

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2001.01.15</b>	(73) Titular(es): <b>EPAX AS</b>	
(30) Prioridade(s): <b>2000.01.14 IS 534800</b>	<b>P.O. BOX 2047 N-6028 AALESUND</b>	<b>NO</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2002.10.23</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.01.07</b> <b>073/2009</b>	<b>BALDUR HJALTASON</b>	<b>IS</b>
	<b>OLAFUR HALLDORSSON</b>	<b>IS</b>
	<b>GUDMUNDUR G. HARALDSON</b>	<b>IS</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b>	
	<b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO LIPÍDICA MARINHA DESTINADA A ALIMENTAR ORGANISMOS AQUÁTICOS**

(57) Resumo:

**RESUMO****"COMPOSIÇÃO LIPÍDICA MARINHA DESTINADA A ALIMENTAR  
ORGANISMOS AQUÁTICOS"**

Uma composição destinada a alimentar organismos presas de aquicultura como Artemia e rotíferos, consistindo de um componente lipídico constituído por pelo menos 25% em peso de fosfolípidos e proporcionando um teor de DHA de pelo menos 30% em peso. O componente lipídico é preferivelmente derivado de organismos marinhos tais como da biomassa de farinha de peixe, fitoplâncton e zooplâncton. A composição é utilizada para fornecer organismos presas tendo um teor elevado de ácidos gordos altamente insaturados (HUFAs) adequados para aquicultura de peixe incluindo hipoglosso, rodovalho, perca e crustáceos e moluscos.

**DESCRIÇÃO****"COMPOSIÇÃO LIPÍDICA MARINHA DESTINADA A ALIMENTAR  
ORGANISMOS AQUÁTICOS"**

## CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está dentro do campo da aquicultura. Em particular é proporcionada uma composição lipídica para alimentação de organismos presas que são utilizados como alimento para larvas de peixe e larvas de crustáceos e bivalves. Mais especificamente, a invenção proporciona composições lipídicas marinhas que são altamente enriquecidas no seu conteúdo em ácidos gordos altamente insaturados (HUFAs), em particular ácido docosahexanóico (DHA) e tendo um teor elevado de fosfolípidos ricos em DHA.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

O consumo alimentar de espécies marinhas para as quais existe uma elevada procura dos consumidores tais como salmão, truta, hipoglosso, e enguia está a crescer e devido a esta procura crescente e reservas naturais limitadas, muito esforço é dispendido no desenvolvimento de métodos de aquicultura economicamente eficientes para a cultura de tais espécies. Um problema particularmente grave é o de

assegurar uma taxa relativamente elevada de sobrevivência da larva incubada da espécie a ser cultivada.

A expansão da indústria de aquicultura requer que sejam considerados vários problemas, sendo um dos mais significativos a dificuldade em fornecer organismos presas vivos que originem uma alimentação nutricionalmente adequada para as larvas. As larvas de peixe no estado selvagem consomem uma população mista de organismos presas de fitoplâncton que proporcionam uma nutrição equilibrada. Contudo, a recolha de fitoplâncton em quantidades suficientes para satisfazer a procura em aquicultura não é factível. Como alternativa, espécies seleccionadas de organismos presas, em particular rotíferos e espécies de *Artemia*, são presentemente cultivados e utilizados como alimento.

Contudo, geralmente, tais organismos presas cultivados artificialmente, embora forneçam quantidades adequadas de proteína e energia, têm uma composição lipídica que não é adequada para satisfazer os requisitos de certos HUFAs, em particular DHA e EPA que são essenciais para a sobrevivência óptima, crescimento e desenvolvimento de larvas. Especificamente, foi demonstrado que é requerido um teor elevado em DHA e que a razão entre DHA e EPA nos organismos presas deveriam ser de pelo menos de 1:1 e preferivelmente pelo menos 2:1. Para se conseguir que os organismos presas tenham tal composição com respeito aos HUFAs é necessário cultivar os organismos na presença de

composições enriquecidas contendo teor elevado em DHA, preferivelmente pelo menos 20% em peso e uma razão de DHA para EPA excedendo a razão desejada nos organismos presas, como pelo menos 3:1 e preferencialmente maior.

Correntemente, o problema está a ser resolvido através da cultura de organismos presas na presença de composições de enriquecimento permitindo o enriquecimento dos microrganismos com respeito a estes ácidos gordos essenciais. Contudo, composições comerciais presentemente disponíveis para este objectivo tais como produtos de emulsão vendidos com o nome de comercial Selco (TM) não satisfazem os requisitos acima referidos pelo facto de o teor de DHA ser relativamente baixo e/ou a razão DHA:EPA não ser suficientemente elevada. Utilizando *Artemia* enriquecida com estas composições comerciais foram descritas taxas de sobrevivência de larvas de peixe no intervalo de 12 a 15% (McEvoy et al. *Aquaculture* 163 (1998) 237-250; Navarro et al. *J. Fish Biol.* 43 (1993) 503-515). Neste contexto, as taxas de sobrevivência são definidas como percentagem de sobrevivência desde a primeira alimentação até à metamorfose. Para a produção de aquicultura economicamente eficiente deveria ser obtida uma taxa de sobrevivência de larvas de 50% e preferivelmente superior.

Outras composições comercialmente disponíveis para enriquecimento de organismos presas consistem em produtos vendidos com o nome comercial Algamac (TM) contendo até 14% em peso de DHA, e óleo da orbital do atum (TOO) que contém até 30% em peso de DHA.

A WO 96/17526 descreve uma dieta de enriquecimento para *Artemia* com nutrientes essenciais para as larvas de peixe baseados na utilização de pós de sabão de ácidos gordos secos de HUFAs obtidos a partir da corrente de desperdícios de extracção de óleos de algas marinhas. Os materiais de partida para fornecer estes pós têm um teor de fosfolípidos de cerca de 28% em peso de ácidos gordos livres e contêm cerca de 23% em peso de DHA mas aparentemente nenhum outro ácido gordo n-3. São descritos os níveis de enriquecimento de *Artemia* de cerca de 2,7% de DHA em peso seco.

Outro material destinado a utilização em aquicultura é descrito na WO 99/06585. Exemplos descrevem um teor de 24% em peso, mas o conteúdo em fosfolípido não é referido. O material contudo, contém uma proporção elevada de ácidos gordos livres (cerca de 32 -37% em peso) e um teor elevado de material não lipídico (cerca de 39-44% em peso), que poderá reduzir a eficiência da absorção de lípidos nos animais presas. Um conteúdo elevado em ácidos gordos é geralmente considerado perigoso para larvas e formas juvenis dos peixes.

Nenhum dos dois materiais mencionados em último lugar é baseado em peixes e faltam-lhes muitos HUFAs encontrados em peixes, tais como EPA e outros ácidos gordos n-3.

A WO 96/17526 refere uma dieta de enriquecimento para *Artemia* consistindo de 10-30% de triglicéridos ricos em EPA e DHA, e 4-10% de fosfolípidos.

A JP 09 194362 A (Bisen Kasei KK) refere composições para a prevenção ou melhoramento das doenças do fígado, consistindo em DHA e fosfolípidos. Como exemplo é descrito um extracto etanólico de pele seca de choco.

Tocher D.R. et al. (*Aquaculture*, Vol. 148, No.2, 3, Janeiro 1997, pp 213-231) descreve a utilização de silagens ricas em fosfolípidos preparadas a partir tecidos neuronais de peixes como enriquecimentos para rotíferos e *Artemia*. Tal como exemplificado, silagem de olho de bacalhau/cérebro tem um conteúdo em lípido de 18,2% baseada no peso seco total e um teor de DHA de 23,1% como percentagem de lípido total.

Mourente, G. et al. (*Comp. Biochem. Physiol. A*, Vol. 104<sup>a</sup>, No.3, 1993, pp. 605-611) discute o desmame do mar de bremas pós-larvas a partir de uma dieta enriquecida em *Artemia* para uma dieta em pastilhas secas.

O documento JP 05 316958 A (Riken Vitamin Co.) descreve a utilização de ovas de tubarão para alimentação de "peixes bebés" (não larvas de peixe). Contudo ovas de tubarão têm muitas partículas de tamanho demasiado grande para alimentar larvas de peixe.

Numa revisão recente de Sargent et al. (Aquaculture 179 (199) 217-229) é salientado que além do requisito com respeito a HUFAs, as larvas de peixe têm uma necessidade alimentar de fosfolípidos e é afirmado que a dieta ideal para larvas de peixe é uma dieta contendo uma composição semelhante à gema dos ovos. De acordo com estes autores a gema da ova de peixe contém cerca de 10% em peso (numa base de matéria seca) de fosfolípidos que contêm cerca de 17% em peso de DHA e cerca de 9% em peso de EPA. Estes autores concluem na sua revisão que permanece um problema por resolver com respeito a como construir tal dieta numa escala comercial a partir de materiais correntemente disponíveis.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não foi até ao presente possível, com a utilização das composições alimentares comerciais acima mencionadas, ou outras composições experimentais conhecidas do estado-da-técnica, obter níveis de enriquecimento em DHA em Artemia que se aproxime de um ideal, uma dieta semelhante a gema de ovo.

Foi agora verificado que é possível proporcionar uma composição lípidica para enriquecimento de organismos presas de aquicultura baseada na utilização de fosfolípidos ricos em DHA isolados de materiais de organismos marinhos abundantemente disponíveis tais como farinha de peixes. Utilizando este material de partida tornou-se possível fornecer composições enriquecidas numa escala comercial, que torna possível fornecer organismos presas tendo, com

respeito a HUFAs e fosfolípidos, uma composição que está muito próxima da de gema de ova de peixe e que é por isso altamente apropriada para assegurar uma sobrevivência óptima, crescimento, pigmentação e morfogénese de larvas de peixe tais como larvas de hipoglosso.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Assim, num primeiro aspecto a presente invenção proporciona uma composição lipídica como descrito na reivindicação 1. Em formas de realização úteis a fonte de um componente lipídico rico em fosfolípidos na referida composição está abundantemente disponível a partir de materiais de organismos marinhos tais como farinha de peixe. Esta composição de acordo com a invenção é particularmente útil para fornecer espécies de Artemia e rotíferos tendo uma composição lipídica apropriada para larvas de peixe.

Num outro aspecto a invenção fornece uma emulsão consistindo da fase lipídica da composição acima descrita.

Em ainda outro aspecto a invenção relaciona-se com o método de fabrico de uma composição como acima definida, consistindo nos passos de separação a partir de um material de organismo marinho de uma composição lipídica crua contendo trigliceridos e fosfolípidos, seguida de um passo de enriquecimento de fosfolípidos que consiste em adicionar, a uma temperatura em que os trigliceridos não precipitam, um solvente ao componente lipídico e arrefecer a mistura para precipitar os trigliceridos a fim de obter a

fracção lipídica consistindo de pelo menos 25% em peso de fosfolípidos.

#### DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A composição de acordo com a invenção, para alimentação de organismos presas tem como seu componente principal um componente rico em fosfolípido.

No contexto presente, a expressão "organismos presas" refere-se a qualquer organismo marinho que pode ser utilizado como alimento vivo para larvas de espécies marinhas que são produzidas em instalações de aquicultura. Uma revisão geral sobre esses organismos presas pode ser encontrada em Lavens & Sorgeloos (eds.) "Manual on the production and use of live food for aquaculture" publicado pela FAO (1995). Assim, os organismos presas mais utilizados incluem diversas classes e géneros de microalgas, rotíferos, *Artemia*, zooplâncton incluindo copépodes, cladoceros, nemátodos, e larvas de *Trochofora*.

Tal como utilizado aqui, o termo "aquicultura" deve ser entendido no seu sentido mais alargado e inclui qualquer produção de quaisquer espécies aquáticas produzidas em condições de aquicultura, tais como espécies de peixe, incluindo como exemplos salmão, truta, carpa, perca, brema, rodovalho, linguado, peixe-leite, tainha, garoupa, hipoglosso; crustáceos tais como camarão, lagosta, lagostim e caranguejos; moluscos tais como bivalves.

Uma característica comum destas espécies aquáticas é que o seu ciclo de vida inclui um ou mais estádios larvares que podem ter requisitos nutricionais muito específicos e conseqüentemente o fornecimento de organismos presas satisfazendo estes requisitos constitui um factor essencial para o sucesso da produção da aquicultura. Tal como acima mencionado, um requisito assim específico é um teor elevado em ácido gordo essencial DHA, implicando o termo "essencial" que os organismos presas não são capazes de uma síntese *de novo* desses compostos. A composição da presente invenção tem um teor de DHA de pelo menos 30 a 35% em peso, ou o intervalo de cerca de 35-40% em peso preferivelmente de pelo menos 40% em peso, tal como pelo menos 50% em peso incluindo pelo menos 60% em peso.

É incorporado pelo menos um componente lipídico adicional que fornece uma quantidade adequada de DHA. Esse componente lipídico adicional contém pelo menos 30% em peso de DHA, mais preferivelmente pelo menos 40% em peso de DHA, por exemplo pelo menos 50% em peso de DHA. Em formas de realização preferidas, o componente lipídico adicional inclui pelo menos 60% em peso de DHA, tal como pelo menos 70% em peso de DHA, incluindo pelo menos 90% em peso de DHA.

O outro componente lipídico rico em DHA é incorporado na composição da invenção numa quantidade que resulta em pelo menos um teor total de DHA da composição que é de pelo

menos 30% em peso. Dependendo do teor de DHA do componente rico em fosfolípidos, a quantidade do outro componente lipídico requerida pode estar no intervalo de 5-99% em peso. Em certas formas de realização da invenção a quantidade do outro componente lipídico está no intervalo de 50-95% em peso, como no intervalo de cerca de 60-80% em peso, tal como e.g. 70-75% em peso.

A fonte do outro componente lipídico adicional pode ser de quaisquer lípidos de ocorrência natural (consistindo preferivelmente de gliceridos, tais como trigliceridos ou digliceridos) contendo pelo menos 20% em peso de DHA e qualquer desses lípidos sintetizados quimicamente ou enzimaticamente. Exemplos de lípidos ricos em DHA de ocorrência natural são os de óleo de orbital de atum (TOO) e lípidos isolados de células microbianas tendo um alto teor de DHA, tais como algas incluindo espécies de *Chlorella* e de *Cryptocodinium*, certas espécies de leveduras tais como *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizochytrium* e *Thraustochytrium*. Como alternativa à utilização de lípidos ricos em DHA de ocorrência natural, esses lípidos podem ser sintetizados quimicamente ou enzimaticamente. Numa forma de realização útil da invenção esses lípidos são fornecidos na forma de glicerido através do contacto de DHA como ácido livre e glicerol na presença de catalisadores químicos ou de uma enzima capaz de formar gliceridos a partir dos reagentes, tal como uma lipase incluindo uma lipase isolada de *Cândida antarctica*.

Foi verificado que é particularmente útil utilizar materiais à base de peixe como fontes de lípidos para a composição de acordo com a invenção (e.g., como fontes para o componente contendo fosfolípidos, ou do componente adicional rico em DHA, ou ambos). Além do DHA, tais materiais também fornecem outros HUFAs valiosos (particularmente HUFAs n-3) que são característicos de peixe (tal como ácidos gordos 20:5 (EPA), 18:3, 18:4, e 20:4), e que são encontrados na dieta natural de larvas de peixe e em gema de ova de peixe, e são considerados benéficos para o sucesso do enriquecimento de organismos presas para cultura de peixe. Numa forma de realização vantajosa, a composição de enriquecimento tem um teor total de HUFAs de pelo menos 40% em peso, preferivelmente pelo menos 50% em peso, tal como pelo menos 60% em peso. Em tais composições, EPA está no intervalo de 2-15% em peso, tal como no intervalo de 5-10% em peso, e outros HUFAs n-3 além de DHA e EPA estão no intervalo de 2-25% em peso, preferivelmente no intervalo de cerca de 5-15% em peso, tal como por e.g. cerca de 10% em peso. Em outras formas de realização vantajosas o teor total de HUFAs n-3 é de pelo menos 50% em peso, tal como pelo menos 60% em peso.

Tal como acima mencionado, a composição da invenção é constituída por um componente rico em fosfolípidos como componente principal consistindo de pelo menos 25% em peso de fosfolípidos. No presente contexto o termo "fosfolípidos" é utilizado para descrever uma classe de lípidos contendo ácido fosfórico como mono- ou diéster.

Assim, fosfolípidos incluem fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) e ácido fosfatídico (PA). O termo "lecitina" é também comumente utilizado para misturas dos fosfolípidos acima referidos. Os presentes inventores verificaram que a distribuição dos membros da classe de fosfolípidos pode ter um impacto significativo na capacidade da composição da invenção para assegurar taxas altas de sobrevivência e de boa pigmentação das larvas de peixe. Em particular, foi verificado que a composição dos fosfolípidos na farinha de arenque é de tal modo que é atingida uma taxa particularmente elevada de pigmentação correcta de larvas de peixe .

De acordo com a invenção os fosfolípidos são isolados de materiais de organismos marinhos, incluindo materiais frescos e materiais secos. Materiais frescos incluem por exemplo vísceras de peixes e outros animais marinhos, carne ou peixe, ovos de peixe, lulas, moluscos e biomassa planctónica. Materiais secos incluem, em particular, farinha de peixe tais como farinhas de arenque, capelim, cavala, savelha, sardinha, anchovas, carapau branco, e pescada-do-reino azul e farinhas de organismos planctónicos. Tais fontes de materiais marinhos, fornecem tal como atrás mencionado, não só um teor elevado em DHA, mas também em EPA e outros PUFAs n-3, característicos de peixe, e são de um certo modo semelhantes à dieta natural de larvas de peixe.

É bem conhecido que a qualidade de farinha de peixe comerciais pode variar consideravelmente. Em particular, as farinha de peixe de qualidade pobre têm tido uma deterioração mais ou menos avançada dos lípidos incluindo oxidação e hidrólise. Para os objectivos da presente invenção é particularmente preferida a utilização de refeições comerciais com uma alta qualidade como fonte do componente rico em fosfolípidos. Uma refeição de peixe de alta qualidade é definida neste contexto com os seguintes parâmetros relacionados com a qualidade e frescura: "azoto total volátil" (TVN) deverá ser inferior a 50 mg/100 g medido como descrito em Antonacopoulos, N. Handbuch der Lebensmittelchemie, vol. III/2, Springer Verlag, Berlin (1968); e digestibilidade de proteína de marinha deverá ser de pelo menos 90%.

Numa forma de realização preferida, o componente contendo fosfolípido tem um teor de fosfolípidos de pelo menos 30% em peso, preferivelmente pelo menos 40% em peso, tal como pelo menos 50% em peso, por exemplo pelo menos 60% em peso, incluindo pelo menos 70% em peso de fosfolípidos, ou mesmo superior. A proporção da composição contendo fosfolípidos está no intervalo de 2-75% em peso incluindo o intervalo de 5-50% em peso, tal como no intervalo de 5-25% em peso, incluindo cerca de 5% em peso, cerca de 10% em peso, e cerca de 15% em peso, ou no intervalo de cerca de 25-50% em peso.

Tal como acima mencionado, foi demonstrado que é requerido não só um teor elevado de DHA na alimentação para

larvas de peixe, mas que também a razão entre DHA e EPA nos organismos presas tem significado para a sobrevivência e desenvolvimento das larvas das espécies cultivadas. É geralmente reconhecido que a razão DHA:EPA nos organismo presa deveria ser de pelo menos 1:1 e preferivelmente de pelo menos 2:1. Contudo, foi verificado que de modo a conseguir esta razão desejada nos organismos presas, pode ser necessária uma razão significativamente maior na composição de enriquecimento para o organismo presa. Assim, a composição de enriquecimento da invenção tem uma razão de peso DHA:EPA no intervalo de 3:1 a 10:1, tal como 8:1, incluindo o intervalo de 4:1 a 6:1.

Tal como descrito por Sargent et al., *supra*, outros HUFAs podem ser significativos, tais como por exemplo o ácido araquidónico. Assim, é contemplada uma composição de enriquecimento de acordo com a invenção incluindo uma quantidade significativa de ácido araquidónico. Se necessário, o teor de ácido araquidónico na composição pode estar no intervalo de 1-20% em peso do de ácidos gordos totais, tal como por exemplo 2-10% em peso.

É geralmente conhecido no estado-da-técnica, que um teor elevado em ácidos gordos livres pode ser perigoso para peixes juvenis. Formas de realização preferidas da composição da presente invenção têm um baixo teor de ácidos gordos livres, tal como um teor total de menos de cerca de 10% em peso, incluindo menos de cerca de 5% em peso, mais preferivelmente menos de cerca de 3% em peso, tal como menos de cerca de 1% em peso.

Em formas de realização úteis a composição de enriquecimento da invenção consiste de componentes adicionais incluindo emulsionantes, imunoestimulantes tais como por exemplo glucanos ou alcoxigliceróis, vitaminas, antioxidantes, minerais, e ácido araquidónico. Emulsionantes adequados incluem Chremophore A25 (TM) disponível de BASF, VOLPO (TM) da Croda, lecitina de soja, fosfolípidos, gliceridos e ácidos gordos incluindo sabões.

Vitaminas que podem ser incorporadas na composição incluem qualquer vitamina hidrossolúve tal como vitamina B e vitamina C, e qualquer vitamina A insolúvel em água, e vitamina D e vitamina E. Foi verificado que um teor alto de vitamina C pode ter um impacto significativo no desempenho da composição de enriquecimento com respeito à sobrevivência e ao desenvolvimento das larvas de presas (Merchie, G; Lavens, P; Sorgeloos, P. Effects of dietary vitamin C on the growth and physiological condition of the larvae of aquaculture organisms. Thesis, 1995, University in Ghent; Merchie, G. et al. Aquaculture, 134 (1995) 325-337.). Assim, em formas de realização úteis o teor de vitamina C pode estar no intervalo de 1-15% em peso, tal como por exemplo 5-10% em peso. Antioxidantes úteis incluem TBHQ, etoxiquina, BHT, BHA, vitamina E, e vitamina C.

Será apreciado por um perito na técnica que a composição de enriquecimento da invenção pode ser utilizada como um veículo conveniente para substâncias farmacologicamente activas tais como por exemplo agentes antimicro-

bianos e substâncias imunologicamente activas incluindo vacinas contra infecções virais ou bacterianas, e qualquer combinação resultante.

A composição de acordo com a invenção pode ser proporcionada na forma de líquido, emulsão pourable, ou de pasta, ou seca, por exemplo como granulado, pó, ou em flocos. Quando a composição é fornecida como emulsão, preferivelmente uma emulsão de lípido em água, é preferível que esteja numa forma relativamente concentrada. Essa forma de emulsão concentrada pode também ser referida como pré-emulsão visto que pode ser diluída em um ou mais passos num meio aquoso para proporcionar o meio de enriquecimento final para os organismos presas. Em formas de realização preferida, tal pré-emulsão consiste de uma fase lipídica de pelo menos 50% em peso da composição de enriquecimento de acordo com a invenção.

Tal como é evidenciado do que acima se descreve, a composição de enriquecimento pode ser utilizada para enriquecer organismos presas de aquicultura com respeito a HUFAs essenciais e fosfolípidos.

Num aspecto adicional, a presente invenção fornece um método de fabrico de uma composição de enriquecimento como acima descrito. O método consiste num primeiro passo na separação de um componente lipídico crú de um material de organismo marinho como definido acima. A separação pode ser conseguida por qualquer método convencional para separar lípidos de material orgânico, tal como

uma extracção envolvendo qualquer solvente orgânico adequado, incluindo solventes orgânicos tais como álcoois incluindo etanol e propanóis; solventes hidrocarbonados e.g. alcanos tais como pentano, hexano, ou mistura de alcanos ou solventes hidrocarbonados aromáticos; éteres; ésteres, ou uma mistura destes ou outros solventes considerados adequados. A utilização de extracção supercrítica é também contemplada. Outros meios de separar fosfolípidos das fontes de materiais podem incluir cromatografia, centrifugação, compressão, tratamento térmico ou qualquer combinação destes. Num segundo passo, a fracção de fosfolípido do componente lípidico crú é enriquecida submetendo o componente lípidico a um tratamento que resulta em uma precipitação de pelo menos parcial ou solidificação da fracção de trigliceridos, que pode ser subsequentemente removida. O tratamento consiste vantajosamente na adição de um solvente adequado, tal como um dos acima mencionados ao componente lípidico crú, a uma temperatura em que os trigliceridos não precipitam seguida de arrefecimento da mistura lípido/solvente a uma temperatura em que uma porção significativa dos trigliceridos precipitam. O precipitado é então removido e a fase de solvente é evaporada para obter um componente rico em fosfolípidos. O tratamento pode ser repetido uma ou mais vezes e podem ser combinadas as alíquotas resultantes de componentes enriquecidos em fosfolípidos. Materiais de partida adequados para fornecer o componente rico em fosfolípidos incluem aqueles materiais de organismos marinhos acima descritos.

O método da invenção inclui a forma de realização em que o componente fosfolipídico é combinado com um componente rico em DHA como acima descrito.

A composição lipídica marinha de acordo com a invenção pode ser proporcionada em qualquer forma adequada incluindo as formas acima descritas para a composição de enriquecimento.

#### EXEMPLO 1

##### Isolamento à escala laboratorial de um componente lipídico rico em fosfolípidos de farinha de peixe capelim

A 100 g de farinha de peixe capelim foram adicionados 400 mL de etanol (cerca de 99% v/v) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 h. O resíduo de refeição foi separado por filtração e o filtrado etanólico destilado no vácuo em evaporador rotativo para obter 10-11 g de fracção de lípido crú contendo cerca de 80% em peso de lípido com a seguinte composição: 54% em peso de fosfolípidos (PL). 4% em peso de ácidos gordos livres (FFA), e 42% em peso de triglicéridos (TG). O procedimento de extracção foi repetido no resíduo de refeição separado que rendeu mais 1,5 g de lípido crú.

As fracções de lípido crú combinadas foram purificadas por adição de etanol a uma razão peso:volume de 1:5 e a suspensão resultante foi deixada em repouso a 4°C

durante a noite provocando a precipitação de uma parte substancial dos trigliceridos. A fase etanólica foi separada e submetida a destilação utilizando um evaporador rotativo para produzir uma fracção enriquecida em fosfolípidos na forma de material xaroposo, denso de cor amarelo-avermelhada (6,5-6,8 g; contendo cerca de 71% de lípidos da composição apresentada abaixo. (Números na coluna mais à esquerda referem-se ao número de carbonos e ligações duplas nos ácidos gordos dos componentes lipídicos, DHA é 22:6 e EPA 20:5);

	PL 71%	TG 23%	FFA 6%	Total 100%
14:0	4,1	12,1	5,7	4,3
16:0	22,5	14,5	30,3	20,8
16:1	4,9	16,7	6,2	6,4
18:0	0,0	0,0	3,7	1,3
18:1	9,6	16,9	15,5	13,4
18:2	0,0	2,4	0,0	1,4
18:3	0,0	0,0	0,0	0,6
18:4	2,3	7,5	0,0	2,6
20:1	2,3	6,2	5,2	4,2
20:4	0,0	0,0	0,0	0,6
20:5	23,5	11,4	15,6	13,2
22:1	0,0	3,8	0,0	3,5
22:4	0,0	0,0	0,0	
22:5	0,0	0,0	0,0	1,0
22:6	30,8	6,9	17,9	19,4
	100,0	100,0	98,5	92,7

## EXEMPLO 2

Isolamento à escala laboratorial de um componente lipídico rico em fosfolípidos a partir de farinha de peixe arenque

Essencialmente o mesmo procedimento tal como descrito no Exemplo 1 foi utilizado para obter um componente rico em fosfolípido a partir de farinha de peixe arenque com a seguinte composição em lípido.

	PL	TG	FFA	Total
	81%	5%	14%	100%
14:0	3,2	21,0	11,3	5,2
16:0	25,2	14,8	24,1	24,5
16:1	1,7	13,0	6,0	2,9
18:0	1,2	0,0	2,5	1,3
18:1	5,9	10,8	10,3	6,8
18:2	0,7	0,0	1,4	0,8
18:3	0,4	0,0	1,4	0,5
18:4	0,8	8,5	5,0	1,8
20:1	0,8	3,6	3,7	1,3
20:4	0,7	0,0	1,3	0,7
20:5	14,9	13,8	12,1	14,4
22:6	38,2	7,8	15,4	33,5
	93,7	93,3	94,5	93,7

Tal como observado acima, a farinha de peixe arenque fornece um material altamente preferido para um componente rico em fosfolípido de acordo com a invenção, com uma alta proporção de fosfolípido-DHA.

O procedimento de extracção etanólica dos Exemplos 1 e 2 podem ser objecto de dimensionamento da escala por métodos convencionais pelo perito na técnica, semelhantes ao que é descrito no Exemplo 3 com um sistema de solventes diferente.

#### EXEMPLO 3

##### Isolamento em grande escala de um componente lipídico rico em fosfolípido a partir de mantos de lula

Lula picada (150 kg) foi adicionada a 300 L de isopropanol e a mistura foi agitada bastante vigorosamente durante 4-6 h e deixada em repouso durante a noite. Subsequentemente, a mistura foi filtrada e foram adicionados e misturados 300 L de hexano no filtrado. Isto resultou em duas fases que foram deixadas a separar. A fase superior, que consistia maioritariamente de hexano e isopropanol foi separada e submetida a destilação em várias etapas no vácuo utilizando um evaporador rotativo de 50 L para produzir um total de 2,2 kg de uma fracção enriquecida em fosfolípidos como uma cera castanho-amarelada tendo um

teor de fosfolípidos de cerca de 65% em peso e a composição em ácidos gordos totais seguinte:

14:0	1,9
16:0	28,3
16:1	0,6
18:0	2,9
18:1	3,2
18:2	0,2
18:3	0,0
18:4	0,2
20:1	2,7
20:4	1,4
20:5	13,8
21:5	0,0
22:1	0,0
22:6	40,4
	95,5

#### EXEMPLO 4

Preparação de uma composição de enriquecimento para organismos presas de larvas de peixe

Uma composição para organismos presas tal como espécies de *Artemia* foi preparada por combinação e mistura dos ingredientes seguintes:

Tabela 4.1

componente rico em fosfolípidos das mantos de lula (Exemplo 3)	9,7 g
TG 4010 (TM), Croda, trigliceridos essenciais p/~40% em peso DHA	78,0 g
vitamina C (palmitato de ascorbilo)	8,5 g
co-emulsionante, BASF Chremophore A25 (TM)	1,6 g
Glucano Macroguard (TM) (imunoestimulante)	0,8 g
vitamina A (palmitato de vitamina A, 1 mil. u.i./g)	0,190 g
vitamina E (DL-alfa acetato de tocoferol)	0,155 g
vitamina B (cloridrato de tiamina)	1,2 g
TBHQ (antioxidante)	0,036 g
Etoxiquina (antioxidante)	0,036 g
Total	100 g

O material TG 4010 utilizado como um componente rico em DHA na composição é derivado de material baseado em óleo de peixe que está enriquecido em DHA, é constituído por 40% em peso de DHA, cerca de 10% em peso de EPA e cerca de 10% em peso de outros HUFAs n-3. Os ácidos gordos estão principalmente na forma de trigliceridos e o material tem um teor muito baixo em ácidos gordos livres. Outros materiais foram testados como fontes de um componente rico em DHA, tal como TG 5010 (também de Croda) que tem um teor de DHA de cerca de 50% em peso, e trigliceridos altamente enriquecidos enzimaticamente em DHA.

#### EXEMPLO 5

#### Utilização de uma composição de enriquecimento para cultura de Artemia

Os cistos de Artemia foram incubados em condições óptimas (em água do mar, 27-29°C, pH cerca de 8, teor de

oxigénio acima de 4 mg/L). As Artemia naupliar acabadas de incubar foram lavadas e colocadas em tanques de 250 L para atingir uma densidade de 200 000/L. A temperatura foi conservada a 25-28°C, o teor de oxigénio a 5-6 mg/L e tamponados a pH 7,5 com bicarbonato de sódio (2 g/L). Os tanques foram arejados por passagem de ar atmosférico através de casas perfuradas no fundo dos tanques. A composição de enriquecimento tal como descrita no Exemplo 4 foi adicionada aos tanques a uma concentração de 0,2 g/L e a mesma quantidade adicionada 10 h mais tarde. 24 h depois da primeira adição de composição de enriquecimento a Artemia tem a seguinte composição em lípidos (31% peso seco de lípidos):

	PL 16%	TG 76%	FFA 84%	Total 100%
14:0	8,8	1,0	3,1	0,8
16:0	15,0	8,8	36,0	11,1
16:1	2,6	3,2	3,1	2,5
18:0	6,4	2,7	6,3	4,2
18:1	25,2	15,6	13,0	17,1
18:2	4,2	3,5	1,8	3,3
18:3	13,2	19,2	6,5	14,7
18:4	2,2	3,1	1,7	2,4
20:1	1,6	1,0	0,0	0,9
20:4	2,8	2,1	0,0	2,2
20:5	12,5	10,2	4,4	9,5
22:1	0,0	0,0	0,0	
22:4	0,0	1,1	0,0	1,2
22:5	0,0	1,0	0,0	1,1
22:6	4,6	20,0	14,8	18,9
	99,0	92,5	90,7	90,0

A Artemia assim obtida tem uma concentração total altamente enriquecida de DHA de acordo com a invenção e é por isso particularmente adequada para alimentação de larvas de peixe tais como larvas de hipoglosso.

## EXEMPLO 6

Utilização de uma composição de enriquecimento para cultura de Artemia

Artemia incubada de fresco foi colocada em tanques de 250 L e nas mesmas condições que as descritas no Exemplo 5. A Artemia foi alimentada com uma composição lipídica misturada com 2% em peso de emulsionante Chremophore. A composição lipídica continha 50% em peso da composição de fosfolípidos do Exemplo 3; 25% em peso de "DHA-80", essencialmente triglicerídeos compreendendo 80% em peso de DHA, sintetizado enzimaticamente a partir de glicerol de ácido gordo DHA utilizando lipase de *Cândida antarctica* (tal como descrito em US 5 604 119); e 25% em peso Lysi-22 (TM) (Lysi hf, Iceland), um óleo de peixe com 22% em peso DHA. A composição do alimento foi adicionada aos tanques até uma concentração de 0,2 g/L e a mesma quantidade adicionada 12 h mais tarde. 24h depois da primeira adição de composição de enriquecimento a Artemia tem a seguinte composição lipídica (34% de peso seco de lípidos):

	PL 25%	TG 72%	FFA 3%	Total 100%
14:0	0,9	1,1	0,0	1,3
16:0	13,6	10,6	32,0	11,2
16:1	3,3	3,5	3,3	3,4
18:0	5,8	2,2	10,6	3,3
18:1	26,2	15,4	15,7	15,1
18:2	3,7	2,7	0,0	2,5
18:3	13,8	15,0	4,4	13,7
18:4	2,7	2,1	0,0	2,2
20:1	1,0	1,9	5,3	2,0
20:4	2,1	1,7	0,0	1,9
20:5	13,1	8,7	5,0	9,7
22:6	8,4	28,8	23,6	28,0
	94,6	93,7	100,0	94,1

A Artemia obtida tem uma concentração total muito altamente enriquecida de DHA (9,5% em peso) de acordo com a invenção bem como outros HUFAs n-3 característicos de peixes, e é assim particularmente adequada para alimentação de larvas de peixe tais como larvas de hipoglosso.

#### EXEMPLO 7

Utilização de uma composição de enriquecimento para cultura de rotíferos (*Brachionus plichatilis*)

Os rotíferos foram seccionados em condições

idênticas às descritas no Exemplo 5, foram alimentados com plâncton *Isochrysis* e leveduras e enriquecidos durante 6 h a 27°C com uma composição de enriquecimento como descrita no Exemplo 4, excepto que foram utilizados trigliceridos TG 5010 (TM) da Croda em vez de TG 4010, contendo o TG 5010 cerca de 50% em peso de DHA. Os rotíferos tinham a seguinte composição lipídica (22% de peso de lípidos):

	PL	TG	FFA	Total
	32%	56%	13%	100%
14:0	6,6	7,8	3,3	6,9
16:0	25,9	4,9	15,2	13,0
16:1	1,9	2,5	1,3	2,2
18:0	3,6	5,7	2,7	4,7
18:1	4,5	4,5	5,5	4,7
18:2	4,9	0,3	2,0	2,0
18:3	3,1	3,2	1,9	3,0
18:4	2,2	6,2	2,2	4,4
20:1	1,2	1,9	1,5	1,6
20:4	5,0	2,3	2,2	3,2
20:5	10,1	14,7	14,8	13,4
22:6	25,8	38,8	40,4	35,2
	94,7	92,7	93,0	94,3

Os rotíferos obtidos têm uma concentração total muita alta de DHA, bem como contendo outros HUFAs n-3 e têm

um teor muito alto de fosfolípidos, e assim exemplifica a eficácia da composição de acordo com a invenção.

## EXEMPLO 8

Comparação das composições de enriquecimento para cultura de Artemia

Cistos de Artemia foram incubados como no Exemplo 5 e transferidos para tanques de cultura em que as condições foram conservadas como no Exemplo 3 (excepto para alguma diferença na temperatura, ver tabela). Composições de enriquecimento foram preparadas de forma semelhante à descrita no Exemplo 4, *i.e.* com os mesmos aditivos adicionados como descrito na Tabela 4.1 tal como um emulsionante, vitaminas e cerca de 10% de componente rico em fosfolípidos a partir de mantos de lula tal como descrito no Exemplo 3. O ingrediente a granel (cerca de 80%) das preparações era constituído por composições lipídicas comerciais tal como listado na Tabela 8.1. Estas são AlgaMac 2000 (TM), DHA Selco (TM), DC DHA (TM) e Óleo de Fígado de Bacalhau de grau alimentar (da Lysi, Iceland). As preparações foram adicionadas aos tanques a uma concentração de 0,2 g/L e a mesma quantidade adicionada 10 h mais tarde. 24 h depois da primeira adição da composição de enriquecimento a Artemia tem a seguinte composição lipídica:

Tabela 8.1

	AlgaMac 2000	DHA Selco	DC DHA	Óleo de Fígado de Bacalhau	composição do Ex. 2
T durante o crescimento	20°C	27°C	27°C	20°C	27°C
% de peso seco de lípidos	17%	24%	22%	23%	31%
14:0	2,3	3,4	1,1	3,2	0,8
16:0	12,6	13,5	10,9	16,0	11,1
16:1	4,4	4,6	3,7	6,2	2,5
18:0	4,7	5,5	4,6	4,5	4,2
18:1	19,2	24,8	34,5	25,8	17,1
18:2	3,6	5,6	6,9	4,4	3,3
18:3	23,1	28,4	17,9	21,1	14,7
18:4	3,9	4,8	2,8	4,3	2,4
20:1	0,4		0,9	2,8	0,9
20:4	1,3		1,3		2,2
20:5	4,4	5,3	6,3	6,0	9,5
22:1					
22:4	2,8		0,6		1,2
22:5			0,6		1,1
22:6	7,8	4,1	8,3	2,9	18,9
	90,3	100,0	89,3	97,3	90,0

A Artemia enriquecida com a composição preferida de acordo com a invenção tem claramente uma concentração total enriquecida mais alta de DHA de acordo com a invenção e é por isso particularmente adequada para alimentação de larvas de peixe tais como larvas de hipoglosso.

## EXEMPLO 9

Utilização de Artemia enriquecida com HUFA e fosfolípidos para produção aquicultural de hipoglosso

As larvas de hipoglosso foram primeiro alimentadas a 230-250°d. ("°d": factor de multiplicação de temperatura (°C) e dias desde a incubação, e.g., a 5,2°C 250°d corresponde a 48 dias). Tanques de fundo circular foram utilizados, quer de 3,5 ou 7 m<sup>3</sup>. As larvas foram gradualmente climatizadas até uma temperatura do fundo de 11°C e uma intensidade de luz de 300-500 lux. As larvas foram alimentadas de Artemia duas vezes por dia, de manhã e ao final da tarde. A Artemia foi enriquecida com uma composição de enriquecimento de acordo com a invenção 24 h antes da alimentação da manhã, a seguir armazenada a 13-15°C durante outras 7-8h durante a alimentação da tarde. Rações de alimentos foram ajustadas para permitir uma boa digestão da Artemia. Microlagas (*Isocrysis sp.*) foram adicionadas aos depósitos da água para reduzir a tensão e facilitar as máximas taxas de ingestão. Um arejamento ligeiro foi aplicado no centro dos tanques para homogeneizar a qualidade da água e as partículas de alimentos. Uma corrente circular ligeira foi adquirida com o influxo para distribuir as larvas. A permuta de água foi aumentada desde 1,2 vezes por 24 h no começo até 3,3 vezes por 24 h no final. Os tanques de cultura de larvas foram limpos diariamente.

Foram observadas taxas de sobrevivência acima de 80% num tanque desde o início da alimentação até ao final do estado larvar (90% excluindo "clame-da-areia": larvas com deformidade da região mandibular), e foram observadas frequentemente taxas de sobrevivência entre 65 e 75%. Em média cerca de 80% de juvenis mostraram pigmentação correcta, mas foram observadas taxas até 96% de pigmentação correcta num tanque. A pigmentação correcta é definida como uma coloração de pigmentação normal no lado ocular e nenhuma pigmentação no lado cego. Cerca de 86% de juvenis em média mas até 80% num tanque mostraram migração correcta do olho, que consiste em ter ambos os olhos no lado ocular. Experiências em curso indicam que é possível de obter-se mesmo uma média mais elevada das taxas de sobrevivência e de pigmentação.

Os resultados mostram que os organismos presas enriquecidos com DHA de acordo com a invenção são particularmente adequados para a cultura de espécies aquáticas tais como hipoglosso em termos de altas taxas de sobrevivência e de qualidade.

Lisboa, 6 de Abril de 2009

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição para alimentação de organismos presas para utilização em aquicultura, consistindo de:

- 2-75% de um componente lipídico de um organismo marinho constituído por pelo menos 25% de fosfolípidos, e consistindo de
- um componente lipídico adicional numa quantidade que resulta num teor total de pelo menos 30% em peso,

em que a composição proporciona um teor de DHA de pelo menos 30% em peso, um teor de EPA no intervalo de 2-15%, e um teor de HUFAs n-3- outro além de DHA e EPA- que incluem 18:3, 18:4 e 20:4 de ácidos gordos, no intervalo de 2-25% em peso, tendo a composição menos de 10% de ácidos gordos livres e uma razão de DHA para EPA que é de pelo menos 3.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o componente contendo fosfolípido contém pelo menos 50% em peso de fosfolípidos.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, em que o componente contendo fosfolípido contém pelo menos 70% em peso de fosfolípidos.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1,

em que o componente lipídico adicional tem um teor de DHA de pelo menos 30% em peso, tal como pelo menos 40% em peso.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que o componente lipídico adicional tem um teor de DHA de pelo menos 50% em peso.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade do componente lipídico adicional está no intervalo de 50-95% em peso, calculada na composição.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade do componente rico em fosfolípidos está no intervalo 5-50% em peso.

8. Composição de acordo com a reivindicação 1 tendo um teor de DHA de pelo menos 40% em peso.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que o teor total de DHA é de pelo menos 50% em peso, incluindo pelo menos 60% em peso.

10. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o componente lipídico adicional derivado de uma fonte seleccionada a partir de lípidos de ocorrência natural e lípidos sintetizados quimicamente ou enzimaticamente, cuja fonte consiste em gliceridos tais como trigliceridos ou digliceridos.

11. Composição de acordo com a reivindicação 1, consistindo ainda num componente adicional seleccionado de um imunostimulante, uma vitamina, um antioxidante, e um mineral.

12. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o material de organismo marinho é uma farinha de peixe.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12 em que a farinha de peixe é seleccionada do grupo consistindo de farinha de capelim, farinha de arenque, farinha de savelha, farinha de cavala, farinha de anchova, farinha de sardinha, farinha de carapau branco, e farinha de pescadinha-do-reino azul.

14. Composição de acordo com a reivindicação 12, em que a farinha de peixe é uma farinha de peixe de alta qualidade comercial.

15. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o material de organismo marinho é seleccionado do grupo consistindo de ovas de peixe, mantos de lula e biomassa planctónica.

16. Composição de acordo com a reivindicação 1 que está uma forma seleccionada do grupo consistindo de um pó, um granulado, uma pasta, e flocos.

17. Emulsão constituída por uma fase lipídica com composição de acordo com qualquer das reivindicações 1-14.

18. Emulsão de acordo com a reivindicação 17 constituída por pelo menos 50% em peso da composição de acordo com a reivindicação 1.

19. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o teor total de HUFAs é de pelo menos 40% em peso, tal como pelo menos 50% em peso.

20. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o teor total de HUFAs n-3 é de pelo menos 50% em peso.

21. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a quantidade de ácidos gordos livres é de pelo menos cerca de 5% em peso.

22. Método de fabrico de uma composição de acordo com a reivindicação 1 consistindo nos passos de separar de um material de organismos marinhos um componente lipídico crú constituído por trigliceridos e fosfolípidos, seguido de um passo de enriquecimento de fosfolípidos consistindo de adição, a uma temperatura em que os trigliceridos não precipitam, de um solvente ao componente lipídico crú e arrefecimento da mistura para precipitar trigliceridos e remoção do precipitado para obter um

componente lipídico consistindo de pelo menos 25% em peso de fosfolípidos.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o material de organismo marinho é seleccionado do grupo consistindo de uma farinha de peixe, ovas de peixe, mantos de lulas, e biomassa planctónica.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que a farinha de peixe é seleccionada do grupo consistindo de farinha de capelim, farinha de arenque, farinha de savelha, farinha de cavala, farinha de anchova, farinha de sardinha, farinha de carapau branco, e farinha de pescadinha-do-reino azul.

25. Método de acordo com a reivindicação 22, em que um componente lipídico adicional é obtido por um processo que envolve o contacto de glicerol com um HUFA na presença de um catalisador ou de uma enzima capaz de combinar o glicerol e HUFA, em condições que permitem que se forme um glicerido ou uma mistura de gliceridos.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que a enzima é uma lipase produzida por *Candida antarctica*.

27. Método de acordo com a reivindicação 22 em que um componente lipídico contendo fosfolípidos tem um teor de fosfolípidos de pelo menos 50% em peso incluindo um teor de fosfolípido de pelo menos 75% em peso.

28. Composição de acordo com a reivindicação 1 que ainda compreende uma substância farmacologicamente activa.

29. Composição de acordo com a reivindicação 28 em que uma substância farmacologicamente activa é seleccionada do grupo consistindo de um agente antimicrobiano e de uma substância imunologicamente activa incluindo uma vacina e uma combinação entre si.

Lisboa, 6 de Abril de 2009

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- WO 9937186 A
- WO 9906585 A
- WO 9617526 A
- JP 9194362 A
- JP 5318958 A
- US 5604119 A

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- MCEVOY *et al.* *Aquaculture*, 1998, vol. 163, 237-250
- NAVARRO *et al.* *J. Fish Biol.*, 1993, vol. 43, 503-515
- TOCHER D.R. *et al.* *Aquaculture*, 03 January 1997, vol. 148 (2), 213-231
- MOURENTE, G. *et al.* *Comp. Biochem. Physiol. A*, 1993, vol. 104A (3), 605-611
- SARGENT *et al.* *Aquaculture*, 1999, vol. 179, 217-226
- MERCHIE, G. ; LAVENS, P. ; SORGELOOS, P. Effects of dietary vitamin C on fish and crustacean larvae. *Proceedings Larv'96*, 1995
- MERCHIE, G. Nutritional effect of vitamin C on the growth and physiological condition of the larvae of aquaculture organisms. *Thesis*, 1995
- MERCHIE, G. *et al.* *Aquaculture*, 1995, vol. 134, 325-337