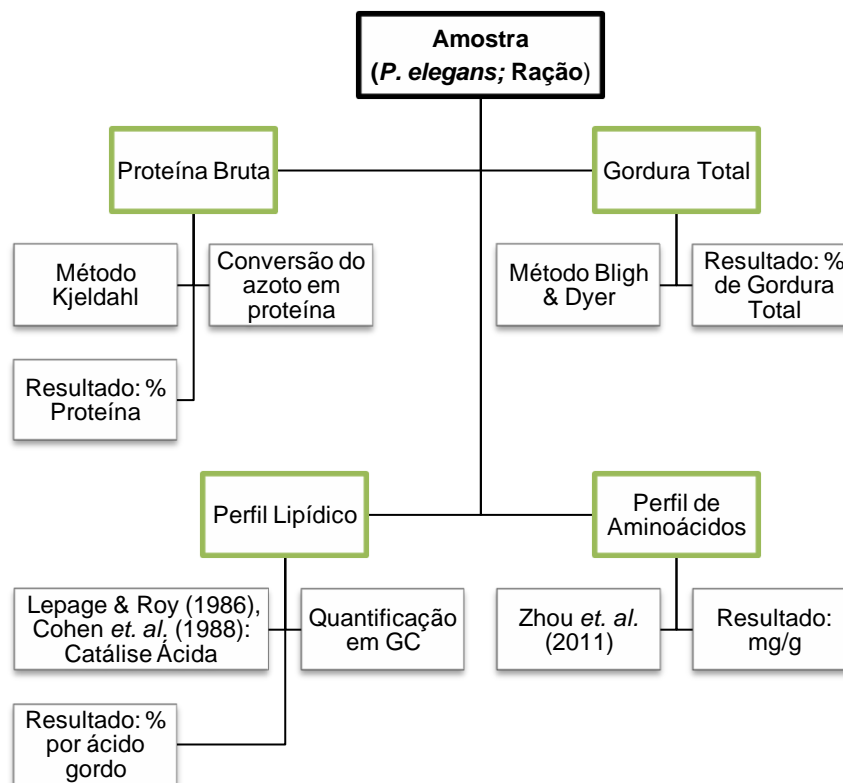


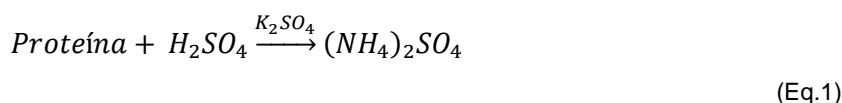
Figura 4 – Técnicas e metodologias aplicadas na análise bioquímica.

2.6.1. PROTEÍNA BRUTA

2.6.1.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

A determinação de proteína pelo método descrito por Kjeldahl pressupõe a quantificação de azoto numa fase inicial e convertida de seguida em percentagem de proteína. Para esta análise recorreu-se ao método analítico descrito por AOAC International (AOAC, 2005), da qual resultaram duas etapas primordiais, a digestão e destilação das amostras.

Na digestão, a amostra é submetida a temperaturas elevadas durante um tempo definido e dissolvida em ácido sulfúrico concentrado com a adição coadjuvantes de reação denominados por catalisadores de sulfato de potássio e selénio. Este processo permite a ocorrência da principal reação química do método que provoca a decomposição e quebra das ligações químicas entre os elementos proteicos por ação do ácido sulfúrico. Desta reação química resulta o sal inorgânico sulfato de amónio, como demonstra a equação abaixo:



Após a digestão das amostras, estas terão convertido o conteúdo inicial em sulfato de amónio, como demonstra a equação (Eq.1). Numa fase posterior, realiza-se a segunda etapa do método a destilação, que consiste na conversão do ião amónio (NH_4^+) em amónia (NH_3) (Foss, 2003). Esta conversão apenas se concretiza se existir na reação química um agente químico alcalino (hidróxido de sódio – NaOH) e a formação de vapor, processo este denominado destilação (Foss, 2003). A receção dos iões libertados da reação química dá-se na solução de ácido bórico a 4%, a qual é submetida a uma titulação de retorno para determinação da quantidade de azoto existente (Foss, 2003).

2.6.1.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A nível analítico a quantificação de azoto envolveu a utilização de duas pastilhas do catalisador Kjeltabs (*Panreac*) em cada tubo Kjeldahl (*Foss*), a pesagem (*Mettler Toledo*, d=0,1mg) aproximadamente de 0,5g da amostra para um filtro de papel (*Whatman* n.º 1). A cada tubo existente adicionaram-se 20mL de ácido sulfúrico (*Panreac*, 96% PA-ISO) e

iniciava-se a digestão no Digestor de Proteína (*Foss – Digestor 2006*) num período máximo de 120 minutos com uma rampa de temperatura inicial de 200°C e final de 400°C. Concretizada esta etapa, foram adicionados 80mL de água destilada a cada tubo e mantidos desta forma até ao momento de análise. A etapa de destilação envolveu a adição de 30mL de ácido bórico a 4% num erlenmeyer e a colocação do mesmo no equipamento, bem como a introdução do tubo de Kjeldahl no capilar plástico adjacente. Finalizados os 6 minutos definidos como padrão para a ocorrência da destilação, o conteúdo existente no erlenmeyer foi titulado com ácido clorídrico a 0,1M.

2.6.2. GORDURA TOTAL

2.6.2.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

A quantificação da gordura total de uma amostra poderá efetuar-se de diferentes formas, consoante o objetivo da sua extração. Visto que, a gordura obtida desta análise seria necessária para realizar a análise do perfil lipídico recorreu-se à extração de gordura total líquida-líquida a frio. A conformação e agregação dos lípidos entre si podem conferir uma extração com elevada complexidade, pois este processo depende da sua polaridade e solubilidade em solventes orgânicos (*Manirakiza et. al, 2001; Smedes & Askland, 1999*). Desta forma, a aplicação de misturas de solventes com polaridades diferentes é recorrente e necessário para que haja a maior extração lipídica. Com este fim, considerou-se o método descrito por *Bligh & Dyer (Manirakiza et. al., 2001)*, com pequenas alterações elaboradas por *Bandarra et. al (2006)*.

De salientar que, esta quantificação apenas foi considerada para as rações utilizadas para as dietas dos crustáceos em estudo. Este facto deve-se à pequena quantidade de gordura expectável dos *P. elegans*, não permitindo auferir com exatidão este constituinte. Deste modo, a quantidade de gordura total das amostras será quantificável através da percentagem relativa dos ácidos gordos analisados.

2.6.2.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Para a quantificação de gordura foi necessário pesar rigorosamente 10g de amostra em balança analítica (*Mettler Toledo, d=0,1mg*) e adicionar 30mL de metanol:clorofórmio (2:1)

(*Fisher Scientific*, HPLC grade/Analytical reagent grade), com homogeneização posterior durante 5 minutos. Numa etapa subsequente, adicionaram-se 4mL de solução saturada de cloreto de sódio em agitação contínua, 10 mL de clorofórmio e 10mL de água (*Fisher Scientific*, HPLC grade). A mistura formulada foi homogeneizada durante 5 minutos e colocada num banho de ultra-sons (*VWR*) durante o mesmo tempo. O conteúdo existente no *goblet* foi filtrado através de papel de filtro (*Whatman*, n.º 40) e transferido o filtrado para uma ampola de decantação. A fase orgânica foi recolhida para um papel de filtro (*Whatman*, n.º40) com sulfato de sódio anidro (*Panreac*, Reag. USP; PA-ACS-ISO) e filtrado para um balão periforme de 10mL previamente pesado. O solvente orgânico existente na mistura foi evaporado por meio de um rotavapor (*Heidolph Laborotta 4000-efficient*) à temperatura máxima de 40°C. O processo analítico determinou-se como concluído aquando da pesagem rigorosa do balão periforme de 10mL com a gordura extraída (Manirakiza *et. al.*, 2001; Bandarra *et. al.*, 2006).

2.6.3. PERFIL LIPÍDICO

2.6.3.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

A análise de ácidos gordos determina uma sequência de etapas morosas e complexas, que compreendem a extração com solventes, purificação, hidrólise e derivatização (Lepage & Roy, 1986). Neste seguimento, Lepage & Roy (1986) desenvolveram uma técnica que permite ultrapassar as limitações causadas por este processo numa só etapa, a transesterificação. Este processo químico designa uma importante classe de reações orgânicas, onde ocorre a troca de um grupo ou radical por um grupo metilo, sendo desta forma necessário introduzir uma mistura de reagentes, dos quais a adição de um agente catalisador (ácido ou base forte, no presente caso a mistura de cloreto de acetilo e metanol) promovendo a aceleração e equilíbrio à reação (Gunstone, 2001).

Tendo em conta o supracitado, o procedimento analítico englobou a introdução de uma catálise ácida nas amostras em estudo com seguida injeção em cromatógrafo gasoso (GC) para verificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos. Como referido na análise 2.6.2., a extração da gordura total das amostras de ração teve um processo sequencial terminando na transesterificação para obtenção do perfil lipídico das mesmas.

No entanto e como referido anteriormente, às amostras de crustáceos não foi possível aplicar o mesmo processo sequencial pela ausência de gordura justificável, pelo que procedeu-se à liofilização e aplicou-se a mesma metodologia.

2.6.3.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Conforme descrito por Lepage & Roy (1986), o procedimento analítico efetuado envolveu a pesagem rigorosa (*Mettler Toledo Classic*, $d=0,1\text{mg}$) de 300mg de amostra liofilizada liofilizada para tubo de vidro roscado e a adição de 5mL da mistura de cloreto de acetilo (1:19) (*Acros*, 98%; *Fisher Scientific*, HPLC Grade). A mistura formulada da etapa anterior foi homogeneizada em vórtex durante 30 segundos e colocada em banho-maria a 80°C durante 1 hora. Decorrido o tempo estipulado, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente até que a mesma fosse atingida, com adição posterior de 1mL de água de HPLC (*Fisher Scientific*, HPLC gradient grade) e 2mL de *n*-heptano (*Fluka*, $\geq 99,5\%$). As soluções formuladas no decorrer da fase anterior foram submetidas a agitação por vórtex durante 1 minuto e a centrifugação a 1500g durante 5 minutos. Por fim, a fase orgânica foi recolhida para vial com *micro-insert* (*Thermo Unicam*) e dependendo da quantidade lipídica existente na amostra esta poderia sofrer diluição com *n*-heptano.

O conteúdo lipídico existente nas amostras foi analisado em cromatógrafo gasoso Finnigan Trace GC Ultra com Autosampler AS 3000 da marca *Thermo Electron Corporation*. A coluna cromatográfica Trace TR-FAME acoplada ao cromatógrafo possui as seguintes dimensões: 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme da marca *Thermo Electron Corporation*. No *software* do equipamento mencionado foram adicionadas as seguintes de condições de operação:

1. Forno:

- a. Temperatura inicial: 60°C durante 1 minuto.
- b. Rampa 1: aumento de 15°C min^{-1} até aos 150°C, mantém 1 minuto a essa temperatura.
- c. Rampa 2: aumento de 5°C min^{-1} até aos 220°C, mantém 10 minutos a essa temperatura.

2. Injetor:

- a. Temperatura: 250°C.
- b. Modo: *splitless*.

- c. Volume de amostra injectado: 1 μ L.
- d. Gás de arraste: hélio com um caudal de 1,5mL/min.

3. Detetor: FID

- a. Temperatura: 260°C.
- b. Caudal de ar: 350mL min⁻¹.
- c. Caudal de hidrogénio: 355mL min⁻¹.

4. Tempo de análise: 35 minutos.

2.6.4. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

2.6.4.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO

A estrutura dos aminoácidos não possuem ligações duplas conjugadas, pelo que o comprimento de onda utilizado na gama de UV não poderá ser demasiado baixo devido à dificuldade na detecção de aminoácidos. No entanto, o grupo amina presente na estrutura básica de um aminoácido é facilmente derivatizado com uma elevada diversidade de produtos, sendo no presente estudo utilizado o reagente de derivatização 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl) (Zhou *et. al.*, 2011). A reação efectuada para a determinação de aminoácido é traduzida na seguinte Figura:

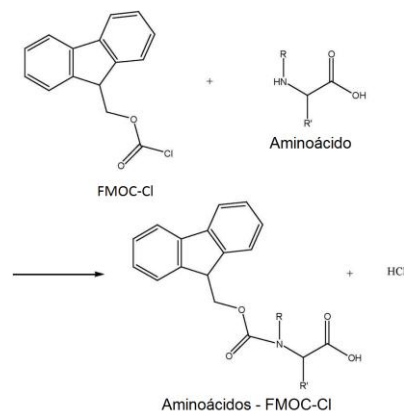


Figura 5 – Fórmula geral da reação com os aminoácidos presentes.

2.6.4.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

No procedimento analítico do perfil de aminoácidos foram consideradas as indicações

descritas por Zhou e colaboradores (2011) e introduzidas algumas alterações, as quais englobaram a pesagem, rigorosa, de 0,3g de amostra (*Mettler Toledo*, d=0,1mg) e efetuada a extração de seguida com 15mL de água para HPLC (*Fisher Scientific*, HPLC gradient grade) num banho de água de ultrassons durante 1hora. Após a extração, a solução foi filtrada sob vácuo através de um filtro (*Whatman*, Potran BA85 Nitrocellulose), submetido de seguida a centrifugação a 2000g durante 10 minutos em tubo de falcon de 15mL e o sobrenadante límpido resultante foi transferido para um similar ao inicial. Todas as amostras foram submetidas a filtração através de um filtro de 0,2µm.

A derivatização das amostras em microtubo de 2mL (*Sarstedt*) incluiu a diluição de 50µL da amostra em 100µL de acetonitrilo (*VWR*, HiPerSolv Chromanorm Prolabo for HPLC gradient grade) e subsequente homogeneização dos mesmos. Após a mistura, a solução foi misturada ao vórtex durante 1 minuto e ajustado o pH com a adição de 50µL de tampão borato (tetraborato de sódio, *Panreac*) com uma concentração de 40mM em água e pH de 9,2 e adicionados 50µL de FMOCCl (*Fluka*, ≥99,0%) com uma concentração de 10mM em acetonitrilo e mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos.

De forma a compreender os aminoácidos existentes nas amostras de *P. elegans* e respetivas rações, procedeu-se a elaboração de curvas de calibração dos mesmos, dos quais enumeram-se a L-arginina (*Merck*, ≥99%), L-leucina (*Merck*, ≥99%), L-prolina (*Merck*, ≥99%), ácido L-glutâmico (*Aldrich Chemistry*, ≥98%), glicina (*Riedel-de Haën*, Reag. Ph. Eur., 99,1-101%), L-alanina (*Sigma Aldrich*, 99%) e L-asparagina (*Merck*, ≥99%). Para todas as curvas de calibração consideradas foram tidas em conta um patamar de concentrações compreendido entre 25mM a 175mM, tendo como procedimento de derivatização similar ao descrito anteriormente para as amostras.

O cromatógrafo líquido de alta precisão (HPLC) (*Merck Hitachi*, LaChrom Elite) utilizado para as análises de perfil de aminoácidos era constituído por um detector de UV-visível Diode Array Detector L-2450 (*Hitachi, Merck*), uma bomba L-2130 Elite LaChrom (*Hitachi, VWR*), um autosampler L-2200 Elite LaChrom com capacidade para 200 vials (*Hitachi, VWR*) e a coluna acoplada era LiChromCART® 250-4 – HPLC Cartridge – Purospher® STAR RP-18 endcapped (5µm) (*Merck*). O equipamento era dotado de um software operacional com a versão 3.1.7. da marca EZChrom Elite Cliente/Server.

No *software* do equipamento mencionado foram adicionadas as seguintes de condições de

operação:

1. Fase Móvel:

- a. Acetonitrilo (VWR, HiPerSolv Chromanorm Prolabo for HPLC gradient grade).
- b. Solução de acetato de sódio (Merck, ≥99%) a 50mM (pH de 4,15 ajustado com ácido fosfórico (*Panreac*)).

2. Gradiente de Eluição:

- a. 0-30 minutos – A:B (28:72, v/v) para 50:50 (v/v)
- b. 30:37 minutos – A:B (50:50, v/v) para 58:42 (v/v)
- c. 37:38 minutos – A:B (58:42, v/v) para 68:32 (v/v)
- d. 38:44 minutos – A:B (68:32, v/v) para 76:24 (v/v)
- e. 44:45 minutos – A:B (76:24, v/v) para 85:15 (v/v)
- f. 45:54 minutos – A:B (85:15, v/v)

3. **Tempo de análise:** 60 minutos.

4. **Taxa de fluxo:** 1,0 mL min⁻¹.

5. **Comprimento de onda de deteção:** 263nm.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística aplicada neste estudo teve em consideração diferentes modelos estatísticos de acordo com os resultados auferidos por análise elaborada, tendo por base a média com o erro padrão de medição (\pm SE).

De forma a relacionar o comprimento (mm) e o peso húmido (g) de *P. elegans* foi aplicada uma equação potencial descritiva do tipo, $y = ax^b$ (Janas & Mańkucka, 2010).

Posteriormente e para efeitos estatísticos, as variáveis dependentes e independentes foram submetidas a logaritmização de forma a converter os dados para uma função linear do tipo $\log y = \log a + b \cdot \log x$ (onde a , é a ordenada na origem e b , o declive da recta) (Janas & Mańkucka, 2010). Com esta análise pretendeu-se estimar a existência de diferenças significativas entre as populações selvagens e cativo.

As diferenças estatísticas entre a e b foram determinadas através da ANCOVA de um fator e um *post-hoc* para comparação múltipla com o teste Tukey's, considerando para o efeito as diferenças estatísticas $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$.

O efeito da dieta no incremento de peso, taxa de crescimento e taxa de sobrevivência de *P. elegans* foi avaliado através da aplicação da ANOVA de um fator e do teste Tukey's apenas para o segundo item avaliado, considerando para o efeito as diferenças estatísticas $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$.

Diferenças ao nível do conteúdo proteico, lipídico e de aminoácidos das rações (dietas alimentares) foram avaliadas através da ANOVA de um fator seguida de teste Tukey's.

Por forma a avaliar o efeito da dieta na composição bioquímica do músculo de *P. elegans* em termos de proteína total, conteúdo lipídico e aminoácidos, foi aplicada uma ANOVA de um fator seguida de teste Dunnett's.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS versão 18.0.

CAPÍTULO III

Resultados

3.1. CRESCIMENTO DE JUVENIS

3.1.1. EFEITO DA DIETA NA RELAÇÃO TAMANHO *VERSUS* PESO

Para as três dietas utilizadas no presente estudo, foi verificada uma elevada correlação entre o comprimento (mm) e o peso húmido (mg) ($R^2 > 0,8$) (Figura 6).

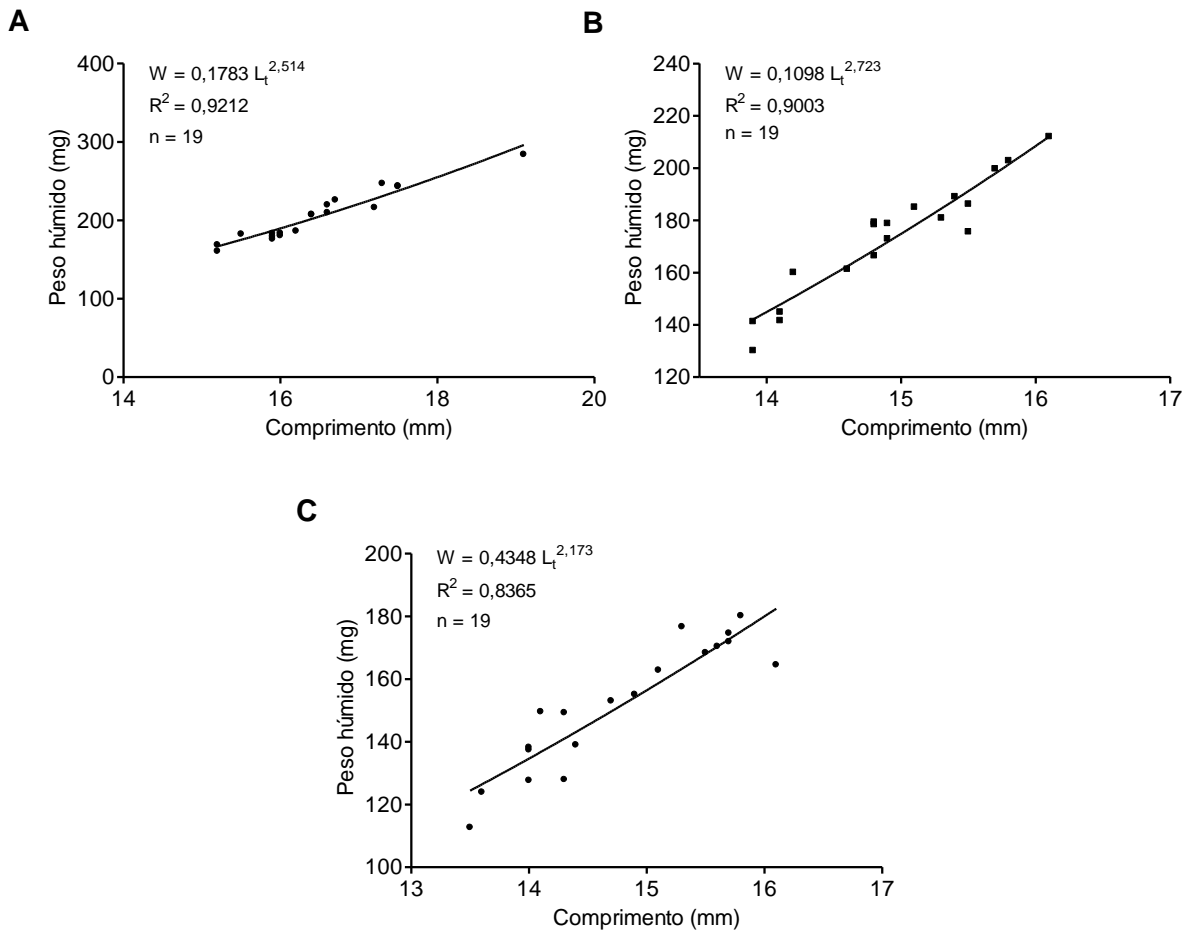


Figura 6 – Relação tamanho-peso para juvenis de *P. elegans* alimentados com (A) miolo de mexilhão (RM), (B) ração semi-seca (RSS) e (C) ração semi-húmida (RSH) (W = peso húmido, L_T = comprimento).

De modo a avaliar a existência de diferenças entre as relações obtidas para as 3 dietas, procedeu-se à sua linearização (transformação logarítmica) e aplicação de uma ANCOVA. Os resultados obtidos demonstraram a existência de diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os declives tendo-se verificado através de teste Tukey's que $PeM > PeSS > PeSH$.

Relativamente ao grupo controlo (*P. elegans* capturados em meio selvagem, PeS), não foi demonstrada a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes momentos de captura ($P < 0,001$), pelo que foi definida uma única relação peso húmido vs. comprimento, tendo por base a totalidade dos indivíduos amostrados nos anos 2010 e 2011 (Figura 7). Deste modo, tendo por base indivíduos selvagens foi definida a seguinte relação $W = 0,03855 L_T^{2,989}$, $R^2 = 0,97$, em que W é o peso húmido (mg) e L_T o comprimento (mm).

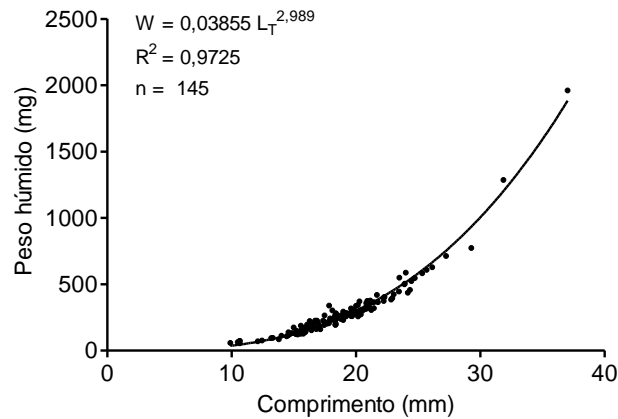


Figura 7 – Relação tamanho-peso para juvenis de *P. elegans* capturados em meio selvagem nos anos de 2010 e 2011. (W = peso húmido, L_T = comprimento).

Tendo como intuito comparar as relações tamanho-peso obtidas para o grupo de controlo (*P. elegans* selvagens) e para as diferentes dietas alimentares, procedeu-se à análise covariância (ANCOVA) tendo por base os dados biométricos logaritmizados. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças entre o grupo controlo e a dieta mexilhão ($P > 0,05$). Por outro lado, os declives referentes a PeSS (ração semi-seca) e a PeSH (ração semi-húmida), demonstraram ser significativamente inferiores ao controlo ($P < 0,05$).

3.1.2. EFEITO DAS DIETAS NO CRESCIMENTO

3.1.2.1. INCREMENTO EM PESO

A Figura 8 representa o incremento em peso de juvenis de *P. elegans* de acordo com as dietas fornecidas durante 54 dias de ensaio.

Através da sua análise, verifica-se valores mais elevados no caso dos indivíduos

alimentados com miolo de mexilhão ($10,04\% \pm 1,516$). As dietas com ração semi-seca e semi-húmida apresentam uma percentagem de $6,12\% \pm 0,993$ e $6,28\% \pm 0,796$, respetivamente.

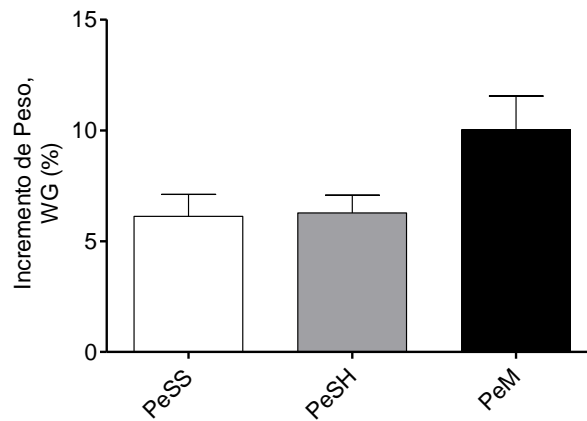


Figura 8 – Efeito da dieta no incremento em peso de juvenis de *P. elegans* submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).

No entanto, a aplicação da ANOVA não demonstrou diferenças significativas entre os incrementos de peso ($P > 0,05$).

3.1.2.2. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO (SGR)

Na Figura 9 estão representadas as variações de comprimento (mm) ao longo do tempo de cultivo dos juvenis de *P. elegans* registadas para as 3 dietas. Pelo declive da respetiva relação linear foi estimada a taxa de crescimento específica para cada dieta alimentar, a qual foi posteriormente comparada através de análise de covariância (ANCOVA).

Pelos resultados obtidos, verificou-se que os indivíduos alimentados com a ração semi-húmida atingiram uma taxa de crescimento específico (SGR) igual a $0,044 \text{ d}^{-1}$. Para as restantes dietas alimentares, os valores de SGR foram de $0,036 \text{ d}^{-1}$ e $0,038 \text{ d}^{-1}$, respetivamente para PeSS e PeM.

A análise ANCOVA demonstrou a existência de diferenças significativas ($P < 0.001$) entre todas as SGR, de tal modo que a ração semi-húmida foi aquela proporcionou uma maior taxa de crescimento.

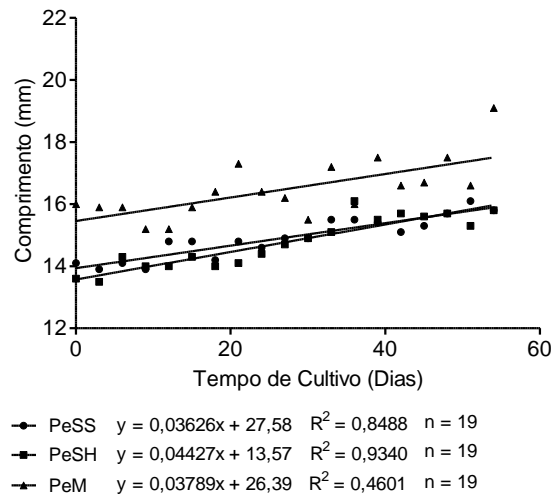


Figura 9 – Relação do comprimento (mm) e o tempo de cultivo (dias) de *P. elegans* para as três dietas utilizadas (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).

3.1.2.3. TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

A Figura 10 representa a taxa de sobrevivência de *P. elegans* alimentados com as três dietas, das quais se verificou uma taxa de $95,8 \pm 0,83\%$ para os *P. elegans* alimentados com a ração semi-seca e $85,0 \pm 2,50\%$ e $87,5 \pm 1,44\%$ para a ração semi-húmida e miolo de mexilhão, respetivamente.

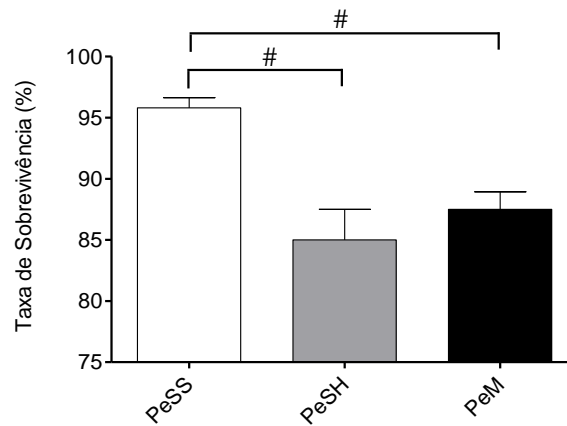


Figura 10 – Taxa de sobrevivência (%; valor médio \pm SE) de juvenis de *P. elegans* submetidos a 3 dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e ao longo de 54 dias do ensaio. Diferenças significativas a um nível de significância $P < 0,05$ indicadas na figura com símbolo (#).

Com a análise estatística efetuada verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre grupos com alimentações diferentes, da qual conferiu um nível de significância de 0,05% para os dados comparativos entre os *P. elegans* alimentados com PeSS com as demais rações fornecidas.

De entre as taxas de sobrevivência associadas às diferentes dietas alimentares utilizadas no presente estudo, a ração semi-seca (PeSS) foi aquela que apresentou valores significativamente mais elevados (ANOVA, $P < 0.05$).

3.2. PROTEÍNA BRUTA

3.2.1. QUANTIDADE DE PROTEÍNA NAS RAÇÕES

A proteína existente nas rações fornecidas nos ensaios descritos consta na Figura 11, a qual demonstra superioridade da ração semi-seca ($49,55 \pm 0,761\%$) relativamente às restantes. As demais rações possuíam valores percentuais de $42,77 \pm 0,368$ e $15,18 \pm 0,143$ para ração semi-húmida (RSS) e mexilhão (RM), respetivamente.

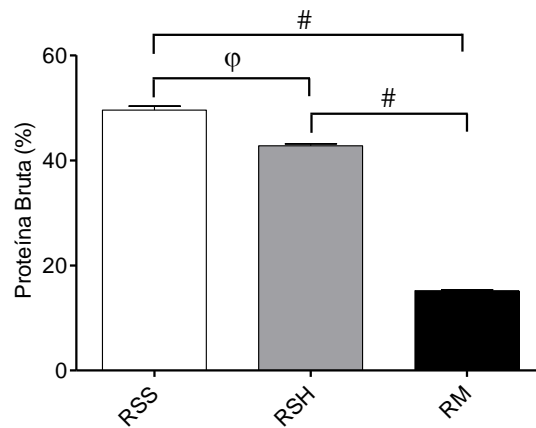


Figura 11 – Conteúdo em proteína bruta (% , valor médio \pm SE) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida). Diferenças significativas a um nível de significância $P < 0,05$ indicadas na figura com o símbolo (ϕ , #).

A análise estatística aplicada indicou a existência de diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,001$) entre os pares de RSS e a RSH; RSS e RM e, RSH e RM.

3.2.2. QUANTIDADE DE PROTEÍNA EM *P. ELEGANS*

A quantidade proteica bruta (Figura 12) em *P. elegans* demonstrou valores similares para as dietas PeSH (24,76 \pm 0,529%), PeSS (24,41 \pm 0,425%) e camarões capturados em meio selvagem (PeS) (23,04 \pm 0,450%), tendo valores significativamente inferiores sido registrados nos indivíduos alimentados com RM (15,33 \pm 0,474%).

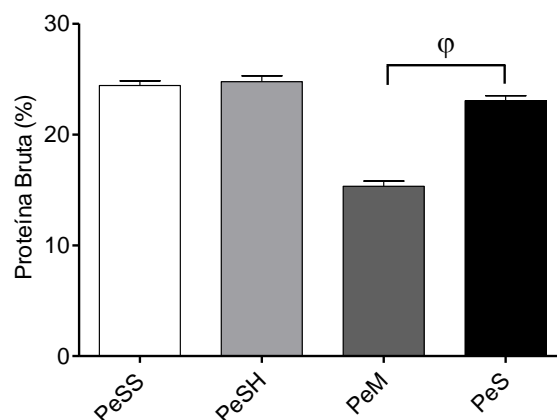


Figura 12 – Conteúdo em proteína bruta (% , valor médio \pm SE) de juvenis de *P. elegans* submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e de

indivíduos capturados em meio selvagem (PeS). Diferenças significativas a um nível de significância $P < 0,05$ indicadas na figura com o símbolo (φ).

A aplicação de análise estatística aos dados da Figura 12 evidenciou diferenças estatisticamente significativas, com um nível de significância de 0,001%, entre PeM e PeS.

3.3. GORDURA TOTAL

3.3.1. QUANTIDADE DE GORDURA TOTAL NAS RAÇÕES

Na Figura 13 constam os valores de gordura total existente nas três rações fornecidas a *P. elegans*, onde se ressalva a maior quantidade para a RSS (9,1258±0,3577%) e com menor expressão percentual para RSH (5,34±0,755) e RM (1,50±0,141%).

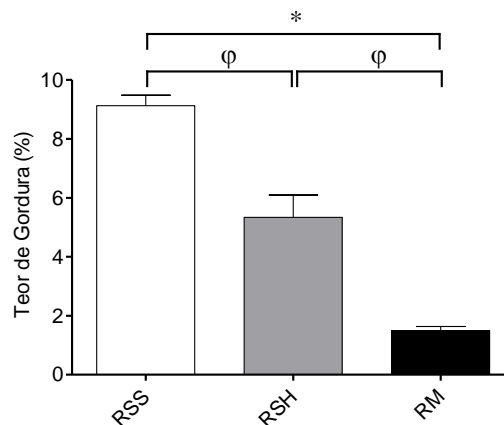


Figura 13 – Conteúdo em gordura total (% , valor médio ± SE) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida). Diferenças significativas a um nível de significância $P < 0,05$ indicadas na figura com o símbolo (*).

Com o tratamento estatístico aplicado aos dados existentes na Figura 13 resultou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as rações RSS e RM.

3.3.2. QUANTIDADE DE GORDURA TOTAL EM *P. ELEGANS*

O teor de gordura em *P. elegans*, presente na Figura 14, não apresenta diferenças notórias entre as dietas fornecidas durante 54 dias e os *P. elegans* capturados em meio ensaio,

excepto um ligeiro decréscimo evidenciado por PeSS.

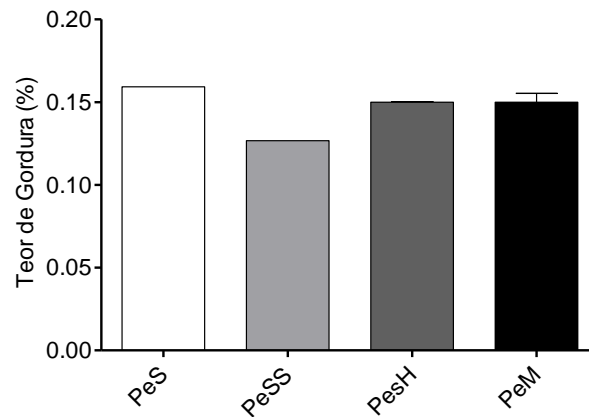


Figura 14 – Conteúdo em gordura total (%; valor médio \pm SE) de juvenis de *P. elegans* submetidos a três dietas diferentes (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS).

3.4. PERFIL LIPÍDICO

3.4.1. PERFIL LIPÍDICO EM RAÇÕES

Na Tabela VI consta a composição de ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso húmido) das rações fornecidas a *P. elegans*, da qual apenas se constata uma diferença estatisticamente significativa entre RSS e RSH ($P < 0,05$), através de aplicação da anova de um fator e um teste de múltipla comparação com o teste Tukey's.

Tabela VI – Composição em ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso húmido) das rações oferecidas como dietas alimentares (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida).

ÁCIDO GORDO	DIETA		
	RSS	RSH	RM
14:0	2,502 \pm 0,0208	1,664 \pm 0,0519	2,365 \pm 0,0326
16:0	0,171 \pm 0,0326	0,084 \pm 0,0258	0,152 \pm 0,0249
16:1 <i>n</i> -7	0,345 \pm 0,0322	0,225 \pm 0,0233	0,375 \pm 0,0566
16:2 <i>n</i> -4	0,404 \pm 0,0042	0,173 \pm 0,0042	0,367 \pm 0,0122
16:3 <i>n</i> -4	5,278 \pm 0,3222	9,620 \pm 0,4693	5,416 \pm 0,0495
18:1 <i>n</i> -9	1,004 \pm 0,0086	1,044 \pm 0,3862	0,804 \pm 0,0159
18:2 <i>n</i> -6	0,205 \pm 0,0196	0,998 \pm 0,0240	0,216 \pm 0,0092
18:3 <i>n</i> -3	0,348 \pm 0,0216	0,133 \pm 0,0739	0,295 \pm 0,0347
20:1 <i>n</i> -9	1,988 \pm 0,0003	1,871 \pm 0,0980	2,046 \pm 0,0433
20:5 <i>n</i> -3	5,388 \pm 0,0637	3,324 \pm 0,1076	5,382 \pm 0,0219
C22:5 <i>n</i> -3	2,652 \pm 0,0498*	2,103 \pm 0,1593	2,817 \pm 0,0290
22:6 <i>n</i> -3	7,228 \pm 0,1236	6,127 \pm 0,1094	7,144 \pm 0,0169
Σ Saturados ^a	2,672 \pm 0,0534	1,029 \pm 0,0153	0,412 \pm 0,0094
Σ Monoinsaturados ^b	3,337 \pm 0,0410	1,838 \pm 0,2970	0,528 \pm 0,0048
Σ Polinsaturados ^c	21,502 \pm 0,0398	13,156 \pm 0,2817	3,456 \pm 0,0142
Σ Altamente insaturados ^d	15,616 \pm 0,2586	6,840 \pm 0,0094	2,563 \pm 0,0096
Σ <i>n</i> -3	15,616 \pm 0,2586	6,840 \pm 0,0094	2,562 \pm 0,0096
Σ <i>n</i> -6	0,205 \pm 0,0196	0,584 \pm 0,0140	0,035 \pm 0,0015
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	21,028 \pm 1,6654	1,879 \pm 0,0477	3,262 \pm 0,1509
DHA/EPA	0,367 \pm 0,0019	0,296 \pm 0,0043	0,060 \pm 0,0004
Σ Total Ácidos Gordos	27,512 \pm 0,1342	16,023 \pm 0,000	4,487 \pm 0,0000

Dados apresentados com a média \pm SEM de duas experiências independentes e com o símbolo (*) a representar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre a RSS e RSH.

^a Saturados: 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 19:0, 20:0 e 22:0. ^b Monoinsaturados: 16:1*n*-7, 17:1*n*-8, 18:1*n*-9, 18:1*n*-7, 20:1*n*-9, 20:1*n*-7, 22:1*n*-11 e 22:1*n*-9. ^c Polinsaturados: 18:2*n*-6, 18:3*n*-6, 18:3*n*-3, 20:2*n*-6, 20:3*n*-3 e 20:3*n*-6. ^d Altamente insaturados: 16:4*n*-3, 18:4*n*-3, 20:4*n*-6, 20:4*n*-3, 20:5*n*-3, 22:4*n*-6, 22:5*n*-6, 22:5*n*-3 e 22:6*n*-3.

3.4.2. PERFIL LIPÍDICO EM *P. ELEGANS*

De forma a verificar a composição lipídica nos indivíduos de *P. elegans* alimentados com as diferentes dietas procedeu-se à análise do perfil lipídico, bem como da comparação com o grupo controlo (Pes) (Tabela VII). A aplicação da anova de um fator e o teste Dunnett's permitiu verificar que existem diferenças pontuais ($P < 0,05$) entre as diferentes dietas

fornecidas a *P. elegans*, nomeadamente nos ácidos gordos C14:0, C16:0, C18:3n-3 e C20:5n-3.

Tabela VII – Composição em ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) de juvenis de *P. elegans* submetidos a três dietas diferentes e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS).

ÁCIDO GORDO	DIETA			
	PESS	PESH	PEM	PES
14:0	0,0169 \pm 0,00014*	0,0128 \pm 0,00050	0,0164 \pm 0,00292*	0,0297 \pm 0,00061
16:0	0,3892 \pm 0,00143	0,4371 \pm 0,00168*	0,4695 \pm 0,01656	0,3677 \pm 0,00401
16:2n-4	0,0184 \pm 0,00041	0,0233 \pm 0,00065	0,0236 \pm 0,00035	0,0269 \pm 0,00153
18:1n-9	0,3275 \pm 0,00312	0,4844 \pm 0,00035	0,4946 \pm 0,00177	0,3403 \pm 0,00153
18:3n-4	0,0333 \pm 0,00026	0,0303 \pm 0,00209	ND	0,0084 \pm 0,00199
18:3n-3	0,0145 \pm 0,00109	0,0199 \pm 0,00245*	ND	0,0299 \pm 0,00085
C20:1n-9	0,0157 \pm 0,00070	0,0173 \pm 0,00145	0,0207 \pm 0,00418	0,0248 \pm 0,00497
20:4n-6	0,0177 \pm 0,00025	0,0175 \pm 0,00136	0,0296 \pm 0,01281	0,0712 \pm 0,00056
20:5n-3	0,2013 \pm 0,00010*	0,2078 \pm 0,00125*	0,2681 \pm 0,05031	0,4050 \pm 0,00628
22:6n-3	0,2323 \pm 0,00334	0,2497 \pm 0,00125	0,2389 \pm 0,02183	0,2892 \pm 0,00007
Σ Saturados ^a	0,4061 \pm 0,00066	0,4499 \pm 0,00218	0,4859 \pm 0,01947*	0,3974 \pm 0,00462
Σ Monoinsaturados ^b	0,3433 \pm 0,00139	0,5017 \pm 0,00110	0,5153 \pm 0,00595	0,3651 \pm 0,00345
Σ Polinsaturados ^c	0,0662 \pm 0,00072	0,0735 \pm 0,00029*	0,0236 \pm 0,00035	0,0651 \pm 0,00072
Σ Altamente insaturados ^d	0,4670 \pm 0,00261	0,4877 \pm 0,00209	0,5071 \pm 0,02848	0,7026 \pm 0,00819
Σ n-3	0,4481 \pm 0,00555	0,4773 \pm 0,00245	0,5071 \pm 0,02848	0,7241 \pm 0,00705
Σ n-6	0,0177 \pm 0,00053*	0,0175 \pm 0,00136*	0,0296 \pm 0,01281*	0,0712 \pm 0,00056
n-3/n-6	0,3217 \pm 0,01368	0,4117 \pm 0,03003	0,3089 \pm 0,11942	0,1619 \pm 0,00031
DHA/EPA	0,0146 \pm 0,00051	0,0180 \pm 0,00020	0,0141 \pm 0,00387	0,0114 \pm 0,00018
Σ Total Ácidos Gordos	0,8157 \pm 0,00707	1,0251 \pm 0,00136	1,0249 \pm 0,02578	0,8276 \pm 0,00676

Dados apresentados com a média \pm SEM de duas experiências independentes e com o símbolo (*) a representar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) comparativamente ao grupo controlo (PeS).

^a Saturados: 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 19:0, 20:0 e 22:0. ^b Monoinsaturados: 16:1n-7, 17:1n-8, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 20:1n-7, 22:1n-11 e 22:1n-9. ^c Polinsaturados: 18:2n-6, 18:3n-6, 18:3n-3, 20:2n-6, 20:3n-3 e 20:3n-6. ^d Altamente insaturados: 16:4n-3, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-6, 22:5n-3 e 22:6n-3.

3.5. PERFIL DE AMINOÁCIDOS

3.5.1. PERFIL DE AMINOÁCIDOS NAS RAÇÕES

Na Tabela VIII constam aos aminoácidos livres quantificados no presente estudo para as

dietas fornecidas a *P. elegans* (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida), onde se constata diferenças estatísticas ($P < 0,05$) para os aminoácidos prolina e leucina, através da aplicação da anova de um fator e teste Tukey's.

Tabela VIII – Perfil de Aminoácidos livres (mg/g de peso húmido) das rações oferecidas como dietas alimentares. Dados apresentados com a média \pm SEM de duas experiências independentes e com o símbolo * a representar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre RSS e RM; (#) RSS e RM; e, (φ) RSH e RM.

AMINOÁCIDO LIVRES	DIETA		
	RSS	RSH	RM
Arginina	0,133 \pm 0,0007	0,133 \pm 0,0000	0,162 \pm 0,0023
Ácido Glutâmico	6,039 \pm 0,0840	ND	ND
Glicina	0,435 \pm 0,0115	ND	0,504 \pm 0,0130
Alanina	1,032 \pm 0,0706	0,644 \pm 0,0225	2,085 \pm 0,1193
Prolina	0,900 \pm 0,0611 [#]	1,093 \pm 0,0200 ^{φ}	1,035 \pm 0,0705 ^{# φ}
Leucina	0,326 \pm 0,0690*	0,339 \pm 0,0100	0,363 \pm 0,0336*
TOTAL	8,865 \pm 0,2969	2,209 \pm 0,0525	4,149 \pm 0,2387

3.5.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS EM *P. ELEGANS*

O perfil de aminoácidos livres de *P. elegans* submetidos a diferentes dietas (RM – mexilhão, RSS – ração semi-seca e RSH – ração semi-húmida) permitiu apenas evidenciar diferenças estatísticas ($P < 0,05$) no aminoácido prolina para PeSS e PeM comparativamente com PeS, após a aplicação da anova um fator e do teste Tukey's.

Tabela IX – Perfil de Aminoácidos livres (mg/g de peso seco) de juvenis de *P. elegans* submetidos a três dietas diferentes e de indivíduos capturados em meio selvagem (PeS). Dados apresentados com a média±SEM de duas experiências independentes e com o símbolo (*) a representar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) comparativamente com PeS.

AMINOÁCIDO LIVRES	DIETA			
	PESS	PESH	PEM	PES
Arginina	0,148 ± 0,0040	ND	0,136 ± 0,0005	0,143 ± 0,0019
Glicina	0,377 ± 0,0970	ND	9,913 ± 1,5939	0,785 ± 0,0189
Alanina	4,108 ± 0,3370	0,475 ± 0,0060	3,204 ± 0,0875	6,735 ± 0,1694
Prolina	40,529 ± 1,9510*	1,093 ± 0,0200	29,213 ± 5,8577*	6,660 ± 0,1650
Leucina	1,945 ± 0,0340	0,339 ± 0,0100	0,860 ± 0,3128	1,033 ± 0,3856
TOTAL				

Discussão de Resultados

No ciclo de vida dos organismos aquáticos enumeram-se diferentes factores capazes de afectar o seu crescimento, sobrevivência, respiração e distribuição no ecossistema, dos quais se destacam os factores abióticos como a salinidade e a temperatura (Yazdani *et. al.*, 2010). Neste sentido e tendo como base o alargado intervalo de salinidade (5-45‰) suportado por *P. elegans* (Janas *et. al.* 2004), tornou-se necessário estabelecer a salinidade e a temperatura a manter no sistema de cultivo de decápodes utilizado durante a avaliação das dietas. Deste modo, considerou-se que a salinidade a impor no sistema de cultivo durante o período de manutenção dos *P. elegans* em tanque seria de 35‰, correspondendo à média de salinidade da água do mar (Janas & Spicer, 2008). A salinidade de 35‰ também foi referenciada por Taylor & Spicer (1987) e Janas & Spicer (2008) para *P. elegans* e Cesar e colaboradores (2006) para *L. vannamei*; de 34‰ por Lovell e colaboradores (2005) para *P. serratus* e de 37,6‰ por Palma e colaboradores (2008) para *P. elegans*. A capacidade de *P. elegans* na hipo e hiper-osmoregulação permite à espécie o controlo e manutenção na entrada/saída de sais e água do organismo, o que possibilita o rearranjo interno do nível de salinidade e temperatura a que é sujeito.

Quanto à temperatura, Sanz (1987) considera que a elevada temperatura (25°C) verificada no mês de Agosto no Golfo de Valência proporcionou uma rápida maturação sexual e desenvolvimento de *P. elegans*. Por este factor e na tentativa de simular a temperatura ocorrente no mês de Agosto do mesmo estudo (Sanz, 1987), considerou-se no presente trabalho, uma temperatura constante de 24°C, a qual também mencionada por Yazdani e colaboradores para *P. elegans* e Cesar e colaboradores (2006) para *Litopennaeus vannamei* com a referência de 28°C±3°C. Hernandez & Taylor (1985) referiu ainda que a tolerância à salinidade diminui com o aumento da temperatura.

A relação de comprimento (mm) e peso (mg) para as dietas fornecidas a *P. elegans* apresentam individualmente uma elevada correlação, onde RM ($R^2=0,9212$) obtém maior interdependência, comparativamente a RSS e RSH. As dietas fornecidas a *P. elegans* sugerem diferentes comportamentos na relação tamanho *versus* peso, visto que um dos parâmetros poderá progredir de forma acelerada comparativamente ao restante. Neste caso, existe maior prevalência do peso comparativamente ao tamanho para RSH, o que sugere que à medida que o peso aumenta existe um ligeiro retardamento no comprimento, analogamente se sucede para a RSS e RM. Todavia, a RM denota maior equilíbrio entre os parâmetros medidos, uma vez que o crescimento faz-se acompanhar da evolução do peso de *P. elegans*.

Relativamente aos *P. elegans* capturados em meio selvagem nos anos 2010 e 2011, existe uma elevada correlação ($R^2=0,97$) entre o tamanho e peso dos mesmos. A mesma ordem de grandeza na correlação entre parâmetros biométricos também é verificada por Janas & Mańkucka (2010) no Mar Báltico. Apesar da evidente diferença na alimentação de *P. elegans* no meio selvagem e em cativeiro, constata-se que os dados resultantes neste estudo vão de encontro ao estudo desenvolvido por Janas & Mańkucka (2010). Comparando os *P. elegans* submetidos às três dietas e os capturados em meio selvagem realçam-se diferenças estatísticas no tamanho para ambos, nomeadamente entre as dietas PeSS e PeSH comparativamente a PeS. Apesar da variada alimentação existente em meio selvagem comparativamente com o cativeiro, realça-se que os crustáceos *P. elegans* encontravam-se adaptados à alimentação fornecida durante a execução deste estudo, sendo a mesma traduzida pelo crescimento e peso verificados.

De forma a caracterizar o real efeito da dieta alimentar no crescimento de *P. elegans* foram considerados neste estudo os parâmetros de incremento de peso (%) e taxa de crescimento específico. Estes parâmetros de avaliação permitiram constatar que o mexilhão fornecido como dieta a *P. elegans* (PeM) favorece o seu aumento de peso e tamanho, fato este relacionado e evidenciado na relação tamanho *versus* peso. Todavia, estes benefícios nos parâmetros analisados para a espécie não se traduzem na percentagem da taxa de sobrevivência, visto que apresentou um valor aproximado de $87,5\% \pm 1,443$. Apesar das evidentes diferenças existentes entre *P. elegans* alimentados com dietas diferentes, as taxas de sobrevivências obtidas neste estudo estiveram equivalentes ou superiores aos dados apresentados por outros autores. Nomeadamente, 75% para *P. elegans* aquando submetido a diferentes salinidades (8-18‰ de salinidade) (Yazdani *et. al.*, 2010), 81,25% para o carangueijo *Eriocheir sinensis* (Mu *et. al.*, 1998), entre 86,7-100% nas diferentes dietas estudadas (Williams *et. al.*, 2005) e cerca de 90% para para *P. monodon* (Bautista & Subosa, 1997).

Relativamente aos parâmetros bioquímicos de *P. elegans*, a proteína bruta quantificada nas rações equipara-se aos estudos desenvolvidos por diferentes autores nas diferentes espécies associadas, designadamente por Bautista & Subosa (1997) com 40-42% para juvenis de *P. monodon* e Fuentes e colaboradores (2009) menciona um valor aproximado de 8,8% para *Mytilus galloprovincialis*. A quantidade de proteína bruta existente no músculo de *P. elegans* representou um equilíbrio entre as rações fornecidas, com a exceção dos mesmos alimentados com mexilhão, e os indivíduos capturados em meio selvagem. Esta

similaridade de dados na quantificação sugere que a proteína fornecida durante o período de ensaio em cativeiro é análoga à disponibilidade proteica existente na diversidade alimentar encontrada em meio selvagem. Face à quantidade de proteína existente na ração e à homóloga no músculo de *P. elegans* sujeitos a diferentes dietas, verificam-se diferenças relevantes quanto a PeSS e PeSH, visto que para PeM igualiza-se à quantidade inicialmente fornecida. Esta diferença entre as quantidades proteínas fornecidas e efetivas no músculo do crustáceo são verificadas por diferentes autores não correspondem ao referenciado por diversos autores (Catacutan *et. al.*, 2003, Biswas *et. al.* 2007, Habashy, 2009, Terrazas-Fierro *et. al.*, 2010), uma vez que na sua grande maioria a quantidade fornecida é inferior à existente no músculo. Deste modo, os dados sugerem que poderá existir necessidade de suplementar as dietas fornecidas com maior quantidade de proteína, fazendo face às suas necessidades proteicas e metabólicas e de forma a igualizar os dados auferidos para indivíduos capturados em meio selvagem.

No que diz respeito ao conteúdo lipídico, a quantidade existente na ração e a quantidade efetiva no músculo de *P. elegans* apresentam diferenças notórias. Comparativamente aos ovos da mesma espécie (Morais *et. al.*, 2002), a quantidade lipídica existente no músculo de juvenis do presente estudo é inferior, o que pode indicar que as mesmas foram dispendidas em processos embrionários e metabólicos. Sendo o mesmo também referenciado por Morais e colaboradores (2002), visto que as larvas de *P. elegans* recentemente eclodidas dependem fortemente das reservas lipídicas endógenas, particularmente para fins metabólicos e energéticos. Relativamente à quantidade de ácidos gordos, os valores mensurados encontram-se abaixo comparativamente aos ovos de *P. elegans* como referenciado por Morais e colaboradores (2002) e aos diferentes estádios larvares de *Penaeus kerathurus* mencionado por Mourente e colaboradores (1995). Todavia, os presentes dados apresentam uma relativa proximidade com os valores obtidos para *postlarvae*, comparativamente com o último autor referido. Contudo, a composição em ácidos gordos dos *P. elegans* submetidos a dietas evidência uma deficiente constituição em ácidos gordos insaturados (PUFA) e altamente insaturados (HUFA). Uma vez que, os mesmos auxiliam na integridade das membranas celulares, na maximização do crescimento e na sobrevivência, a deficiente disponibilidade no músculo poderá sugerir que o crescimento e desenvolvimento estão a ser afectados, devido ao desvio dos lípidos ingeridos para processos metabólicos. Wouters e colaboradores (1997) evidenciam o importante papel de HUFA's na formação de membranas e a elevada mobilização durante o período de metamorfose, o que é expectável por perdas consideráveis.

A composição dos aminoácidos analisados nas rações fornecidas e no músculo de *P. elegans* realçam diferenças pontuais notórias, nomeadamente em alanina, prolina e glicina. Tendo, os aminoácidos uma posição central no metabolismo celular e numa diversidade de processos metabólicos, torna-se imprescindível a sua presença para o correto e sustentado crescimento (Torres *et. al.*, 2002), dos quais se enumeram como essenciais a leucina, lisina, arginina, treonina, metionina, valina, isoleucina, triptofano, histidina e fenilalanina (Tacon, 1987). No entanto, a percentagem de aminoácidos essenciais destacada por Tacon (1987) não é reflectida na quantificação efectuada. Pelo que poderá derivar da oxidação dos aminoácidos devido à excreção dos grupos amina e a degradação da cadeia de carbono, sendo o grupo amina convertido em ureia e excretado sob esta forma. Após, a ingestão a oxidação dos aminoácidos aumenta, se o consumo exceder a exigência a taxa de oxidação superioriza-se, sendo que o presente processo apresenta uma taxa superior no camarão do que no peixe. (Curzon *et. al.*, 2004).

Em suma e tendo em conta as determinações efetuadas neste estudo, verifica-se que a ração que oferece maiores benefícios para *P. elegans* no que respeita ao crescimento, sobrevivência e qualidade nutricional da espécie é a ração semi-seca (RSS). No entanto, evidencia-se que melhores resultados de crescimento poderá surgir caso haja a suplementação da referida dieta com PUFA e HUFA, tal como os aminoácidos essenciais.

CAPÍTULO V

Conclusões

O presente estudo permitiu concluir que, a dieta com mexilhão embora evidencie um notório benefício na evolução no tamanho e peso de *P. elegans*, não reúne as condições necessárias e essenciais para o seu desenvolvimento em Aquacultura, sobretudo na baixa taxa de sobrevivência comparativamente às demais e na quantidade proteica que não corresponde às necessidades nutricionais da espécie. Não obstante, a alimentação permanente com mexilhão não demonstra sustentabilidade para o meio aquático, pois existe a necessidade de captura em meio selvagem para fornecer a espécie em cativeiro. Por estes motivos, considera-se que a RSS no seu âmbito geral, com os devidos ajustes de aminoácidos e no conteúdo lipídico, trará benefícios quanto ao cultivo de *P. elegans* em aquacultura.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A espécie *P. elegans* apresenta uma vasta gama de potencialidades e diferentes fatores por entender, visto que a incidência de estudos dentro desta temática não é largada e somente recentemente tem sido abordada por investigadores da área geográfica envolvente ao Mar Báltico.

Perspectivando novas linhas e maximizando o potencial da espécie encontram-se diversos pontos de interesse onde serão necessários mais estudos, nomeadamente:

- A caracterização da população da espécie na costa Portuguesa, especificamente na zona marítima pertencente ao Concelho de Peniche.
- O encurtamento do período do ciclo de vida com o objectivo de obter a espécie para consumo e/ou repovoamento em meio selvagem.
- A indução do período de maturação dos ovos e desova nos diferentes meses do ano através da conjugação fotoperíodo e temperatura da água em tanques.
- Promover maior incidência de estudos nas fêmeas de *P. elegans*, com o intuito de verificar a sua evolução no crescimento e peso comparativamente aos machos e, impulsionar a maximização dos seus parâmetros biométricos.
- A aplicação de novas dietas alimentares de origem animal e vegetal na tentativa de promover a sustentabilidade de cultivo em cativeiro.
- A análise das necessidades proteicas da espécie para o seu desenvolvimento sustentado.
- A avaliação das rações durante o tempo de armazenamento quanto à oxidação e repercussão no tecido muscular de *P. elegans*.
- Os ensaios de privação de alimento em cativeiro, com o intuito de analisar o seu comportamento em meio selvagem.
- A extração de compostos com interesse farmacêutico, como o quitosano e astanxantina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aladin, N., Plotnikov, I., Filipov, A., 2001. Opportunistic settlers in the Aral Sea. First International Meeting "The invasion of The Caspian Sea by de comb jelly Mneniopsis – problems, perspectives, need for action". Azaebaijan, 24-26 April 2001. Attachment 9. Acecida através de Caspian Environment Programme em: www.caspianenvironment.org/newsite/Caspian-mnemiopsisLeidy.asp?doc=mnem_attach9.htm&ttl=Attachment%209&lev3doc=mnemmenu1.htm. 13-07-2011.
- Albertoni, E., Palma-Silva, C., Esteves, F., 2003. Natural diet of three species of shrimp in a tropical coastal lagoon. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 3, 395-403.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemistry 18th Edition. Washington D. C.
- Bandarra, N., Nunes, M., Andrade, A., Prates, J., Pereira, S., Monteiro, M., Rema, P., Valente, L., 2006. Effect of dietary conjugated linoleic acid on muscle, liver and visceral lipid deposition in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 254, 496 – 505.
- Başçınar, N., Düzgüneş, E., Başçınar, N., Sağlam, H., 2002. A Preliminary study on reproductive biology of *Palaemon elegans* Rathke, 1837 along the south-eastern Black Sea Coast. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2, 109-116.
- Bautista, M., Subosa, P., 1997. Changes in shrimp feed quality and effects on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles. *Aquaculture*. 151, 121-129.
- Berglund, A., Bengtsson, J., 1981. Biotic and abiotic factors determining the distribution of two prawn species: *Palaemon adspersus* and *P. squilla*. *Oecologia*. 49, 300-304.
- Berglung, A., 1982. Coexistence, size overlap and population regulation in tidal vs. non-tidal *Palaemon* prawns. *Oecologia*. 54, 1-7.
- Bilgin, S., Ozen, O., Ates, A., 2008. Spatial and temporal variation of *Palaemon adspersus*, *Palaemon elegans* and *Crangon crangon* (Decapoda: Caridea) in the southern Black Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 79, 671-678.
- Bilgin, S., Ozen, O., Samsun, O., 2009. Sexual seasonal growth variation and reproduction biology of the rock pool prawn, *Palaemon elegans* (Decapoda: Palaemonidae) in the southern Black Sea. *Scientia Marina*. 73, 239-247.
- Bilgin, S., Samsun, O., 2006. Fecundity and egg size of three shrimp species, *Crangon crangon*, *Palaemon adspersus*, and *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda: Caridea), off Sinop Peninsula (Turkey) in the Black Sea. *Turk. J. Zool.* 30, 413-421.
- Biswas, P., Pal, A., Sahu, N., Reddy, A., Prusty, A., Misra, S., 2007. Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture*. 265, 253-260.
- Calado, R., Narciso, L., 2002. Camarões e Lagostas da Costa Continental Portuguesa. Prémio do Mar Rei D. Carlos – 6ª Edição. Câmara Municipal de Cascais, Cascais, Portugal.

- Catacutan, M., Eusebio, P., Teshima, S., 2003. Apparent digestibility of selected feedstuffs by mud crab, *Scylla serrata*. *Aquaculture*. 216, 253-261.
- Cavalli, R., Tamtin, M., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2001. Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. *Aquaculture*. 193, 311-324.
- Cesar, J., Zhao, B., Malecha, S., Ako, H., Yang, J., 2006. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture*. 261, 688 – 694.
- Colvin, L., Brand, C., 1977. The protein requirement of penaeid shrimp at various life-cycle stages in controlled environment systems. *World Mariculture Society*. 8, 821-840.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235, 513-551.
- Dalla Via, J., 1985. Oxygen consumption and temperature change in the shrimp *Palaemon elegans*. *Marine Ecology – Progress Series*. 26, 199-202.
- Daniel, M., Boyden, C., 1975. Diurnal variations in physico-chemical conditions within intertidal rockpools. *Fld. Stud.* 4, 161-176.
- Deering, M., Fielder, D., Hewitt, D., 1997. Growth and fatty acid composition of juvenile leader prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. *Aquaculture*. 151, 131-141.
- Fahy, E., Forrest, N., O'Toole, M., Mortimer, R., Carroll, J., 2006. Indicators of performance in the fishery for shrimp *Palaemon serratus* (Pennant) in Irish Coastal waters. *Journal of Shellfish Research*. 25, 1021-1026.
- Fincham, A., Figueras, A., 1986. Larval keys and diagnoses for the subfamily Palaemoniidae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in the north-east Atlantic and aspects of functional morphology. *Journal of Natural History*. 20, 203 – 224.
- Fincham, A., Williamson, D., 1978. Decapoda, Larvae, VI. Caridea. *Fich. Ident. Zooplancton*. 159/160: 8pp.
- Forster, G., 1951. Notes on *Leander Squilla* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 30, 361 – 367.
- FOSS. (2003). *Application Note: The determination of nitrogen according to Kjeldahl using block digestion and steam distillation (AN 300)*. Rev. 7.0.
- Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Escriche, I., Serra, J., 2009. Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytillus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins. *Food Chemistry*. 112, 295-302.
- Glencross, B., Smith, D., Thomas, M., Williams, K., 2002. Optimising the essential fatty acids in the diet for weight gain of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 204, 85-89.
- González-Félix, M., Perez-Velazquez, M., 2002. Current status of lipid nutrition of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez, L., et. al. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

González-Gordillo, J., Dos Santos, A., Rodríguez, A., 2001. Checklist and annotated bibliography of decapods crustacean larvae from the Southwestern European coast (Gibraltar Strait area). *Scientia Marina*. 65, 275-305.

González-Ortegón, E., Cuesta, J., 2006. Na illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 86, 93-102.

Grabowski, M., 2006. Rapid colonizarion of the Polish Baltic coast by an Atlantic palaemonid shrimp *Palaemon elegans* Rathke, 1837. *Aquatic Invasions*. 3, 116-123.

Grabowski, M., Jażdżewski, K., Konopacka, A., 2005. Alien crustacean in Polish waters – introduction and decapoda. *Institute of Oceanography*. XXXIV, 43-61.

Gunstone, F., 2001. *Structured and Modified Lipids*. United States of America.

Habashy, M. 2009. Growth and body composition of juvenile freshwater praw, *Macrobrachium rosenbergii*, fed different dietary protein / starch ratios. *Global Veterinaria*. 3, 45-50.

Hasan, M., 2001. Nutrition and feeding foir sustainable aquaculture development in the third millennium. Acedida através FAO na www.fao.org/DOCREP/003/AB412E/ab412e10.htm. 18-08-2011.

Hayward, P., Nelson-Smith, T., Shields, C., 1996. *Sea shore of Britain and Europe*. Harper Collins Publisers, London.

Hayward, P., Ryland, J., 1996. *Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe*. Oxford University Press, Great Britain.

Hoglund, H., 1943. On the biology and larval development of *Leander squilla* (L.). *Biol.* 2, 1-44.

ISO 5982-1, 2005. Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content – Part 1: Kjeldahl method.

Janas, U. Zarzycki, T., Kozik, P., 2004. *Palaemon elegans* – a new component of the Gulf of Gdańsk macrofauna. *Oceanologia*. 46, 143-146.

Janas, U., 2005. Distribution and individual characteristics of the prawn *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda) from the Gulf of Gdańsk and the dead Vistula River. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*. XXXIV, 83-91.

Janas, U., Barańska, A., 2008. What is the diet of *Palaemon elegans* Rathke, 1837 (Crustacea, Decapoda), a non-indigenous species in the Gulf of Gdańsk (southern Baltic Sea)?. *Institute of Oceanography*. 50, 221-237.

Janas, U., Bruska, O., 2010. Energy values and energy resources of two prawns in Baltic coastal waters: the indigenous *Palaemon adspersus* and the non-indegenous *Palaemon elegans*. *Oceanologia*. 52, 281-297.

Janas, U., Mańkucka, A., 2010. Body size and reproductive traits of *Palaemon elegans* Rathke, 1837 (Crustacea, Decapoda), a recent colonizer of the Baltic Sea. *International Journal of Oceanography and Hydrobiology*. XXXIX, 3-24.

Janas, U., Spicer, J., 2008. Does the effect of low temperature on osmoregulation by the prawn *Palaemon elegans* Rathke, 1837 explain winter migration offshore?. *Mar. Biol.* 153, 937-943.

Jażdżewski, K., Konopacka, A., Grabowski, M., 2005. Native and alien Malacostracan crustacean along the Polish Baltic Sea coast in the twentieth century. *Institute of Oceanography.* XXXIV, 175-193.

Kureshy, N., Davis, D., 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture.* 204, 125-143.

Lepage, G., Roy, C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research.* 27, 114-120.

Lim, C., Ako, H., Brown, C., Hahn, K., 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture.* 151, 143-153.

Lovell, J., Findlay, M., Moate, R., Yan, H., 2005. The hearing abilities of the prawn *Palaemon serratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 140, 89 - 100.

Lumare, L., Lumare, D., Florio, M., Scirocco, T., Lumare, F., 2009. I crostacei decapodi del Lago di Acquatina: Struttura delle popolazioni e ciclo riproduttivo. *Unitá di Ricerca di Gambericoltura.* Lecce, Italy.

Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P., 2001. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis.* 14, 93 – 100.

Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *The Journal of Experimental Biology.* 205, 3107-3122.

Möller, P., Pihl, L., Rosenberg, R., 1985. Benthic faunal energy flow and biological interaction in some shallow marine soft bottom habitats. *Marine Ecology – Progress Series.* 27, 109-121.

Morais, S., Narciso, L., Calado, R., Nunes, M., Rosa, R., 2002. Lipid Dynamics during the embryonic development of *Plesionika martia martia* (Decapoda; Pandalidae), *Palaemon serratus* and *P. elegans* (Decapoda; Palaemonidae): relation to metabolic consumption. *Marine Ecology Progress Series.* 242, 195-204.

Mourente, G., Medina, A., González, S., Rodríguez, A., 1995. Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. *Aquaculture.* 130, 187-199.

Mu, Y., Shim, K., Guo, J., 1998. Effects of protein level in isocaloric diets on growth performance of the juvenile Chinese hairy crab, *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture.* 165, 139 – 148.

New, M., 1980. *The diet of prawns.* FAO Corporate Document Repository. Accessed through FAO at <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB915E/AB915E00.htm>. 18-08-2011.

Palma, J., Bureau, D., Andrade, J., 2008. Effects of binder type and binder addition on the growth of juvenile *Palaemonetes varians* and *Palaemon elegans* (Crustacea: Palaemonidae). *Aquaculture Int.* 16, 427-436.

Ramirez Isla Hernandez, S., Taylor, A., 1985 S. The effect of temperature on osmotic and ionic regulation in the prawn, *Palaemon elegans* (Rathke). *Ophelia*. 24, 1–15.

Reuschel, S., Cuesta, J., Schubart, C., 2010. Marine biogeographic boundaries and human introduction along the European coast revealed by phylogeography of the prawn *Palaemon elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55, 765-775.

Sanz, A., 1987. Biología de *Palaemon elegans* Rathke, 1837 (Natantia: Palaemonidae) en las costas del Mediterráneo Occidental. *Inv. Pesq.* 51, 177-187.

Smedes, F., Askland, T., 1996. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination Method. *Marine Pollution Bulletin*. 38, 193-201.

Tacon, A., 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – a training manual. 1. The essential nutrients. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Brazil.

Taylor, A., Spicer, J., 1987. Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Marine Biology*. 95, 521-530.

Terrazas-Fierro, M., Civera-Cerecedo, R., Ibarra-Martínez, L., Goytortúa-Bores, E., Herrera-Andrade, M., Reyes-Becerra, A., 2010. Apparaent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 308, 166-173.

Torres, G., Giménez, L., Anger, K., 2002. Effects of reduced salinity on the biochemical composition (lipid, protein) of zoea 1 decpod crustacean larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 277, 43-60.

Williams, K., Smith, D., Barclay, M., Tabrett, S., Riding, G., 2005. Evidence of a growth factor in some crustacean-based feed ingredients in diets for the giant tiger *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 250, 377-390.

Wouters, R., Hauwaert, A., Naessens, E., Ramos, X., Pedrazzoli, A., Lavens, P., 1997. The effect of dietary n-3 HUFA and 22:6n-3/20:5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. *Aquaculture International*. 5, 113-126.

Yazdani, M., Taheri, M., Seyfabadi, J., 2010. Effect of different salinities on survival and growth of prawn, *Palaemon elegans* (Palaemonidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 255-259.

Zhou, M., Zhang, X., Duan, G., 2011. Liquid-chromatography quantitative analysis of 20 amino acids after derivatization with FMOC-Cl and its application to different origin *Radix isatidis*. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 58, 509-515.

Tabela X – Efeito da dieta no tamanho, em mm, de *P. elegans* alimentados com 3 dietas diferentes durante 54 dias.

N.º de Dias	DIETA														
	Ração Semi-seca					Ração Semi-húmida					Ração com Miolo de mexilhão				
	Réplica	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM
0	14,1	14,3	14,0	14,1±0,09	3	13,0	14,5	13,3	13,6±0,46	3	15,4	16,2	16,2	16,0±0,27	3
3	13,4	14,0	14,2	13,9±0,24	3	13,6	13,5	13,4	13,5±0,06	3	16,5	16,1	15,1	15,9±0,42	3
6	13,8	15,5	13,0	14,1±0,74	3	14,5	14,7	13,8	14,3±0,27	3	15,7	16,9	15,3	16,0±0,48	3
9	14,3	13,6	13,7	13,9±0,22	3	14,4	14,1	13,5	14,0±0,26	3	14,9	15,2	15,6	15,2±0,20	3
12	13,9	14,9	15,5	14,8±0,47	3	13,4	14,5	14,0	14,0±0,32	3	14,3	15,8	15,5	15,2±0,46	3
15	15,4	14,2	14,9	14,8±0,35	3	14,5	15,0	13,4	14,3±0,47	3	16,0	15,7	15,8	15,9±0,09	3
18	14,3	13,7	14,7	14,2±0,29	3	14,6	14,2	13,4	14,0±0,35	3	16,2	15,4	17,4	16,4±0,58	3
21	15,6	14,9	13,9	14,8±0,49	3	14,0	13,8	14,6	14,1±0,24	3	16,5	17,5	18,0	17,3±0,44	3
24	14,5	14,5	14,9	14,6±0,13	3	14,5	14,9	13,7	14,4±0,35	3	16,4	17,6	15,3	16,4±0,66	3
27	15,9	14,5	14,4	14,9±0,48	3	14,9	15,3	13,9	14,7±0,42	3	16,8	16,3	15,6	16,2±0,35	3
30	14,7	14,9	15,2	14,9±0,15	3	15,2	14,7	14,9	14,9±0,15	3	16,2	16,0	15,3	15,9±0,27	3
33	15,7	14,6	15,9	15,4±0,40	3	15,4	14,9	14,8	15,0±0,19	3	17,5	16,8	17,3	17,2±0,21	3
36	15,5	15,4	15,5	15,5±0,03	3	15,1	16,7	16,4	16,1±0,49	3	16,3	16,3	15,5	16,0±0,27	3
39	15,7	15,1	15,4	15,4±0,17	3	15,7	15,7	15,0	15,5±0,23	3	17,2	17,2	18,0	17,5±0,27	3
42	15,8	14,6	14,8	15,1±0,37	3	16,3	15,7	15,1	15,7±0,35	3	16,8	17,0	16,1	16,6±0,27	3
45	15,1	14,0	16,8	15,3±0,81	3	15,5	16,1	15,2	15,6±0,26	3	16,2	16,9	16,9	16,7±0,23	3
48	15,3	16,0	15,9	15,7±0,22	3	15,9	15,3	16,0	15,7±0,22	3	17,9	16,7	17,8	17,5±0,38	3
51	15,6	16,7	16,0	16,1±0,32	3	15,2	14,8	15,9	15,3±0,32	3	17,0	15,9	16,9	16,6±0,35	3
54	15,8	16,2	15,3	15,8±0,26	3	15,6	16,4	15,4	15,8±0,31	3	18,4	19,6	19,5	19,1±0,38	3

Tabela XI – Efeito da dieta no peso, em mg, de *P. elegans* alimentados com 3 dietas diferentes durante 54 dias.

N.º de Dias	DIETA															
	Réplica	Ração Semi-seca					Ração Semi-húmida					Ração com Miolo de mexilhão				
		1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N
0	141,6	141,6	141,6	141,6±0,00	3	141,6	141,6	141,6	123,9±0,00	3	161,0	200,7	189,1	183,6±11,79	3	
3	103,0	135,4	152,0	130,1±14,39	3	124,6	127,4	104,3	112,7±7,28	3	210,1	191,8	147,2	183,0±18,68	3	
6	127,5	202,7	104,7	144,9±29,61	3	138,2	141,8	113,2	128,0±8,99	3	166,1	212,5	149,9	176,1±18,76	3	
9	158,6	129,2	135,8	141,2±8,91	3	156,2	145,3	140,1	127,7±4,74	3	139,5	157,5	184,6	160,6±13,11	3	
12	135,9	167,8	195,5	166,4±17,22	3	125,1	149,5	135,8	138,2±7,06	3	129,5	187,9	188,0	168,5±19,48	3	
15	202,6	152,7	179,5	178,3±14,42	3	162,4	166,5	127,1	149,3±12,51	3	175,5	172,7	190,2	179,4±5,43	3	
18	172,0	136,4	171,8	160,0±11,83	3	163,9	156,5	118,5	137,4±14,06	3	195,7	168,9	257,7	207,4±26,30	3	
21	208,2	184,3	145,3	179,3±18,33	3	161,1	137,4	149,9	149,6±6,85	3	196,5	262,8	281,7	247,0±25,83	3	
24	158,5	155,3	170,2	161,3±4,53	3	149,2	170,9	138,5	139,0±9,53	3	204,7	262,9	153,2	206,9±31,69	3	
27	205,5	163,3	149,9	172,9±16,75	3	171,9	190,0	141,3	153,0±14,21	3	202,5	188,8	167,7	186,3±10,12	3	
30	169,0	179,8	187,6	178,8±5,39	3	177,2	165,1	174,1	155,1±3,63	3	189,1	186,3	171,4	182,3±5,49	3	
33	211,9	154,0	192,8	186,2±17,03	3	190,6	181,0	156,7	162,8±10,09	3	222,3	194,8	231,2	216,1±10,96	3	
36	173,6	180,9	172,2	175,6±2,70	3	164,7	232,8	211,4	164,5±20,11	3	193,9	193,9	153,8	180,5±13,37	3	
39	197,7	177,4	192,0	189,0±6,04	3	190,7	212,2	177,6	168,4±10,09	3	224,7	223,9	280,5	243,0±18,73	3	
42	35,0	148,6	202,9	185,0±49,47	3	227,1	192,6	184,1	171,9±13,15	3	207,7	232,0	189,3	209,7±12,37	3	
45	163,7	136,3	242,6	180,9±31,86	3	205,8	228,2	150,4	170,4±23,12	3	199,6	233,9	244,0	225,8±13,44	3	
48	184,3	212,4	202,3	199,7±8,22	3	195,9	175,3	213,0	174,6±10,90	3	251,1	196,7	284,0	243,9±25,45	3	
51	183,0	250,1	202,9	212,0±19,90	3	172,7	161,8	196,8	176,7±10,34	3	229,2	190,2	239,3	219,6±14,97	3	
54	199,5	221,4	187,5	202,8±9,92	3	199,2	220,0	193,9	180,2±7,96	3	239,4	293,8	318,5	283,9±23,36	3	

Tabela XII – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens de *P. elegans* capturados nos anos de 2010 e 2011.

DATA DE CAPTURA							
10 de Agosto de 2010		8 de Setembro de 2010		5 Agosto de 2011		9 Setembro 2011	
Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)
22,24	399,6	27,93	876,1	20,00	279,7	23,89	499,6
22,24	374,2	34,22	1510,7	20,40	272,4	16,73	214,2
19,20	257,9	28,68	754,2	16,16	175,1	15,33	139,8
15,85	171,8	24,91	604,5	20,75	322,5	15,27	128,6
23,46	446,1	26,24	691,5	16,86	214,5	15,17	124,6
23,04	424,1	23,22	508,3	15,57	188,6	14,42	107,8
18,39	281,0	27,24	640,0	20,83	358,2	13,80	85,9
25,33	583,5	21,74	427,1	24,17	436,2	12,45	76,4
22,30	404,7	26,98	756,6	18,35	194,3	27,25	713,6
18,45	251,4	17,33	192,3	15,20	150,4	29,28	774,2
18,10	303,3	22,52	501,7	20,30	303,6	18,62	246,6
16,29	223,6	21,15	436,4	17,83	206,7	17,90	226,0
21,45	365,7	22,69	495,1	15,91	137,8	20,84	325,4
16,85	224,0	20,29	379,3	20,47	308,9	19,95	279,8
19,13	274,7	23,24	462,2	15,77	131,3	19,60	317,9
21,23	306,4	18,07	264,6	15,29	136,3	19,61	288,6
24,74	546,0	18,71	288,2	14,67	122,9	16,86	226,0
24,00	588,1	19,73	333,6	17,07	171,0	15,57	128,9
18,36	281,3	23,71	514,7	18,37	196,4	19,79	290,6
17,84	340,0	24,43	571,7	16,08	195,2	16,54	185,8
18,33	224,0	19,99	391,4	25,69	609,3	14,54	113,9
19,38	278,6	26,01	675,1	26,13	628,3	16,63	171,9
16,72	226,4	26,62	656,0	37,03	1961,0	14,01	112,3
18,80	265,6	28,84	750,6	31,86	1286,0	14,74	129,3
18,32	261,5	31,52	1130,1	17,92	242,6		
23,49	550,4	26,38	611,3	19,82	298,2		
20,00	337,9	21,14	418,4	24,34	457,8		

Tabela XIII – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens de *P. elegans* capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.

DATA DE CAPTURA							
10 de Agosto de 2010		8 de Setembro de 2010		5 Agosto de 2011			
Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)
13,18	95,0	27,11	704,3	19,69	275,2		
18,97	293,7	24,63	581,6	17,48	266,0		
18,36	251,0	28,53	856,1	15,76	127,5		
16,38	208,9	26,78	843,7	20,80	314,1		
14,99	174,5	21,58	408,8	20,24	292,3		
20,28	371,1	24,27	521,4	19,61	261,6		
17,37	225,7	23,28	526,5	15,82	142,2		
18,28	245,6	21,80	462,5	16,33	175,1		
16,94	209,9	22,96	577,3	20,32	290,3		
10,66	72,8	17,15	211,0	21,11	326,0		
		21,08	373,0	19,22	284,2		
		21,74	546,6	20,17	257,3		
		20,64	448,8	17,44	192,9		
		19,04	302,6	18,98	230,8		
		22,42	502,9	18,80	238,3		
		17,49	255,2	18,38	203,8		
		32,74	1354,0	15,92	157,2		
		25,18	646,4	21,44	320,6		
		21,34	394,9	21,14	320,5		
		22,19	410,1	15,95	146,8		
		29,54	1009,8	17,69	203,6		
		24,58	615,6	22,83	385,6		
		27,52	841,3	19,68	259,0		
		23,48	515,3	15,26	124,6		
		25,27	648,0	16,81	163,1		
		25,33	607,0	17,13	161,0		
		22,77	436,5	15,54	128,5		

Tabela XIV – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens *P. elegans* capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.

DATA DE CAPTURA							
10 de Agosto de 2010		8 de Setembro de 2010		5 Agosto de 2011			
Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)
		24,52	540,4	15,11	131,1		
		21,12	434,2	17,53	211,8		
		20,91	370,5	15,32	122,4		
		20,96	381,6				
		24,07	613,8				
		21,38	450,2				
		22,73	527,1				
		34,89	1708,4				
		31,11	1328,6				
		28,63	1049,4				
		26,36	929,0				
		24,28	674,2				
		25,60	577,9				
		23,54	597,2				
		23,15	579,6				
		21,50	458,4				
		19,54	360,3				
		23,25	546,6				
		24,44	621,9				
		21,88	448,9				
		24,73	659,8				
		22,36	540,8				
		22,02	489,1				
		26,10	870,3				
		25,18	707,8				
		23,64	579,8				
		26,02	752,5				

Tabela XV – Dados de comprimento e peso de indivíduos selvagens *P. elegans* capturados nos anos de 2010 e 2011, continuação.

	DATA DE CAPTURA								
	10 de Agosto de 2010		8 de Setembro de 2010		5 Agosto de 2011				
	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	Comprimento (mm)	Peso (mg)	
			21,51	0,4449					
			22,84	0,4390					
			20,64	0,4319					
N	37		84		57				24
Média±SEM	19,16±0,52	306,5±20,23	23,96±0,39	601,9±31,80	19,13±0,54	293,0±37,74	17,87±0,85	246,15±37,23	

Tabela XVI – Peso ganho e taxa de crescimento específico, em percentagem, em *P. elegans* submetidos a 3 dietas diferentes durante 54 dias.

	DIETA														
	Ração Semi-seca					Ração Semi-húmida					Ração com Miolo de mexilhão				
	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N
Peso ganho, WG	0,0579	0,0798	0,0459	0,0612±0,0099	3	0,0576	0,0784	0,0523	0,0628±0,0080	3	0,0784	0,0932	0,1295	0,1004±0,0152	3
Peso ganho, WG (%)	5,789	7,982	4,592	6,1210±0,9926	3	5,7616	7,841	5,234	6,2789±0,7958	3	7,844	9,315	12,946	10,035±1,5162	3
Taxa de Crescimento Específico, SGR (% d⁻¹)	0,2089	0,2281	0,1719	0,2030±0,0165	3	0,3324	0,2235	0,2727	0,2762±0,0315	3	0,3246	0,3445	0,3363	0,3351±0,0058	3

Tabela XVII – Taxa de sobrevivência em *P. elegans* submetidos a 3 dietas diferentes durante 54 dias.

	DIETA														
	Ração Semi-seca					Ração Semi-húmida					Ração com Miolo de mexilhão				
	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N	1	2	3	Média±SEM	N
Início	40	40	40			40	40	40			40	40	40		
Fim	38	39	38			35	35	32			36	34	35		
Taxa de Sobrevivência	0,950	0,975	0,950	0,958±0,008	3	0,875	0,875	0,800	0,850±0,025	3	0,900	0,850	0,875	0,875±0,014	3
Taxa de Sobrevivência (%)	95,0	97,5	95,0	95,8±0,833	3	87,5	87,5	80,0	85,0±2,500	3	90,0	85,0	87,5	87,5±1,443	3

