



***Reprodução e crescimento do poliqueta Hediste
diversicolor (O.F. Müller, 1776) sob diferentes
condições ambientais***

Renato Manuel da Encarnação Bagarrão

2013



***Reprodução e crescimento do poliqueta Hediste
diversicolor (O.F. Müller, 1776) sob diferentes
condições ambientais***

Renato Manuel da Encarnação Bagarrão

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Ana Margarida
Paulino Violante Pombo

2013

***Reprodução e crescimento do poliqueta Hediste
diversicolor (O.F. Müller, 1776) sob diferentes
condições ambientais***

2013

Copyright © Renato Manuel da Encarnação Bagarrão

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Instituto Politécnico de Leiria

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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

À professora e minha orientadora, Ana Pombo, pelo auxílio e disponibilidade no decorrer deste trabalho, sempre que foi necessário;

Aos colegas António Santos e Ricardo Freire, por toda a paciência, ajuda e apoio prestado ao longo deste trabalho, tanto no “campo” como no laboratório;

Ao colega Ricardo Costa, pelo auxílio dado nas contagens dos juvenis e ao colega Ricardo Chora, pela ajuda prestada na obtenção do sedimento;

À Rita Sousa, à Catarina Correia, ao Tiago Simões e à professora Carla Tecelão, por toda a ajuda prestada na extração lipídica e análises no GC;

À técnica Vera Severiano e ao João Chambel, pelo auxílio prestado quanto ao material, equipamentos e espaço utilizados neste trabalho;

Ao professor Pedro Fidalgo e Costa, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, sempre que tal foi solicitado;

À professora Susana Mendes, pela sua disponibilidade e auxílio no tratamento estatístico dos dados;

A todos os outros colegas, familiares, amigos e conhecidos, que me apoiaram e me acompanharam ao longo deste trabalho, que eu me esqueci aqui de referir;

À minha avó, Angelina e aos meus irmãos, Rodrigo e Andreia, pela força e palavras transmitidas ao longo desta fase, sempre com a melhor das intenções e com o desejo do meu sucesso;

À minha namorada, Alexandra Passos, pela paciência, presença, acompanhamento, ajuda e força transmitida, que contribuíram incondicionalmente para a motivação alcançada para realizar este trabalho!

Por fim, mais do que tudo e para sempre, quero agradecer aos meus pais, por todo o esforço e apoio financeiro prestado, sem os quais não teria sido possível a realização desta etapa. Além disto, quero-lhes agradecer também todo o restante apoio, incentivo, amizade e motivação transmitida no decorrer deste trabalho, que contribuíram de forma inquestionável para a sua realização.

O poliqueta *Hediste diversicolor* encontra-se presente em zonas estuarinas e lagunares, distribuídas pelas costas atlânticas da América do Norte e da Europa. Esta espécie tem sido vulgarmente utilizada como isco na pesca e como alimento em aquacultura, para peixes e crustáceos. Muitos dos poliquetas comercializados são capturados do meio natural ou provêm de importação, ambos com impactos negativos associados, que por sua vez contribuem para o interesse crescente de proceder ao cultivo destes organismos.

Os objectivos deste trabalho foram avaliar a influência de diferentes temperaturas na reprodução do poliqueta *Hediste diversicolor*, avaliar o efeito da salinidade no crescimento de juvenis desta espécie e determinar a diferentes salinidades a composição lipídica destes organismos.

No primeiro ensaio (reprodução), a indução da reprodução foi realizada através de choques térmicos e a estimativa dos juvenis presentes foi efetuada com base em contagens, realizadas em subamostras de sedimento. O segundo ensaio (crescimento) decorreu em 60 dias, tendo-se testado três salinidades diferentes (15, 20 e 25) em triplicado. No final do ensaio, procedeu-se à pesagem dos organismos para determinar diferentes parâmetros (taxa específica de crescimento, taxa de incremento diário e sobrevivência). Em ambos os ensaios, a dieta utilizada foi ração semi-húmida de peixes marinhos. Para determinar o perfil lipídico, efetuou-se inicialmente a extração lipídica e procedeu-se depois à análise da gordura extraída por Cromatografia Gasosa (GC).

O número médio de juvenis presente em cada caixa foi de 2193, 1447 e 2987 nas temperaturas ambiente, 20°C e 25°C, respetivamente, não havendo diferenças significativas entre estes valores ($p > 0,05$). Quanto ao crescimento, os indivíduos atingiram taxas específicas de crescimento entre 6,76% e 7,01% nas diferentes salinidades, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$). A taxa de incremento diário e o peso final foram maiores nos indivíduos sujeitos às salinidades de 20 e 25 ($p < 0,05$) respetivamente, enquanto a sobrevivência foi superior nos indivíduos sob influência da salinidade de 15 (100%), comparativamente à salinidade de 20 ($97,8 \pm 1,7\%$) e à salinidade de 25 ($93,3 \pm 7,6\%$) ($p < 0,05$). Através da análise aos ácidos gordos encontrados nos indivíduos sob diferentes salinidades, verificou-se que não existiram diferenças entre essas quantidades ($p > 0,05$).

Com este estudo, concluiu-se que a espécie *Hediste diversicolor* se reproduz a diferentes temperaturas. Quanto ao efeito da salinidade no crescimento, pôde concluir-se que a salinidade de 20 poderá ser a mais adequada para o crescimento desta espécie. Em relação ao perfil lipídico, conclui-se que a salinidade não influencia a composição de ácidos gordos, sendo por isso expectável que se possa realizar o cultivo de indivíduos desta espécie em diferentes locais na zona costeira, sem que a sua composição lipídica se altere.

Palavras-chave: poliqueta, *Hediste diversicolor*, reprodução, crescimento, temperatura, salinidade

The polychaete *Hediste diversicolor* is present in estuaries and lagoons, distributed by Atlantic coasts of North America and Europe. This species has been commonly used as bait in fishing and in aquaculture, as food for fishes and crustaceans. Many polychaetes marketed are caught from the wild or come from imports, both with negative impacts, which in turn contribute to the growing interest of proceeding to the cultivation of these organisms.

The objectives of this study were to evaluate the influence of temperature on the reproduction of the polychaete *Hediste diversicolor*, to evaluate the effect of salinity on growth of juveniles of this species and determine the lipid composition of these organisms at different salinities.

In the first trial (reproduction), the induction of reproduction was performed by thermal shocks and the estimation of juveniles present was made based on counts carried out on subsamples of sediment. The second trial (growth) was conducted in 60 days, wherein was tested three different salinities (15, 20 and 25) in triplicate. At the end of the trial, all organisms were weighed in order to determine different parameters (specific growth rate, daily growth rate and survival). In both trials, the feed used was semi-moist diet for marine fish. To determine the lipid profile, initially was made the extraction of lipids and after it, the analysis of the fat extracted by Gas Chromatography (GC).

The mean number of juveniles present in each box was 2193, 1447 and 2987 at ambient temperature, 20°C and 25°C, respectively, with no significant differences between these values ($p > 0,05$). In relation to the growth, the individuals reached specific growth rates between 6.76% and 7.01%, with no differences between salinities ($p > 0,05$). The daily growth rate and final weight were higher in individuals under influence of salinities of 20 and 25 ($p < 0,05$) respectively, whereas the survival was higher in specimens under the influence of salinity of 15 (100%), compared to salinity of 20 ($97.8 \pm 1.7\%$) and salinity of 25 ($93.3 \pm 7.6\%$) ($p < 0,05$). Through the analyses of the fatty acids found in individuals under different salinities, it was found that there were no differences between these quantities ($p > 0,05$).

With this study, it was conclude that the species *Hediste diversicolor* reproduces at different temperatures. As for the effect of salinity on growth, it can be concluded that the salinity of 20 may be the most suitable for the growth of this species. In relation to the lipid profile, it is conclude that the salinity does not influence the fatty acid composition in this species, which is therefore expectable that the

cultivation of these organisms can be made at different locations in the coastal zone, without changes in their lipid composition.

Keywords: polychaete, *Hediste diversicolor*, reproduction, growth, temperature, salinity

Índice

Agradecimentos.....	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
Índice de figuras	XIV
Índice de tabelas.....	XV
1. Introdução.....	1
1.1. Introdução geral	1
1.2. Biologia e ecologia da espécie <i>Hediste diversicolor</i>	2
1.2.1. Descrição.....	2
1.2.2. Distribuição e habitat	2
1.2.3. Alimentação	3
1.2.4. Reprodução	4
1.2.5. Desenvolvimento larvar e juvenil.....	5
1.3. Captura e produção de poliquetas.....	6
1.4. Ácidos gordos e a sua importância em aquacultura	8
1.5. Objetivos	9
2. Materiais e métodos.....	11
2.1. Ensaio reprodutivo	11
2.1.1. Obtenção do sedimento.....	11
2.1.2. Sistema de cultivo.....	11
2.1.3. Determinação da proporção sexual.....	12
2.1.4. Obtenção e acondicionamento dos indivíduos	13
2.1.5. Rotinas	13
2.1.6. Indução da postura	14
2.1.7. Determinação do número de juvenis.....	14
2.1.8. Análise estatística	15
2.2. Ensaio de crescimento	15
2.2.1. Obtenção do sedimento.....	15
2.2.2. Sistema de cultivo.....	15
2.2.3. Seleção e manutenção dos juvenis.....	16
2.2.4. Parâmetros de crescimento e sobrevivência.....	16
2.2.5. Determinação do perfil de ácidos gordos	17
2.2.6. Análise estatística	18

3. Resultados.....	19
3.1. Ensaio reprodutivo	19
3.2. Ensaio de crescimento	21
4. Discussão	27
5. Conclusões.....	35
Referências bibliográficas.....	37
Anexos	43

Figura 1.1 – Morfologia representativa da espécie <i>Hediste diversicolor</i> . A e B - cabeça com probóscide evertida (posição dorsal e ventral, respetivamente); C – parápode; 1 – mandíbulas; 2 – antenas frontais; 3 – palpo; 4 – prostómio; 5 – cirros tentaculares; 6 – peristómio; 7 – olhos; 8 – parágnatos; 9 – acícula; 10 – cirro dorsal; 11 – notopódio; 12 – neuropódio; 13 – cirro ventral (adaptado de Blake & Ruff, 2007).....	2
Figura 2.1 – Sistema de cultivo utilizado neste trabalho; 1,2 e 3 – caixas sob influência da temperatura ambiente; 4,5 e 6 – caixas sob influência da temperatura de 20°C; 7,8 e 9 – caixas sob influência da temperatura de 25°C.....	12
Figura 2.2 – Contabilização do nº de juvenis de <i>Hediste diversicolor</i> com 1 mês de idade aproximadamente.....	14
Figura 3.1 – Oócito imaturo de uma fêmea da espécie <i>Hediste diversicolor</i>	19
Figura 3.2 – Larva de <i>Hediste diversicolor</i> com 9 setígeros; 1 – pigídio; 2 – parápode; 3 – cirros; 4 – palpo; 5 – olhos.....	20
Figura 3.3 – Número de juvenis obtidos nas diferentes temperaturas (média ± desvio-padrão).....	21
Figura 3.4 – Figura 3.4 – Taxa de incremento diário (g dia^{-1}) de cada 10 juvenis a diferentes salinidades (média ± desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 20 (#) e 15 com 25 (*) ($p < 0,05$).....	22
Figura 3.5 – Peso final (g) dos indivíduos engordados a diferentes salinidades ao longo de 60 dias (média ± desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 20 (*) e 15 com 25 (#) ($p < 0,05$).....	22
Figura 3.6 – Indivíduos da espécie <i>Hediste diversicolor</i> engordados em 2 meses.....	23
Figura 3.7 – Sobrevivência dos juvenis ao longo de 60 dias a diferentes salinidades (média ± desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 25 (#) ($p < 0,05$).....	23
Figura 3.8 – Perfil de ácidos gordos de juvenis de <i>Hediste diversicolor</i> sob influência de diferentes salinidades (15, 20 e 25); valores são expressos sob a forma de média ± desvio-padrão (n=3).....	24

Tabela I – Abundância (%) dos ácidos gordos selecionados em juvenis de *Hediste diversicolor* engordados sob influência de diferentes salinidades (15, 20 e 25); valores são expressos sob a forma de médio \pm desvio-padrão (n=3)..... 25

Tabela II – Composição da ração semi-húmida (formulada para linguado)..... 43

Tabela III – Número de juvenis de *Hediste diversicolor* estimado, provenientes do evento reprodutivo induzido..... 44

1. Introdução

1.1. Introdução geral

Os poliquetas constituem a maior classe do filo Annelida e são encontrados em quase todos os habitats marinhos, desde as zonas intertidais até aos sedimentos mais profundos (Rouse & Pleijel, 2001). Estes organismos são muitas vezes os componentes dominantes dos macrobentos, tanto em número de espécies como em número de indivíduos (Ravana & Moreira, 2013), existindo até à data mais de 10000 espécies descritas (Hutchings, 1998). Como tal, os poliquetas desempenham um papel importante no funcionamento das comunidades bentónicas, promovendo a reciclagem da matéria orgânica e a bioturbação dos sedimentos marinhos (Olsgard *et al.*, 2003), além de constituírem presas importantes para uma grande variedade de espécies, sobretudo em ecossistemas estuarinos (Rosa *et al.*, 2008).

Estes organismos têm sido amplamente estudados desde há muitos anos, devido à importância que apresentam nos ecossistemas em que se inserem e recentemente, algumas destas espécies têm vindo a adquirir cada vez mais popularidade devido à sua crescente utilização como isco para a pesca, tanto profissional como desportiva (Fidalgo e Costa *et al.*, 2003). O poliqueta *Hediste diversicolor* é uma das espécies onde reside grande interesse e esta constitui, à semelhança de outros poliquetas, um elemento importante nos ecossistemas estuarinos, influenciando a estrutura biogeoquímica e função dos sedimentos superficiais (Lindqvist *et al.*, 2013) Constitui a base de muitas teias alimentares e possui um valor económico considerável como isco para pesca (Gillet *et al.*, 2012). Esta espécie apresenta um grande potencial para ser produzida em aquacultura e tem sido estudada nesse âmbito ao longo dos últimos anos (Fidalgo e Costa, 1999; Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2003a; Batista *et al.*, 2003b; Nesto *et al.*, 2010; Nesto *et al.*, 2012). Recentemente, a espécie *Hediste diversicolor* tem sido também utilizada na biomonitorização da poluição marinha, nomeadamente em sedimentos estuarinos, representando desta forma uma ferramenta útil para a avaliar a qualidade ambiental em estuários (Gomes *et al.*, 2013).

Atualmente, a grande maioria dos poliquetas comercializados provêm de importação e de capturas efetuadas no meio natural e de ambas as situações resultam efeitos adversos, entre os quais a degradação dos ecossistemas onde ocorre essa captura e a introdução indireta de espécies não-nativas.

1.2. Biologia e ecologia da espécie *Hediste diversicolor*

1.2.1. Descrição

A espécie *Hediste diversicolor* pertence à família Nereididae (Scaps, 2002) e morfologicamente, é caracterizada por possuir um probóscide reversível com paragnatos em ambos os anéis oral e maxilar, e um prostômio de forma triangular com quatro olhos de pequenas dimensões. Apresenta também dois grandes palpos e duas antenas frontais, juntamente com um peristômio provido de quatro cirros tentaculares (Scaps, 2002).

Corporalmente, os indivíduos desta espécie são constituídos por diferentes segmentos e estes suportam parápodes, que consistem em apêndices locomotores emparelhados, constituídos cada um por um lobo superior (notopódio) e um lobo inferior (neuropódio). Cada um destes lobos contém normalmente um conjunto de sedas, que é projetado para o exterior e uma espinha interna designada de acícula (Blake & Ruff, 2007).

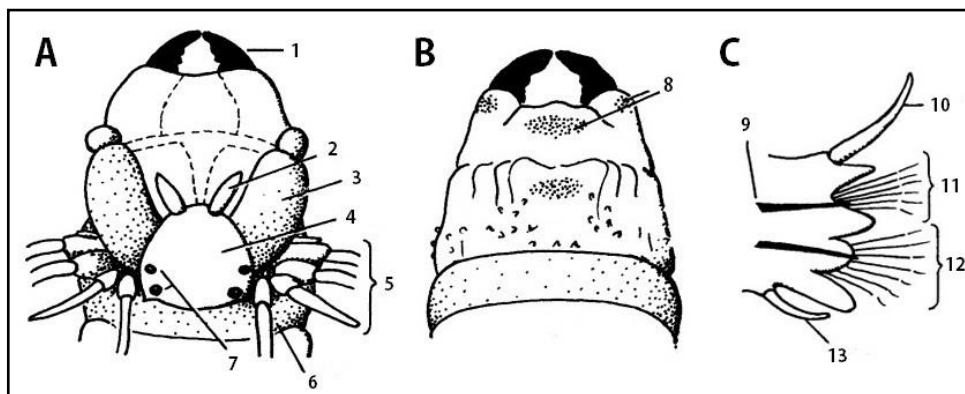


Figura 1.1 – Morfologia representativa da espécie *Hediste diversicolor*: A e B - cabeça com probóscide evertida (posição dorsal e ventral, respetivamente); C - parápode; 1 - mandíbulas; 2 - antenas frontais; 3 - palpo; 4 - prostômio; 5 - cirros tentaculares; 6 - peristômio; 7 - olhos; 8 - parágnatos; 9 - acícula; 10 - cirro dorsal; 11 - notopódio; 12 - neuropódio; 13 - cirro ventral (adaptado de Blake & Ruff, 2007).

1.2.2. Distribuição e habitat

Esta espécie pode ser encontrada em águas rasas marinhas e salobras, nomeadamente em zonas estuarinas e lagunares, ao longo das costas atlânticas da América do Norte e da Europa (Virgilo & Abbiati, 2004).

Os indivíduos desta espécie habitam em bancos arenosos e lodosos, podendo fazê-lo também sob cascalhos e argilas, nos quais constroem galerias em forma de U ou Y, que podem atingir a profundidade de 30 cm (Scaps, 2002; Kristense & Mikkelsen, 2003). São encontrados em densidades que variam entre 35 e 3700 indivíduos m⁻² (Durou *et al.*, 2008) o que evidencia o facto de esta espécie constituir um elemento fundamental nas teias tróficas dos sistemas que integra, sendo predada por inúmeras espécies de peixes, crustáceos e aves (Fidalgo e Costa, 2001).

Os organismos desta espécie apresentam elevada tolerância fisiológica face a variações extremas dos fatores ambientais, crescendo e reproduzindo-se em diferentes tipos de sedimentos e até sob condições de *stress* (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006), uma vez que suportam grandes oscilações de temperatura, salinidade e oxigénio, sobrevivendo em condições drásticas de hipoxia (Scaps, 2002; Fidalgo e Costa *et al.*, 2003).

1.2.3. Alimentação

Estes organismos possuem diversos hábitos alimentares utilizando assim diferentes estratégias para a sua alimentação, tendo a capacidade de consumir presas de diferentes dimensões, que variam desde micro e macrozoobentos, diatomáceas, a matéria orgânica fragmentada na qual se incluem os detritos (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006).

De acordo com vários autores (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006; Riisgård & Larsen, 2010), a *H. diversicolor* pode alimentar-se de pequenas partículas que se depositam na superfície do sedimento e em redor da galeria, exibindo para tal duas táticas distintas. A primeira consiste na deslocação direta por parte dos indivíduos pela superfície do sedimento na busca de alimento, capturando-o e ingerindo-o imediatamente; a segunda consiste em capturar o alimento através de secreções mucosas, que se depositam sob a superfície do sedimento e em ambos os lados do corpo dos indivíduos, nas quais as partículas de alimento ficam retidas e quando os indivíduos regressam para as suas galerias, levam consigo a secreção mucosa construindo um pequeno *pellet* que permanece em redor ou à entrada destas, que é depois ingerido progressivamente (Scaps, 2002).

Outra das estratégias de alimentação é a filtração, na qual os indivíduos libertam uma rede de muco na galeria que promove uma corrente contínua, que permite capturar fitoplâncton que se encontra em suspensão (Vedel & Riisgård, 1993; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006) e no caso da concentração de fitoplâncton ser elevada, os organismos alteram o seu modo de alimentação para filtração, ao invés de se alimentarem do que se deposita no sedimento (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Riisgård & Larsen, 2010). Esta opção de atividade filtradora, em que os organismos permanecem nas galerias, pode estar relacionada com uma estratégia de defesa adotada por esta espécie, para se proteger dos predadores, na sua maioria peixes e crustáceos (Cesária, 2007).

Esta espécie pode ainda comportar-se como herbívora, ingerindo pequenas porções de algas e macrófitas aquáticas e pode ainda ser carnívora, atuando como predador de diferentes espécies constituintes da fauna bentónica (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006).

1.2.4. Reprodução

O poliqueta *Hediste diversicolor* é uma espécie gonocórica (Rangel, 2008) e caracteriza-se por um padrão de reprodução monotélico (semelparidade), no qual ocorre apenas um evento reprodutivo em todo o seu ciclo de vida, seguido da morte dos indivíduos (Golding & Yuwono, 1994; Andries, 2001; Durou & Mouneyrac, 2007). Estes organismos utilizam cerca de 70% da energia total na produção de gâmetas, que ocorre no fluido celómico. Como consequência deste investimento, verifica-se uma redução da massa corporal e o seu crescimento cessa (Fidalgo e Costa, 2003).

A maturação sexual é induzida pelo aumento da temperatura e a desova, dentro de uma população, é sincronizada pelo ciclo lunar, ocorrendo nomeadamente na lua cheia ou lua nova (Rangel, 2008) e na maioria das populações, ocorre quando os indivíduos têm entre 1 e 2 anos de idade (Scaps, 2002). Durante o processo de maturação, surgem diferenças na coloração dos indivíduos, sendo que as fêmeas apresentam uma coloração verde-escura e os machos uma cor verde brilhante, contrariamente aos indivíduos imaturos que se apresentam com um tom castanho avermelhado (Dales, 1950; Scaps, 2002). A coloração mais brilhante adquirida pelos machos relativamente às fêmeas, deriva da massa branca de espermatozoides que se acumula no seu fluido celómico (Scaps, 2002).

Ao contrário do que acontece em outras espécies de nereídeos, a *Hediste diversicolor* não produz indivíduos epitocos (forma reprodutiva pelágica especializada) e não possui um estágio larvar planctônico, apresentando um ciclo de vida bentônico (Aberson *et al.*, 2011).

Reprodutivamente, os oócitos são depositados pelas fêmeas nas suas galerias quando se encontram maduros (com diâmetro superior a 180 µm) e antes dos machos libertarem o seu esperma livremente na água, junto às aberturas das galerias onde se encontram as fêmeas. Seguidamente, as fêmeas intensificam a atividade ventilatória dentro das suas galerias e conduzem o esperma libertado pelos machos para o interior das mesmas, semelhantemente a um dos seus modos de alimentação, ocorrendo assim a fertilização dos oócitos (Scaps, 2002).

1.2.5. Desenvolvimento larvar e juvenil

Os ovos fertilizados permanecem incubados nas galerias protegidos pelas fêmeas e as larvas bentônicas desenvolvem-se rapidamente, mantendo-se nas galerias protegidas pela progenitora e alimentando-se do muco, juntamente com películas microbianas existentes nas paredes das galerias (Bartels-Hardege & Zeeck, 1990). Após 10 a 14 dias, as larvas começam a abandonar as galerias parentais e as progenitoras morrem (Dales, 1950; Bartels-Hardege & Zeeck, 1990; Aberson *et al.*, 2011).

A emergência das galerias parentais efetuada pelas larvas coincide com o início do comportamento de “escavar” galerias, que ocorre quando os indivíduos atingem seis setígeros (Scaps, 2002). As galerias construídas pelos juvenis em forma de Y rapidamente se assemelham às galerias dos indivíduos adultos, embora sejam construídas de forma inversa, uma vez que os juvenis permanecem inicialmente nas camadas superficiais do sedimento e só depois é que o colonizam verticalmente, contrariamente ao que ocorre nos adultos, que constroem previamente a parte mais profunda da galeria e só depois é que efetuam as modificações superficiais (Marty & Retière, 1999). A construção destas galerias está relacionada com o comprimento do corpo do organismo mas apesar disto, indivíduos que possuam mais de 10 cm de comprimento podem ser encontrados frequentemente nas primeiras camadas do sedimento, entre os 2 e 3 cm de profundidade (Cesário, 2007).

1.3. Captura e produção de poliquetas

Os poliquetas têm vindo a ganhar cada vez mais importância a nível comercial, uma vez que são amplamente utilizados na pesca desportiva e profissional e também como alimento em aquacultura (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Scaps, 2002; Nesto *et al.*, 2012). Em aquacultura, a espécie *Hediste diversicolor* tem sido utilizada na alimentação de peixes e crustáceos uma vez que assegura uma nutrição adequada aos reprodutores em cultivo, devido ao conteúdo que possui em ácidos gordos, desempenhando por isso um papel importante na maturação das gónadas e na indução de postura de diferentes espécies, como os linguados *Solea vulgaris* e *Solea senegalensis*, e também em alguns camarões, como o *Penaeus kerathurus* (Dinis, 1986; Luís, 1989; Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Fidalgo e Costa *et al.*, 2003).

Esta importância crescente conduziu ao aumento da procura destes organismos e tal levou ao desenvolvimento de produções comerciais economicamente viáveis que fornecem diferentes espécies, no entanto estas não conseguem suprir as necessidades de procura ocorridas no mercado (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006). Na Europa, a aquacultura de poliquetas teve início no Reino Unido na década de 1980 com incidência na espécie *Nereis virens* (Olive, 1999) com o intuito da sua comercialização como isco para a pesca e com o objetivo de evitar a depleção das populações naturais sujeitas a exploração intensiva (Fidalgo e Costa *et al.*, 2003).

Geralmente, os poliquetas são capturados do meio natural, em zonas estuarinas, por pescadores, tanto para uso próprio como para serem comercializados (Fidalgo e Costa, 2001). Esta exploração de difícil quantificação causa distúrbios nesses ecossistemas, tanto a nível morfológico como a nível ecológico, afetando as comunidades biológicas e condicionando inúmeros organismos que aí habitam (Falcão *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2013). Além disto, a agitação provocada nos sedimentos por esta exploração promove o retorno de metais pesados para a superfície, tornando-os biologicamente ativos, bem como compostos de amónia e de fósforo a partir de sedimentos, que irão conduzir à eutrofização (Fidalgo e Costa *et al.*, 2003).

Em Portugal, as primeiras disposições legais que regulamentaram a captura de poliquetas para uso como isco vivo surgiram em 1979 (Portaria nº 254/79, de 31 de Maio), nas quais se definiu a obrigatoriedade de utilizar uma licença pessoal e equipamento específico para a captura destes organismos, no entanto estas estas aplicavam-se apenas à exploração das espécies *Marphysa sanguinea* (conhecida

como “minhocão”) e *Diopatra neapolitana* (vulgarmente designada por “casulo”). A captura da espécie *Hediste diversicolor* para utilização como isco, foi apenas contemplada na legislação elaborada no ano de 2000, Portaria nº1102-B de 22 de Novembro. Em 2010, esta regulamentação foi atualizada pela Portaria nº 1228 de 6 de Dezembro, que definiu o limite máximo de capturas diário de anelídeos e sipunculídeos a 4 litros. No entanto, o volume real das capturas destes organismos é subestimado e até mesmo desconhecido, uma vez que muitas destas são efetuadas pelos próprios pescadores para uso próprio ou por pessoas que procedem à sua comercialização a nível local, o que faz com que não haja qualquer registo ou declaração acerca deste tipo de negócio (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006). Além disto, não há qualquer controlo sobre o cumprimento da regulamentação definida por lei, que condiciona a captura destes organismos.

Em Portugal, a captura da espécie *Hediste diversicolor* é efetuada indiscriminadamente durante todo o ano, mas é mais intensa nos meses de Primavera e de Verão, devido ao aumento da pesca desportiva (Rangel, 2008; Pires *et al.*, 2009). Esta exploração poderá vir a ter efeitos negativos no ciclo reprodutivo desta espécie a longo prazo, uma vez que esta se reproduz continuamente ao longo do ano mas com mais intensidade na Primavera e no Verão, na costa sudoeste de Portugal continental (Fidalgo e Costa & Cancela da Fonseca, 1995; Fidalgo e Costa, 2003). Estes efeitos negativos podem ser mais acentuados, porque a norte de Portugal a espécie *Hediste diversicolor* apresenta dois picos reprodutivos, um na Primavera e outro no início do Outono (Pinto, 1997; Abrantes *et al.*, 1999).

Os indivíduos desta espécie permanecem maioritariamente nos primeiros 20 cm de sedimento e como tal, são coletados geralmente com recurso a uma pá ou à mão, começando-se por revolver a areia/lama, expondo depois os indivíduos que são posteriormente removidos. Estes organismos são geralmente encontrados em densidades elevadas, o que faz com que a sua coleta em grande número seja bastante fácil, ocorrendo num espaço de tempo curto (Younsi *et al.*, 2010).

Em Portugal, muitos dos poliquetas que são comercializados provêm de importação, nomeadamente da Ásia e dos EUA, uma vez que coleta do meio natural não consegue suportar a procura que ocorre no mercado (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006). Esta importação pode acarretar graves implicações ecológicas para o meio ambiente uma vez que pode conduzir à introdução de espécies não-nativas (Cohen *et al.*, 2001; Haska *et al.*, 2012), devido ao descarte deliberado das algas que vêm com

os poliquetas no seu transporte e das caixas onde são transportados, por parte de muitos pescadores de recreio, que ocorre com grande frequência (Haska *et al.*, 2012). Como tal, o cultivo deste grupo de organismos é de grande interesse, no sentido de reduzir o impacto ecológico e ambiental que resulta da exploração do mesmo, além de proporcionar também um aumento no mercado de isco vivo (Fidalgo e Costa, 1999). Além disto, a produção destes organismos iria constituir uma alternativa à importação de poliquetas, o que seria de grande interesse devido ao impacto indireto que esta exerce.

1.4. Ácidos gordos e a sua importância em aquacultura

Os ácidos gordos constituem as unidades mais simples dos lípidos e consistem em cadeias de carbono constituídas por um grupo carboxilo, situado numa das extremidades da molécula e por um grupo metilo, localizado na extremidade oposta (Rustan & Drevon, 2005). Estes elementos são classificados com base no comprimento da cadeia de carbono, no grau de insaturação (número de ligações duplas) e na posição das ligações duplas. Os ácidos gordos mais simples são saturados, em que as cadeias de carbono não possuem ligações duplas, contrariamente aos que possuem pelo menos uma ligação dupla, designados por insaturados, que por sua vez podem ser classificados como monoinsaturados (MUFA) quando possuem apenas uma ligação dupla, ou polinsaturados (PUFA) quando apresentam duas ou mais ligações duplas (Bell & Koppe, 2010). Funcionalmente, os ácidos gordos constituem elementos energéticos que são transportados e armazenados em estruturas especializadas, sendo também componentes essenciais de todas as membranas e reguladores de genes (Rustan & Drevon, 2005).

Em aquacultura, alguns ácidos gordos são considerados e definidos como “essenciais”, uma vez que são necessários para o crescimento, reprodução e imunidade dos organismos, entre os quais o ácido docosahexaenóico (DHA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido araquidónico (ARA), além do ácido linolénico e do ácido linoleico, ambos de forma menos significativa (Glencross, 2009). Os níveis ideais destes compostos, a incluir nas dietas, varia entre as diferentes espécies e está intimamente relacionado com sua origem relativamente ao ambiente (marinho, dulçaquícola ou estuarino) (Sargent *et al.*, 1999; Glencross, 2009). Os ácidos docosahexaenóico (DHA), eicosapentaenóico (EPA) e araquidónico (ARA) são ácidos gordos de cadeia longa polinsaturados (PUFA) e no caso das espécies de peixe marinhas, estes elementos são obtidos através da alimentação (dietas),

contrariamente ao que ocorre nas espécies de peixe dulçaquícolas, que têm a capacidade de sintetizar estes ácidos gordos essenciais com base nos seus precursores, o ácido linoleico e o ácido linolénico, desde que estes se encontrem disponíveis (Izquierdo, 2005). A influência dos ácidos gordos essenciais no crescimento é maior em larvas de peixes e de crustáceos, possivelmente devido à sua capacidade reduzida em digerir e absorver lípidos, juntamente com as elevadas necessidades desses compostos para o desenvolvimento dos tecidos neurais por parte das larvas (Glencross, 2009).

Convencionalmente, o óleo de peixe constitui o principal ingrediente utilizado como fonte de lípidos, na formulação de dietas para aquacultura, indústria que atualmente utiliza quase 90% de todo o óleo de peixe disponível a nível global, que tendencialmente tem vindo a decrescer, no que diz respeito à sua produção anual (De Silva *et al.*, 2010). Tendo em conta que a aquacultura se encontra em contínuo desenvolvimento por todo o mundo, torna-se necessário recorrer à utilização de fontes alternativas de lípidos para a produção de rações, uma vez que esta indústria não poderá continuar a depender do óleo de peixe de proveniência marinha (Glencross, 2009). Os poliquetas nereídeos poderão constituir, de forma parcial, uma fonte alternativa de lípidos na alimentação em aquacultura, uma vez que algumas destas espécies em cultivo atingem níveis de gordura superior a 30% (Techaprempeechea *et al.*, 2011), podendo desta forma ser integrados em regimes alimentares, em que seriam administrados conjuntamente com dietas com um nível lipídico mais baixo ou ainda, serem incorporados em rações formuladas. Estes poliquetas possuem um conteúdo elevado de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) ómega-3 (ω -3), que possibilitam um bom acondicionamento dos reprodutores e uma produção de ovos elevada, em peixes e em crustáceos, tal como foi demonstrado pela administração desses poliquetas como alimento, que resultou numa maturação mais acelerada nos organismos em cultivo, juntamente com o aumento do número de ovos por cada desova efetuada, aumento da viabilidade dos ovos e da sua sobrevivência (García-Alonso *et al.*, 2008).

1.5. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência de diferentes temperaturas (ambiente, 20°C e 25°C) na reprodução do poliqueta *Hediste diversicolor* em cativeiro e caracterizar o efeito da salinidade no crescimento de juvenis desta espécie, testando-se três salinidades distintas (15, 20 e 25). Este trabalho teve ainda

como objetivo determinar o perfil lipídico dos juvenis engordados em cativeiro, através da determinação do perfil em ácidos gordos desses indivíduos, que deverá ser tido em conta no caso dos organismos cultivados se destinarem a serem utilizados como alimento em aquacultura.

A avaliação do efeito da temperatura na reprodução de indivíduos da espécie *Hediste diversicolor* foi efetuada através da determinação do número de indivíduos da nova geração. A avaliação da influência da salinidade no crescimento foi determinada por diferentes parâmetros que serão posteriormente descritos, obtidos com base na determinação do peso inicial e final dos juvenis.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, poderão ser adquiridos conhecimentos relativos a certos aspetos de importância relevante para o cultivo da espécie *Hediste diversicolor*, podendo estes vir a contribuir no futuro para o possível desenvolvimento de um protocolo de produção, que suporte o cultivo comercial deste tipo de organismos, o que seria de grande interesse dos pontos de vista ambiental e económico.

2. Materiais e métodos

2.1. Ensaio reprodutivo

2.1.1. Obtenção do sedimento

O sedimento utilizado neste ensaio foi areia, uma vez que este tipo de sedimento evidenciou bons resultados para o cultivo da espécie utilizada neste estudo (Fidalgo e Costa, 1999).

A areia foi recolhida na zona sul da Lagoa de Óbidos (Bom Sucesso), tendo sido posteriormente colocada numa estufa a 90°C durante 24 horas para eliminar organismos que estivessem presentes, que pudessem vir a interferir com a realização da experiência (Fidalgo e Costa, 1999; Batista *et al.*, 2003b), nomeadamente através da competição por espaço e alimento com os organismos em cultivo. Por fim, crivou-se todo o sedimento por meio de dois crivos (5 e 1,18 mm respetivamente), tendo-se removido todas as conchas presentes.

2.1.2. Sistema de cultivo

Neste ensaio experimental, foram utilizadas 9 caixas plásticas (35 cm de largura, 35 cm de altura, 50 cm comprimento), nas quais se colocou depois o sedimento até este perfazer 15 cm de altura. Seguidamente colocou-se água com salinidade de 15, que foi o valor mantido ao longo de todo o ensaio, por se considerar que a salinidade ideal para a reprodução desta espécie se encontra entre 14 e 17 (Fidalgo e Costa, 1999). A água doce utilizada era proveniente da rede pública e a água salgada era captada do meio natural, tendo sido depois esterilizada com hipoclorito de sódio (1 ml/L_{água}) e por fim, neutralizada exatamente com o mesmo volume de uma solução de tiosulfato de sódio (Ferreira, 2009).

Foram utilizadas três temperaturas diferentes (temperatura ambiente \approx 16,5°C; 20°C e 25°C) em triplicado e para tal, colocaram-se resistências de aquecimento (Eheim Jager 3614 Aquarium Heater 100W) que foram seguidamente programadas para os valores desejados e ligadas depois dos indivíduos experimentais terem sido distribuídos pelas caixas, para evitar um choque térmico por parte dos mesmos.

Em cada uma das caixas, foi também colocado um dispositivo de arejamento com uma pedra difusora (Fig. 2.1).

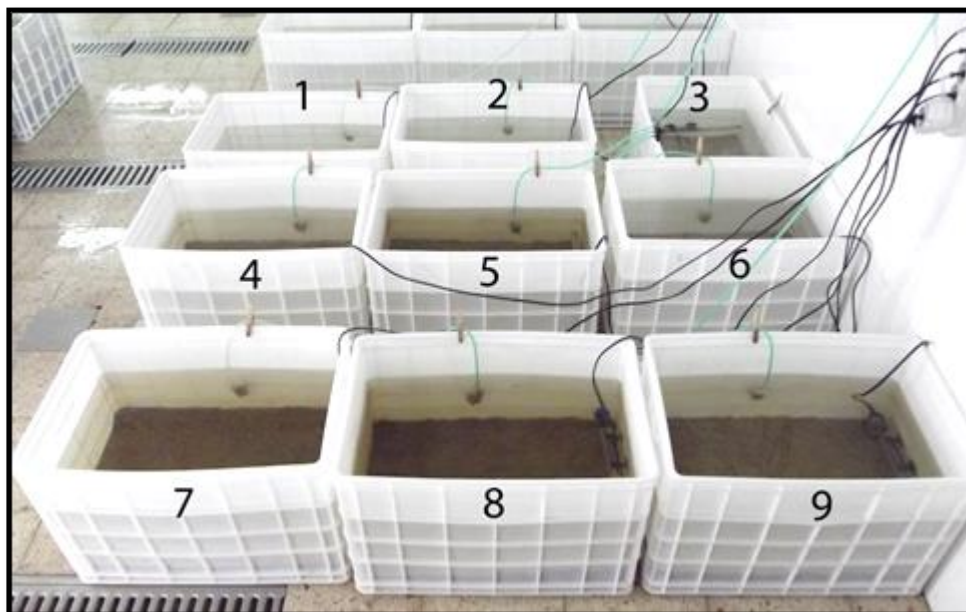


Figura 2.1 – Sistema de cultivo utilizado neste trabalho; 1,2 e 3 – caixas sob influência da temperatura ambiente; 4,5 e 6 – caixas sob influência da temperatura de 20°C; 7,8 e 9 – caixas sob influência da temperatura de 25°C.

2.1.3. Determinação da proporção sexual

De forma a obter apenas alguma informação relativamente à proporção sexual existente na população natural de *Hediste diversicolor*, de onde se obtiveram os reprodutores, efetuaram-se preparações “a fresco” para se identificar o género e o estado de maturação em 30 indivíduos. Para tal, os indivíduos foram colocados previamente e individualmente sob uma placa de gelo e seguidamente, efetuou-se uma picada para a extração de uma pequena porção do líquido celómico em cada um dos indivíduos, com recurso a agulhas hipodérmicas. Esta porção de líquido celómico foi depois colocada sob uma lâmina com lamela juntamente com uma gota de água, para posteriormente ser observada ao microscópio ótico (Zeiss Axiostar plus) (Rangel, 2008) e fotografada com uma câmara fotográfica digital Canon PowerShot G5, que se encontrava equipada no microscópio utilizado. Os machos foram identificados pela visualização de espermatozoides livres e as fêmeas identificadas pela observação de oócitos, tendo-se procedido à medição de 20 oócitos em cada uma das fêmeas (Fidalgo e Costa, 2003).

2.1.4. Obtenção e acondicionamento dos indivíduos

Os espécimes utilizados neste ensaio foram capturados do meio natural, na zona sul da Lagoa de Óbidos e no dia 28 de Dezembro de 2012, exatamente no mesmo local onde se recolheu o sedimento. Com recurso a uma pá metálica, procedeu-se à recolha de 130 indivíduos que foram depois colocados em caixas plásticas de pequenas dimensões juntamente com água do local, para posteriormente serem transportados para o laboratório de Aquacultura da ESTM. Neste, efetuou-se a seleção de 96 indivíduos aproximadamente da mesma dimensão, com um peso médio de $0,48 \pm 0,16$ g e distribuíram-se 16 indivíduos por cada caixa, para garantir a existência de machos e fêmeas em cada uma.

O alimento utilizado neste ensaio foi ração semi-húmida formulada para linguado, suplementada com beta-glucanos (Sparos Lda; tabela II em anexo) e nas duas primeiras semanas (período de acondicionamento), os indivíduos foram alimentados diariamente tendo-se distribuído 0,3 g por cada caixa. Nas quatro semanas seguintes (período de maturação), o alimento foi administrado de 24 em 24 horas e numa quantidade de 0,8 g/caixa. Estes valores foram estimados, com base na biomassa inicial média que estava presente em cada caixa e assumindo que a quantidade de alimento a administrar seria aproximadamente 3% dessa biomassa.

2.1.5. Rotinas

No decorrer deste ensaio, procedeu-se à monitorização da salinidade e temperatura, com recurso a um refratómetro (Hanna - HI Sea water Refractometer) e um termómetro (Easy-Read®) respetivamente, tendo-se ajustado estes valores aos desejados quando necessário e após as renovações de água. Estas foram realizadas duas vezes por semana com o auxílio de baldes e parcialmente (1/3 do volume de água presente), para evitar a acumulação de produtos resultantes do metabolismo dos indivíduos em cultivo.

Diariamente efetuou-se ainda uma observação cuidada em cada uma das caixas, a fim de identificar possíveis indivíduos mortos, para serem posteriormente removidos. Além disto, procedeu-se também à remoção de todos os resíduos e detritos acumulados na superfície do sedimento, juntamente com os fragmentos de alimento que ficavam por consumir, que poderiam deteriorar a qualidade da água do cultivo.

2.1.6. Indução da postura

Decorridos os períodos de acondicionamento (2 semanas) e de maturação dos indivíduos (4 semanas), iniciou-se a indução artificial da postura através de choques térmicos. A duração do período relativo à maturação foi estabelecida de acordo com o que está descrito por Lawrence & Soame (2004), em que é referido que o período de maturação dos gametas da espécie em estudo decorre em cerca de 4 semanas, no meio natural.

Os choques térmicos foram realizados três vezes e em intervalos de 48 horas, com recurso a placas e cubos de gelo, levando a um decréscimo de 6 graus da temperatura da água em cada um dos tratamentos, tendo-se depois voltado a ligar as resistências de aquecimento.

2.1.7. Determinação do número de juvenis

A determinação do número de juvenis foi efetuada para determinar o número de indivíduos da nova geração, que resultaram do evento reprodutivo anteriormente induzido. Esta contagem consistiu apenas numa estimativa e foi realizada com o auxílio um tubo de PVC, após se ter retirado toda a água do cultivo, através do qual se recolheram amostras do sedimento. Estas amostras foram colocadas em dois crivos (com dimensões de 500 e 150 μm respetivamente), sobre as quais se adicionou água salgada de forma a reter os indivíduos presentes, que foram contabilizados por observação direta (Fig. 2.2).



Figura 2.2 – Contabilização do nº de juvenis de *Hediste diversicolor* com 1 mês de idade aproximadamente.

Este procedimento foi efetuado 5 vezes em cada uma das caixas, tendo-se recolhido assim 5 amostras. Com as contagens obtidas anteriormente, com recurso a um tubo de volume conhecido e com o volume do sedimento ocupado em cada caixa, estimou-se o número de indivíduos da nova geração em cada caixa (Tabela III em anexo).

2.1.8. Análise estatística

Com o objetivo de averiguar se as diferentes temperaturas em estudo (temperatura ambiente $\approx 16,5^{\circ}\text{C}$; 20°C e 25°C) exercem influência no que respeita ao número de juvenis obtidos, foi efetuada uma Análise de Variância, um fator (*One-Way ANOVA*) (Zar, 2009). Para tal, todos os pressupostos inerentes à realização deste teste (normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias associadas) foram devidamente validados.

Todos os cálculos foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% e os resultados foram obtidos com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics 20.0.

2.2. Ensaio de crescimento

2.2.1. Obtenção do sedimento

O sedimento utilizado neste ensaio foi areia, recolhida na praia do Baleal (Peniche), na zona supralitoral. Este sedimento foi crivado com recurso a dois crivos (5 e 1,18 mm respetivamente), para remover as conchas e outras partículas grosseiras presentes e por fim, procedeu-se à sua lavagem com água doce.

2.2.2. Sistema de cultivo

Neste ensaio, utilizaram-se 9 caixas plásticas (35 cm de largura, 35 cm de altura, 50 cm comprimento), onde se colocou o sedimento (5 cm de altura). A temperatura utilizada foi $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, tendo-se colocado em cada caixa uma resistência de aquecimento (Eheim Jager 3614 Aquarium Heater 100W), juntamente com um dispositivo de arejamento. As resistências foram ligadas apenas depois dos juvenis terem sido introduzidos nas caixas, a fim de evitar um choque térmico por parte dos mesmos.

Para avaliar a influência da salinidade no crescimento, foram utilizadas três salinidades diferentes (15, 20 e 25) em triplicado e para isso, diluiu-se água salgada (salinidade de 35) com água doce nas respectivas proporções, tendo em conta um volume final de água de 40 litros. Todos estes valores de salinidade foram monitorizados ao longo do ensaio com recurso a um refratómetro (Hanna - HI Sea water Refractometer) e ajustados sempre que necessário, sendo a água de cultivo renovada parcialmente duas vezes por semana.

2.2.3. Seleção e manutenção dos juvenis

Foram selecionados juvenis aproximadamente com 1 mês de idade e um peso médio de $13,05 \pm 2,78$ mg, provenientes do ensaio reprodutivo realizado a 20°C. A densidade utilizada foi de 150 indivíduos m⁻², tendo-se distribuído 30 indivíduos por cada caixa e a duração do ensaio foi de 60 dias.

Tal como no ensaio anterior, o alimento utilizado foi ração semi-húmida formulada para linguado, suplementada com beta-glucanos (Sparos, Lda; tabela II em anexo) e esta foi administrada em quantidades determinadas com base na biomassa inicial presente em cada caixa, tendo sido 0,05 g/caixa nas primeiras duas semanas; 0,15 g/caixa nas duas semanas seguintes e 0,30 g/caixa nas restantes semanas até ao fim do ensaio. No final do ensaio, pesaram-se todos os indivíduos para se avaliar o crescimento.

2.2.4. Parâmetros de crescimento e sobrevivência

Para avaliar o crescimento dos juvenis nas diferentes salinidades, procedeu-se à determinação de parâmetros de crescimento, entre os quais a taxa específica de crescimento, μ (% dia⁻¹), através da fórmula $\mu = 100 [\ln (P_f - W_i)] t^{-1}$, em que P_f é o peso final, P_i o peso inicial e t o intervalo de tempo em dias (Nesto *et al.*, 2012).

A taxa de crescimento diário (g/dia) foi determinada com base na diferença entre o peso final e o peso inicial, dividido pelo número de dias decorridos (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000). Por fim, determinou-se a sobrevivência com base no número de indivíduos sobreviventes, em relação ao número de indivíduos que foi colocado inicialmente (Nesto *et al.*, 2012).

2.2.5. Determinação do perfil de ácidos gordos

Para se proceder à determinação do perfil em ácidos gordos dos indivíduos engordados a diferentes salinidades, efetuou-se a extração da gordura a partir de amostras, em triplicado. Para isto, pesaram-se aproximadamente 0,2 g de biomassa fresca, que foi depois colocada num tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1,5 ml de uma solução de metanol e cloreto de acetilo (20:1), previamente preparada. Seguidamente efetuou-se a maceração da biomassa presente no tubo com recurso a uma ponta de uma micropipeta e agitou-se depois no vortex, a fim de obter a melhor homogeneização possível. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de hexano e colocaram-se depois as amostras num banho a 80°C durante 1 hora, para completar a derivatização. Após 1 hora decorrida, as amostras foram arrefecidas em gelo e posteriormente, acrescentou-se 1 ml de água HPLC a cada uma, tendo-se agitado depois no vortex durante 1 minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 g durante 10 minutos a 4°C, para ser efetuada a separação das fases aquosa e orgânica. Após esta separação, removeu-se a fase superior com o auxílio de uma micropipeta para uma coluna de sulfato de sódio anidro e filtrou-se a gordura, para cada amostra efetuada.

Por fim, procedeu-se à análise da gordura extraída de cada amostra por Cromatografia gasosa (GC), com recurso a um cromatógrafo gasoso Finnigan TRACE GC Ultra (Thermo Electron Corporation), que estava equipado com uma pré-coluna, coluna TR-FAME (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 m), um auto sampler AS 3000 Thermo Electron Corporation e um detetor de chama de ionização. A temperatura do injetor (em modo *splitless*) e o detetor foram programadas para 250°C e 260°C respetivamente e o gás de arraste utilizado foi o hélio, com um caudal de 1,5 ml min⁻¹. Hidrogénio e ar foram fornecidos ao detetor utilizado, apresentando um caudal de 350 ml min⁻¹ e 35 ml min⁻¹, respetivamente. A temperatura do forno foi programada para permanecer a 60°C durante 1 minuto, aumentando depois para 150°C (a cada minuto subiu 15°C), tendo permanecido novamente em patamar durante 1 minuto, após o qual voltou a aumentar até 180°C (tendo subido 5°C a cada minuto). Seguidamente, houve um novo patamar que decorreu em 3 minutos e a temperatura acresceu aos 220°C (a cada minuto aumentou 10°C) tendo permanecido neste patamar final durante 1 minuto (adaptado de Bligh & Dyer, 1959).

A identificação dos diferentes ácidos gordos detetados foi efetuada com base em comparações, entre os tempos de retenção obtidos e os tempos que se

encontravam definidos em padrões previamente estabelecidos. A quantidade de cada ácido gordo está indicada como sendo a percentagem da quantidade total de todos os ácidos gordos determinados.

2.2.6. Análise estatística

Com o objetivo de averiguar se existiam diferenças significativas no crescimento a diferentes salinidades, compararam-se os pesos finais, as taxas de incremento diário e sobrevivência dos juvenis. Para tal, foi efetuada, uma Análise de Variância, um factor (*One-Way ANOVA*) (Zar, 2009). Previamente à execução do método, todos os pressupostos inerentes à realização deste teste (normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Por conseguinte, quando estes requisitos não foram cumpridos, efetuou-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Sempre que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, realizou-se o teste de *Tukey* (teste de comparações múltiplas), a fim de determinar onde existiam as diferenças (Zar, 2009).

Por fim, com o intuito de verificar se a salinidade (15, 20 e 25) influencia a quantidade dos 7 ácidos gordos presentes mais importantes em aquacultura (palmítico, oleico, linoleico, α -linolénico, araquidónico, eicosapentaenóico, docosahexaenóico) e ratio DHA/EPA, foi realizada uma Análise de Variância com um factor (*One-Way ANOVA*) (Zar, 2009). Uma vez mais, todos os pressupostos (isto é, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias associadas) inerentes à execução da análise foram devidamente validados.

Todos os cálculos foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% e os resultados foram obtidos com recurso ao *software IBM SPSS Statistics 20.0*.

3. Resultados

3.1. Ensaio reprodutivo

A análise efetuada a “fresco” aos 30 indivíduos revelou que a proporção sexual foi de 5 fêmeas para 1 macho (25 fêmeas e 5 machos encontrados) tal como evidenciando por outros autores, que referem que a proporção sexual é fortemente favorecida para as fêmeas (Scaps, 2002). Dos 30 indivíduos analisados, somente 3 fêmeas apresentaram oócitos com uma dimensão superior a 180 μm , enquanto as restantes 23 fêmeas apenas apresentaram oócitos imaturos (Fig. 3.1).

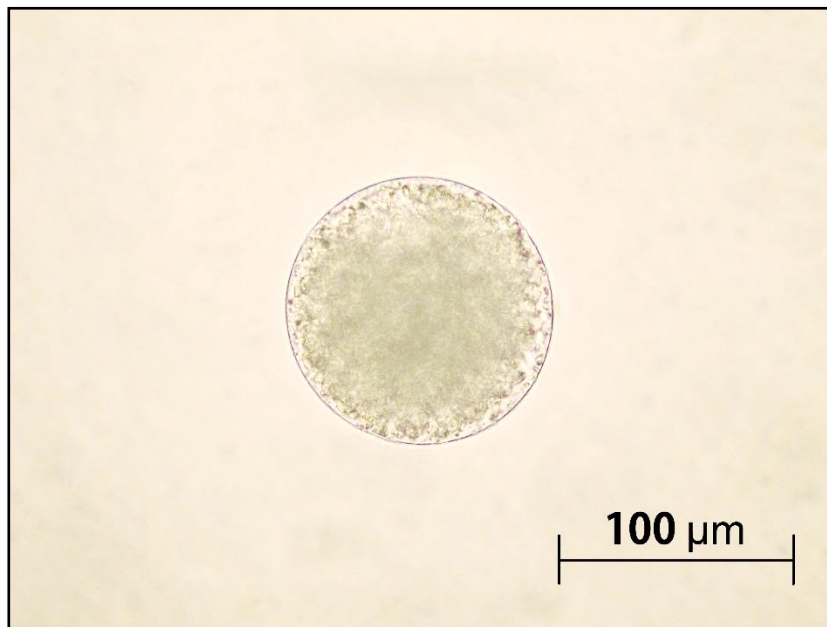


Figura 3.1 – Oócito imaturo de uma fêmea da espécie *Hediste diversicolor*.

No decorrer deste ensaio, procedeu-se à manutenção de indivíduos da espécie *Hediste diversicolor* a utilizar como reprodutores e à indução artificial da postura, momento até ao qual não se observou qualquer mortalidade. Após a indução artificial, verificou-se a ocorrência de mortalidade em todas as caixas do cultivo (8 mortos nas caixas que se encontravam a 25°C; 5 mortos nas caixas sujeitas a 20°C e 2 mortos nas caixas que se encontravam à temperatura ambiente).

Durante a realização deste ensaio, verificou-se por vezes que o alimento administrado não era consumido na totalidade, ficando pequenas porções deste na superfície do sedimento, que posteriormente sofriam decomposição e por sua vez,

deterioravam a qualidade do sedimento e da água de cultivo. Este acontecimento foi observado em todas as caixas e com maior frequência nas caixas a 25°C.

Após a indução postura, os indivíduos da nova geração (Fig. 3.2) foram observados pela primeira vez em duas caixas, ambas sob influência da temperatura de 25°C, 18 dias após se ter iniciado a indução da postura.

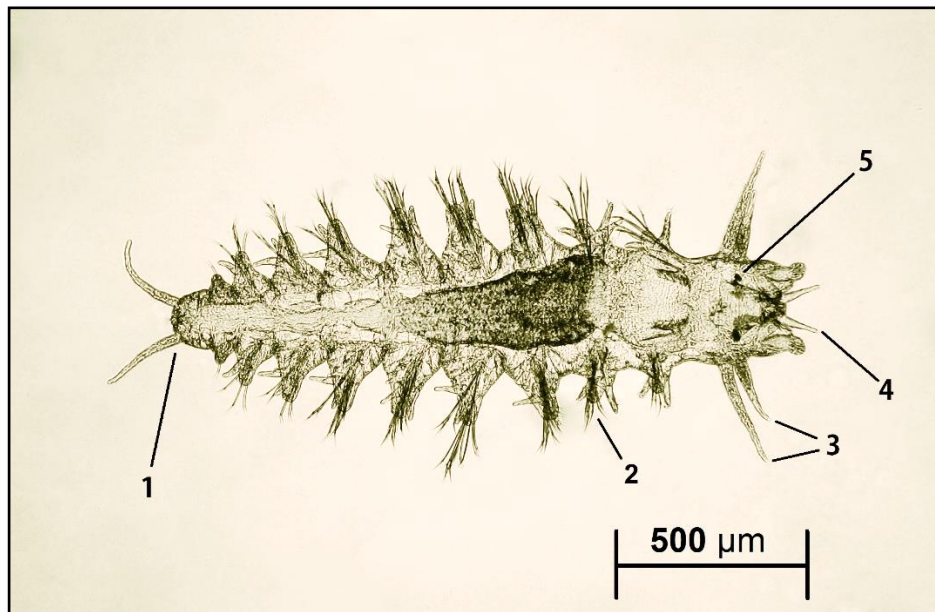


Figura 3.2 – Larva de *Hediste diversicolor* com 9 setíferos; 1 – pigídio; 2 – parápode; 3 – cirros; 4 – palpo; 5 – olhos.

Ao 23º dia após a indução, foi possível observar também a presença de larvas em duas das caixas a 20 °C e ao 25º dia, fez-se a mesma observação nas caixas à temperatura ambiente, o que evidenciou que a reprodução ocorreu com sucesso e a todas as temperaturas. Não se observaram larvas numa das caixas a 20°C, o que indica que a reprodução não ocorreu nesta caixa. Numa das três caixas que se encontravam à temperatura de 25°C, ocorreu mortalidade de grande parte das larvas que estavam presentes, algo que foi verificado por visualização direta e confirmado depois de se ter efetuado a contagem dos indivíduos nessa caixa.

Pelos resultados obtidos com base nas contagens efetuadas, foi possível observar que o número médio de juvenis obtidos foi de 2193 na temperatura ambiente (16,5°C) em cada caixa; na temperatura de 20°C o número de juvenis presentes em cada caixa foi de 1447 e à temperatura de 25°C, obtiveram-se 2987 juvenis por caixa,

não existindo no entanto diferenças estatisticamente significativas entre estes valores quando comparados (ANOVA, $F_{(2,6)} = 0,959$, $p > 0,05$; Fig. 3.3).

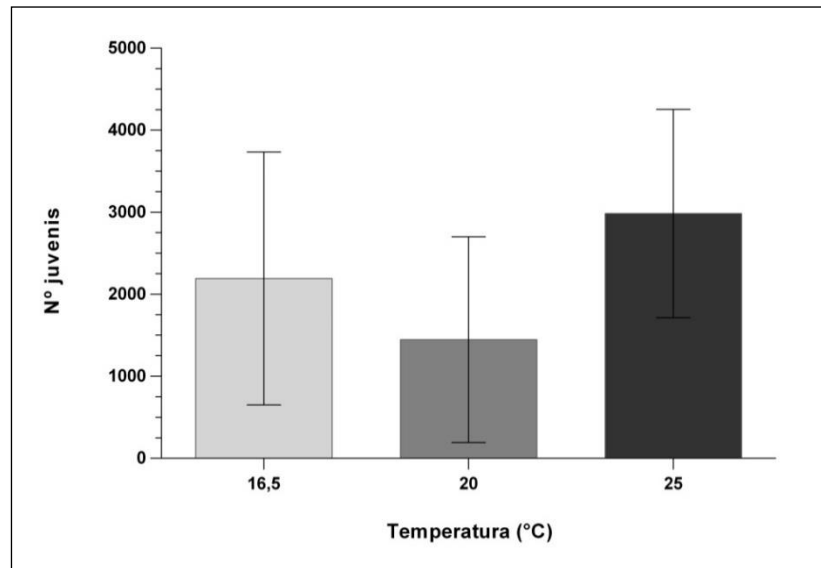


Figura 3.3 – Número de juvenis obtidos nas diferentes temperaturas (média ± desvio-padrão).

3.2. Ensaio de crescimento

Os valores obtidos relativamente à taxa específica de crescimento (% dia⁻¹) foram 7,01%; 6,67% e 6,76% nas salinidades de 15, 20 e 25, respetivamente, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre estes (ANOVA, $F_{(2,24)} = 0,897$, $p > 0,05$).

Em relação à taxa de incremento diário (g.dia⁻¹), foi possível verificar que os indivíduos sujeitos à salinidade de 15 apresentam um incremento médio de peso de $0,113 \pm 0,008$ g dia⁻¹, os juvenis sujeitos à salinidade de 20 exibiram um incremento médio de $0,125 \pm 0,005$ g dia⁻¹ e os indivíduos sob influência da salinidade de 25 apresentaram um aumento médio de peso de $0,123 \pm 0,012$ g dia⁻¹, existindo diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos, tendo esta taxa atingindo um valor significativamente superior nas salinidades de 20 e 25, respetivamente (ANOVA, $F_{(2,24)} = 5,712$, $p < 0,05$; Fig. 3.4).

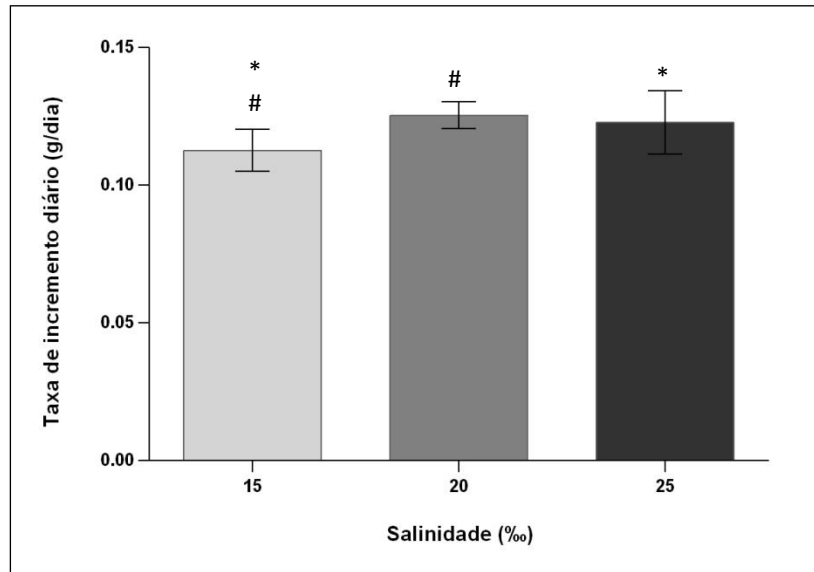


Figura 3.4 – Taxa de incremento diário (g dia^{-1}) de cada 10 juvenis a diferentes salinidades (média \pm desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 20 (#) e 15 com 25 (*) ($p < 0.05$).

Através dos resultados obtidos relativamente ao peso final dos juvenis, constatou-se que os indivíduos sujeitos à salinidade de 20 e 25 apresentaram um peso significativamente maior ($7,675 \pm 0,296 \text{ g}$ e $7,510 \pm 0,673 \text{ g}$, respetivamente) comparativamente aos juvenis sob influência da salinidade de 15, que apresentaram um peso final médio de $6,869 \pm 0,449 \text{ g}$ (ANOVA, $F_{(2,24)} = 6,595$, $p < 0,05$; Fig.3.5).

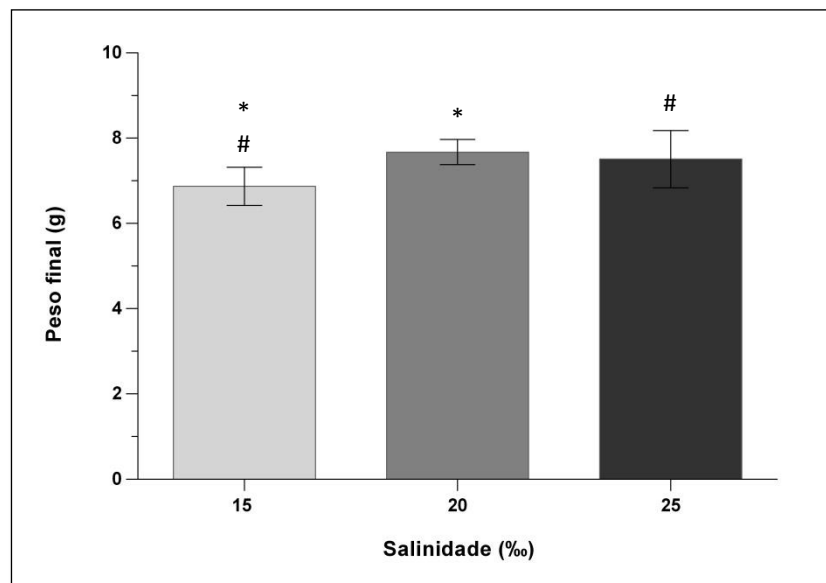


Figura 3.5 – Peso final (g) dos indivíduos engordados a diferentes salinidades ao longo de 60 dias (média \pm desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 20 (*) e 15 com 25 (#) ($p < 0.05$).

No final deste ensaio e em todas as salinidades, observou-se a presença de indivíduos já num estado de maturação avançado, evidenciado pela coloração verde adquirida pelos mesmos (Fig. 3.6).



Figura 3.6 – Indivíduos da espécie *Hediste diversicolor* engordados em 2 meses.

Relativamente à sobrevivência, pelos resultados obtidos verificou-se que existem diferenças significativas na mortalidade registada nas salinidades testadas ($p < 0,05$), em que a sobrevivência foi superior na salinidade de 15 atingindo 100%, enquanto que na salinidade de 20 foi de $97,8 \pm 1,7\%$ e na salinidade de 25 atingiu um valor de $93,3 \pm 7,6\%$ (Kruskal-Wallis, $\chi^2_{(2)} = 10,111$, $p < 0,05$; Fig. 3.7).

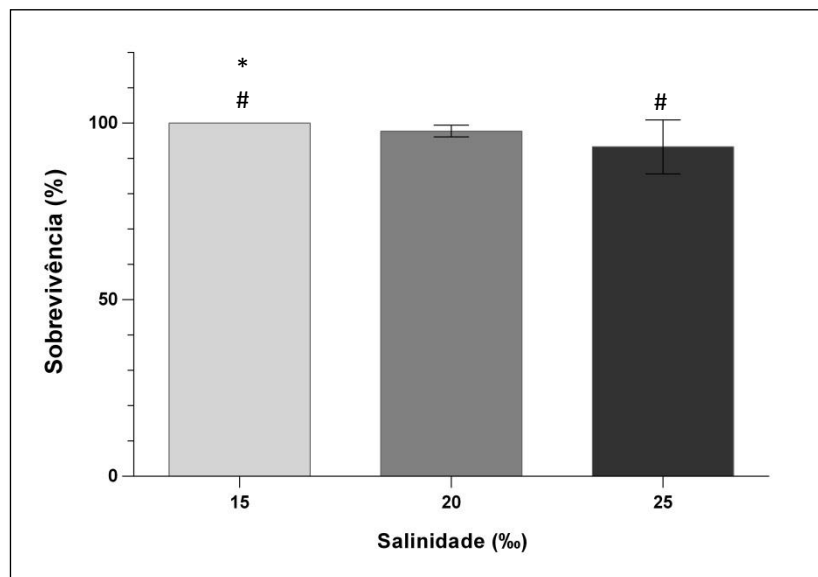


Figura 3.7 – Sobrevivência dos juvenis ao longo de 60 dias a diferentes salinidades (média \pm desvio-padrão); diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as salinidades 15 com 25 (#) ($p < 0,05$).

Quanto aos ácidos gordos, pelos resultados obtidos foi possível verificar que o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1 n-9) e o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 n-3) foram aqueles que estavam presentes em maior quantidade, respectivamente (com exceção da salinidade de 15, em que a abundância de ácido oleico foi superior à quantidade de ácido palmítico), seguidos pelo ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 n-3) e pelo ácido linoleico (C18:2 n-6), excetuando a salinidade de 15, em que houve uma maior abundância de ácido linoleico relativamente à quantidade de DHA (Fig. 3.8).

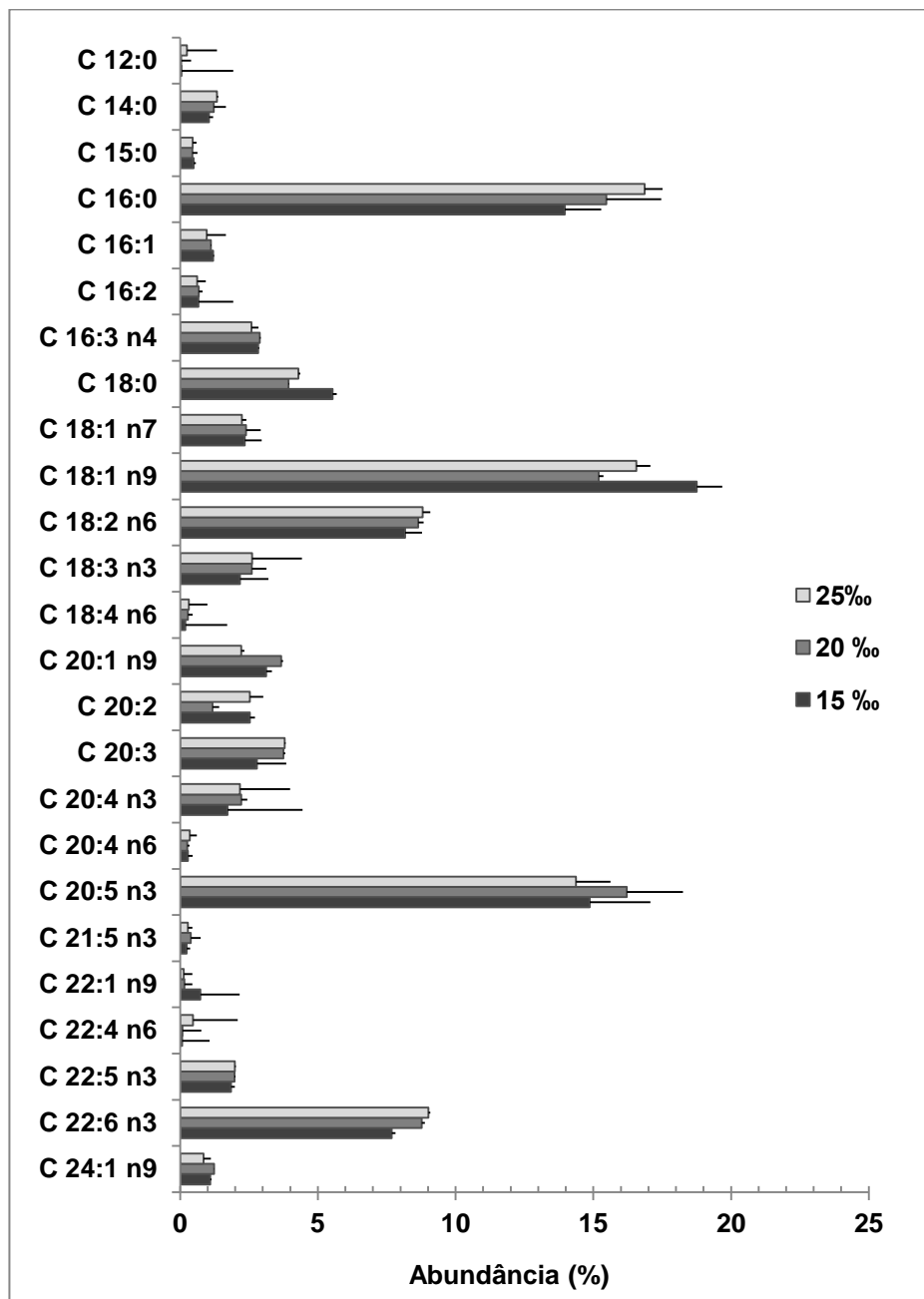


Figura 3.8 – Perfil de ácidos gordos de juvenis de *Hediste diversicolor* engordados sob influência de diferentes salinidades (15, 20 e 25); valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (n=3).

RESULTADOS

Através da análise efetuada aos diferentes ácidos selecionados (palmítico, oleico, linoleico, α -linolénico, araquidónico, eicosapentanóico, docosahexanóico) e ao ratio de DHA/EPA, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas nas quantidades obtidas dos mesmos, quando comparadas as três salinidades (15, 20 e 25) ($p > 0,05$; Tabela I).

Tabela I – Abundância (%) dos ácidos gordos selecionados em juvenis de *Hediste diversicolor* engordados sob influência de diferentes salinidades (15, 20 e 25); valores são expressos sob a forma de médio \pm desvio-padrão (n=3).

	15	20	25
Palmítico (C 16:0)	13,97 \pm 1,0	15,47 \pm 0,68	16,86 \pm 1,63
Oleico (C 18:1 n9)	18,75 \pm 2,20	15,19 \pm 2,04	16,56 \pm 1,26
Linoleico (C 18:2 n6)	8,17 \pm 1,52	8,64 \pm 0,17	8,81 \pm 0,67
α-linolénico (C 18:3 n3)	2,17 \pm 0,61	2,60 \pm 0,20	2,61 \pm 0,27
Araquidónico (C 20:4 n6)	1,19 \pm 1,59	0,26 \pm 0,03	0,35 \pm 0,26
EPA (C 20:5 n3)	14,87 \pm 1,32	16,22 \pm 1,99	14,37 \pm 0,66
DHA (C 22:6 n3)	7,68 \pm 1,88	8,77 \pm 0,36	9,01 \pm 1,08
Ratio DHA/EPA	0,52 \pm 0,16	0,55 \pm 0,06	0,63 \pm 0,11

4. Discussão

A espécie *Hediste diversicolor* tem uma ampla distribuição geográfica, estando presente em estuários e lagoas, ao longo das costas atlânticas da América do Norte e da Europa (Lindqvist *et al.*, 2013), desempenhando um papel importante nas cadeias alimentares, uma vez que constitui uma presa importante para uma grande diversidade de organismos (Cardoso *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram analisados 30 indivíduos analisados para determinar a proporção sexual, dos quais 5 eram machos e 25 eram fêmeas, sendo que apenas 3 destas se encontravam maduras, uma vez que apresentaram oócitos com diâmetro superior a 180 µm (Dales, 1950; Dhainaut, 1984; Scaps, 2002; Lawrence & Soame, 2009). Esta análise evidenciou que a proporção sexual na espécie *Hediste diversicolor* é favorecida para as fêmeas, tal como está descrito por outros autores que efetuaram estudos com incidência em populações naturais desta espécie (Abrantes *et al.*, 1999; Scaps, 2002; Figaldo e Costa, 2003).

Em relação ao ensaio de reprodução sob diferentes temperaturas, todos os organismos utilizados como reprodutores que foram mantidos em cativeiro, até ao momento em que se iniciou a indução artificial da postura sobreviveram. Este facto pode ser explicado pelas condições experimentais terem sido devidamente controladas (temperatura e salinidade) e pela constante renovação da água de cultivo, juntamente com a administração de alimento que ocorreu diariamente. Após se ter iniciado a indução da postura, ocorreu mortalidade de acordo com padrão reprodutivo da espécie *Hediste diversicolor* (semelparidade).

O alimento utilizado neste trabalho foi ração semi-húmida (suplementada com beta-glucanos) formulada para linguado e até à data, não havia qualquer registo ou qualquer informação sobre a utilização duma dieta deste tipo com a espécie em estudo, embora fosse expectável que evidenciasse bons resultados devido ao seu valor nutritivo. Durante os ensaios realizados anteriormente no laboratório de Aquacultura da ESTM, foi utilizada uma dieta para dourada e robalo (Aquagold 5, Sorgal), à semelhança de estudos realizados por outros autores (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2003b) que evidenciou resultados promissores (Pombo, com pess.). Após a sua administração, os organismos reagiam poucos segundos depois, saindo rapidamente das suas galerias e capturando o alimento diretamente, ingerindo-

o depois na superfície do sedimento ou no interior das suas galerias. É ainda importante referir que este alimento foi suplementado com beta-glucanos, facto que poderá ter contribuído para a sobrevivência dos organismos em cativeiro. Os beta-glucanos são compostos imunoestimulantes que efetuam uma elevada atividade estimuladora do sistema imunitário e essa atividade já foi demonstrada em inúmeros estudos e numa grande diversidade de espécies (Vetvicka & Sima, 2004; Soltanian *et al.*, 2009).

Uma vez que os primeiros estádios larvares não são detetados, pelo facto das larvas permanecerem no interior das galerias agregadas ao muco e protegidas pelas progenitoras entre 10 e 14 dias (Bartels-Hardege & Zeeck, 1990; Figaldo e Costa, 1999; Scaps, 2002; Aberson *et al.*, 2011), os indivíduos provenientes do evento reprodutivo induzido foram observados pela primeira vez 18 dias após se ter iniciado os choques térmicos. Estes organismos da nova geração foram observados primeiro nas caixas que se encontravam sob influência da temperatura de 25°C, tendo sido depois observados também nas caixas sujeitas à temperatura de 20°C (cinco dias depois) e por fim nas caixas que se encontravam à temperatura ambiente (16,5°C). Este acontecimento, tendo em consideração que os choques térmicos foram efetuados exatamente ao mesmo tempo em todas as temperaturas utilizadas, sugere que o desenvolvimento larvar ocorre mais rápido a temperaturas mais elevadas, exceto numa caixa à temperatura de 20°C, onde não ocorreu reprodução. Observou-se também uma grande variabilidade a nível morfológico, entre os indivíduos da nova geração que tinham a mesma idade, tal como observado por Batista *et al.* (2003). De acordo com estes autores, esta heterogeneidade entre indivíduos da mesma idade pode dever-se a diferenças genéticas, que promovem dominâncias dependentes do tamanho e conseqüentemente, hierarquias de alimentação.

Quanto ao número de indivíduos obtidos com o processo reprodutivo, de uma forma geral, este variou sensivelmente entre 1500 e 3000 indivíduos nas diferentes temperaturas testadas, tendo sido maior na temperatura de 25°C e menor na temperatura de 20°C, não havendo no entanto diferenças significativas entre todos os valores obtidos. Desta forma, não é possível evidenciar qual terá sido a melhor temperatura para a reprodução, considerando que a melhor seria a que possibilitava obter o maior número de indivíduos possível. Na temperatura de 20°C, não ocorreu reprodução numa das caixas possivelmente devido à ausência de machos ou de fêmeas entre os indivíduos utilizados como reprodutores, o que contribuiu de forma

óbvia e clara para o baixo número de espécimes que se obteve nesta temperatura. Na temperatura de 25°C, o número de indivíduos obtidos teria sido claramente maior, se não tivesse ocorrido mortalidade dos juvenis numa das caixas. Esta mortalidade ocorreu subitamente e pensa-se que poderá ter sido ocasionada devido à elevada densidade que se encontrava nessa caixa (por visualização direta, estima-se que o número de juvenis fosse superior a 3000), densidade essa que ia aumentando progressivamente à medida que os organismos cresciam, fazendo assim com que as necessidades destes fossem cada vez maiores, que por sua vez poderá ter provocado depois um decréscimo abrupto na concentração de oxigénio disponível, tendo em conta que o aumento da massa corporal por parte dos organismos correlaciona-se positivamente com o aumento da sua taxa metabólica (Brockington & Clarke, 2001; Gillooly *et al.*, 2001). Além disto, à medida que os indivíduos cresciam, o espaço disponível para cada um era cada vez menor e aumentava assim a competitividade entre eles, tanto por espaço como por alimento, fator que pode também ter contribuído para a mortalidade ocorrida.

Para se poder avaliar de forma mais correta o efeito da temperatura no processo reprodutivo, o número de machos e o número de fêmeas presentes em cada caixa deveria ser exatamente o mesmo. Neste trabalho, foram colocados 16 indivíduos em cada caixa para utilizar como reprodutores de forma a garantir a presença de machos e fêmeas, não se tendo determinado o género de cada um previamente. Deste modo, não se sabia ao certo qual o número de machos e qual o número de fêmeas presentes em cada caixa e certamente que este foi diferente em todas as caixas que se encontravam sob influência das três temperaturas testadas (16,5°C; 20°C e 25°C). A única forma através da qual se pode efetuar a identificação do género dos indivíduos desta espécie é a que está descrita por Rangel (2008), já referida no presente trabalho, na qual se retira uma porção do líquido celómico com o auxílio de agulhas hipodérmicas, para posteriormente se observar ao microscópio ótico e efetuar a identificação, procedimento que pode danificar esse tecido, juntamente com a possível indução de *stress* que pode causar nos organismos, que por sua vez poderá condicionar a sua capacidade reprodutiva, razão pela qual se optou por não efetuar esse processo. Futuramente, deveriam ser realizados estudos para clarificar esta situação, de forma a averiguar se os organismos teriam capacidade para reproduzir-se após a realização desse procedimento. Além disto, em estudos a realizar no futuro no âmbito da reprodução desta espécie, deverá ter-se em conta o fotoperíodo e deverá ter-se controlo sob o mesmo. Neste tipo de organismos (nereídeos), o fotoperíodo é

um fator que influencia significativamente a gametogênese e a desova, associado à temperatura (Lawrence & Soame, 2004; Bradshaw & Holzapfel, 2007; Lawrence & Soame, 2009).

Na segunda parte deste trabalho, referente ao ensaio de crescimento dos juvenis sob diferentes salinidades, determinaram-se diferentes parâmetros para avaliar o crescimento. A taxa específica de crescimento (% dia⁻¹) variou entre 6,67 e 7,01% nos indivíduos sob influência das diferentes salinidades, valores semelhantes aos obtidos por Fidalgo e Costa *et al.* (2000) com dietas formuladas, podendo isto dever-se ao elevado teor proteico da ração utilizada (52,12%). Diversos estudos com incidência na espécie *Hediste diversicolor*, demonstraram que a taxa específica de crescimento varia entre 0,08 e 1,5% dia⁻¹ nas populações naturais (Olivier *et al.*, 1996), podendo atingir valores mais elevados em laboratório (6-7% dia⁻¹) quando são utilizados alimentos com teores de proteína elevados (Nesto *et al.*, 2012).

Em relação à taxa de incremento diário (g dia⁻¹), os resultados obtidos demonstraram que esta foi significativamente maior nas salinidades de 20 e 25 (0,125 ± 0,005 g dia⁻¹ e 0,123 ± 0,012 g dia⁻¹, respetivamente) comparativamente aos indivíduos sujeitos à salinidade de 15 (0,113 ± 0,008 g dia⁻¹). Quanto ao peso final atingido pelos indivíduos, os resultados obtidos evidenciaram que este foi significativamente maior nos organismos que se encontravam sujeitos às salinidades de 20 e 25 (7,675 ± 0,296 g e 7,510 ± 0,673 g, respetivamente) relativamente aos indivíduos engordados sob influência da salinidade de 15 (6,869 ± 0,449 g). Estes resultados diferem do que está descrito Nielsen *et al.* (1995), estudo no qual se avaliou a influência de diferentes salinidades no crescimento da espécie *Hediste diversicolor*, em que o maior peso final foi atingido pelos indivíduos sujeitos à salinidade de 15. No entanto, no estudo realizado por Nielsen *et al.* (1995) o crescimento dos indivíduos foi avaliado em apenas 14 dias, enquanto neste trabalho o período experimental foi de 60 dias. Além disto, os juvenis utilizados neste estudo foram provenientes do primeiro ensaio realizado (reprodução), contrariamente aos organismos utilizados por Nielsen *et al.* (1995), que foram capturados diretamente do meio natural. Em conjunto, estes fatores podem explicar parcialmente as diferenças verificadas entre os resultados obtidos no presente trabalho e os resultados alcançados no estudo acima referido. É ainda de referir que o alimento utilizado neste ensaio foi ração semi-húmida para linguado e no estudo realizado por Nielsen *et al.* (1995), o alimento foi carne de

camarão, algo que poderá também ter contribuído para as diferenças observadas no peso final dos organismos.

No que diz respeito à sobrevivência dos juvenis engordados, os resultados obtidos evidenciaram que esta variou entre 93 e 100% de uma forma geral, facto que poderá dever-se à conjugação de diferentes fatores, entre os quais o controlo devidamente efetuado de todas as condições experimentais e o ajuste destas quando necessário (salinidade), juntamente com uma renovação da água de cultivo adequada e ainda, com uma administração do alimento diária. Tal como no ensaio anterior, o alimento utilizado foi ração semi-húmida suplementado com beta-glucanos (Tabela II, em anexo). A sobrevivência foi significativamente superior ($p < 0,05$) nos indivíduos sujeitos à salinidade de 15 (100%) comparativamente à salinidade de 25 ($93,3 \pm 7,6\%$), enquanto na salinidade de 20 a sobrevivência foi de $97,8 \pm 1,7\%$, não havendo diferenças significativas quando comparada com a salinidade de 15.

A análise dos resultados alcançados, relativamente aos diferentes parâmetros de crescimento que foram determinados, sugerem que possivelmente a salinidade de 20 é a mais adequada para o crescimento dos indivíduos da espécie *Hediste diversicolor*, que sejam provenientes de um evento reprodutivo ocorrido em cativeiro, uma vez que essa salinidade possibilitou a obtenção de um peso final elevado por parte dos indivíduos experimentais, juntamente com uma sobrevivência elevada. Em todas as salinidades testadas, os indivíduos utilizados atingiram o tamanho comercial, considerando que os organismos desta espécie são comercializados geralmente com um tamanho próximo dos 10 cm, que corresponde normalmente a um peso de 0,5 g (Nesto *et al.*, 2012). É ainda importante referir que alguns destes indivíduos já se encontravam num estado de maturação avançado (evidenciado pela coloração verde adquirida pelos mesmos), algo que poderá constituir um grande problema para a aplicação numa produção comercial deste tipo de organismos, uma vez que estes morrem após se reproduzirem. Em investigações futuras, deverá proceder-se ao estudo do processo de maturação dos organismos da espécie *Hediste diversicolor*, para se poder atrasar o período correspondente a essa fase, sem comprometer o crescimento, testando-se para isso diferentes condições combinadas (fotoperíodo, temperatura e alimentação), para desta forma obter controlo total sobre essa fase. Este conhecimento, por sua vez, será fundamental para a aplicação do cultivo destes organismos à escala comercial, tendo em consideração o padrão reprodutivo desta espécie.

Relativamente à determinação do perfil lipídico dos juvenis engordados no segundo ensaio, os resultados evidenciaram que o ácido palmítico e o ácido oleico foram os ácidos gordos que estavam presentes em maiores quantidades, respetivamente, facto concordante com os resultados obtidos por García-Alonso *et al.* (2008) e Bischoff *et al.* (2009), com exceção da salinidade de 15, em que a quantidade de ácido oleico foi superior à quantidade de ácido palmítico. As quantidades elevadas de ácido palmítico, nos diferentes tratamentos (salinidades), podem indicar que este ácido gordo saturado é um elemento importante na dieta, uma vez que constitui o primeiro metabolito da síntese de ácidos gordos (enzima) e o produto inicial da lipogénese *de novo*, além de ser precursor de inúmeras moléculas importantes a nível fisiológico, em que se incluem os lípidos membranares e as ceras (García-Alonso *et al.*, 2008). Além dos ácidos gordos referidos anteriormente, o ácido eicosapentaenóico (EPA) foi também um ácido gordo encontrado em quantidades elevadas, nas diferentes amostras analisadas, tal como ocorreu na investigação realizada Bischoff *et al.* (2009). Este ácido gordo polinsaturado é um dos maiores constituintes do óleo de peixe, sendo um precursor de prostaglandinas e tromboxano (García-Alonso *et al.*, 2008). Observou-se ainda a presença de quantidades elevadas do ácido docosahexaenóico (DHA) e do ácido linoleico (excetuado a salinidade de 15). O DHA constitui um ácido gordo polinsaturado ω -3 de extrema relevância, sendo um dos componentes maioritários do óleo de peixe (García-Alonso *et al.*, 2008), enquanto o ácido linoleico é um composto importante para o crescimento dos organismos, além de ser precursor de ácidos gordos insaturados de maior cadeia (ARA e DHA) em espécie dulçaquícolas (Glencross, 2009). De certa forma, é expectável que os indivíduos cultivados possam refletir a dieta utilizada em termos de ácidos gordos, característica que afigura a espécie *Hediste diversicolor* como um candidato promissor para ser cultivada em aquacultura. Por sua vez, este cultivo poderá ser realizado de forma intensiva, como o que foi adotado com a espécie *Nereis virens* no Reino Unido ou num sistema de aquacultura integrado, em que se utilizam efluentes de cultivos adjacentes, ricos em fezes e outros resíduos orgânicos, sistema que já foi adotado com outras espécies na Ásia e na Oceânia (Fidalgo e Costa *et al.*, 2003). A espécie *Hediste diversicolor* demonstrou ser um bom candidato para ser utilizado num destes sistemas de aquacultura integrado, uma vez que a mesma pode crescer utilizando apenas como alimento as fezes da amêijoia-boia *Ruditapes decussatus* (Batista *et al.*, 2003a) e também, resíduos sólidos provenientes de sistemas de cultivo de peixes (García-Alonso *et al.*, 2008; Bischoff *et al.*, 2009).

Pela comparação efetuada aos diferentes ácidos selecionados (palmítico, oleico, linoleico, α -linolénico, ARA, EPA, DHA) e ao ratio de DHA/EPA, pôde constatar-se que não existiram diferenças significativas nas quantidades obtidas dos mesmos, a partir de amostras provenientes de indivíduos engordados a diferentes salinidades (15, 20 e 25), o que por sua vez evidencia que a salinidade não exerce nenhuma influência no perfil de ácidos gordos de indivíduos da espécie *Hediste diversicolor*. Esta evidência constatada pode estar relacionada com o facto da espécie *Hediste diversicolor* constituir um organismo osmorregulador, que promove o controlo da concentração dos fluídos internos independentemente das alterações da salinidade na água (Tait & Dipper, 1998), o que por sua vez, faz com que a sua composição lipídica não se altere. Esta característica faz com que esta espécie como uma possível candidata ao cultivo em diferentes locais (estuários e/ou rias), sem que a sua composição em termos lipídicos se altere.

5. Conclusões

Com a realização deste trabalho, foi possível concluir que a espécie *Hediste diversicolor* se reproduz a diferentes temperaturas em cativeiro, uma vez que não ocorreram diferenças significativas no número de juvenis obtidos entre os diferentes tratamentos, tendo-se verificado que o processo reprodutivo ocorre às diferentes temperaturas testadas (16,5°C; 20°C e 25°C), atingindo-se densidades elevadas em todas elas. No entanto, os resultados sugerem que a temperatura de 25°C possibilitou um desenvolvimento larvar mais rápido relativamente às restantes, podendo desta forma ser considerada uma temperatura adequada para a reprodução e para o desenvolvimento larvar da espécie em estudo. Futuramente, poderão ser realizados estudos para evidenciar a temperatura mais adequada para a reprodução da espécie *Hediste diversicolor*, com o conhecimento do número de machos e de fêmeas presentes. Relativamente ao efeito da salinidade no crescimento, pelos resultados obtidos pôde concluir-se que a salinidade de 20 é a mais adequada para o crescimento desta espécie em cativeiro, uma vez que possibilita a obtenção de um peso final elevado por parte dos organismos em cultivo, juntamente com uma sobrevivência elevada. Quanto à avaliação do efeito da salinidade no perfil de ácidos gordos, foi possível concluir que a salinidade não influencia o perfil lipídico em indivíduos da espécie *Hediste diversicolor*, o que possibilita o cultivo desta espécie em diferentes zonas costeiras (estuários e/ou rias), sem que a sua composição lipídica se altere.

Face aos resultados obtidos, pôde constatar-se que a espécie *Hediste diversicolor* consegue reproduzir-se sob diferentes temperaturas atingindo-se elevadas densidades, bem como crescer e sobreviver em diferentes condições de salinidade, podendo atingir o tamanho comercial em 3 meses aproximadamente. Estas particularidades permitem antever o potencial que o cultivo desta espécie apresenta, cuja aplicação a nível comercial seria de grande interesse, dos pontos de vista económico e ecológico, uma vez que iria possibilitar uma redução dos impactos que resultam da exploração da espécie *Hediste diversicolor* no meio natural, além de poder constituir uma alternativa à importação de poliquetas. No entanto, deverão ainda ser realizados mais estudos no âmbito da maturação e da reprodução desta espécie em cativeiro, para se efetuar o controlo destas fases, sendo isto determinante para a implementação de um protocolo que suporte o cultivo comercial deste tipo de organismos. Além disto, em investigações futuras deverão ainda ser determinadas

quais as dietas mais apropriadas para esta espécie e quais as quantidades ideais destas a administrar, bem como as densidades mais adequadas a utilizar, de modo a que a produção seja viável a nível comercial.

Referências bibliográficas

- Aberson, M., Bolam, S., Hughes, R. 2011. The dispersal and colonisation behaviour of the marine polychaete *Nereis diversicolor* (O. F. Müller) in south-east England. *Hydrobiologia*. 672, 3-14 pp.
- Abrantes, A., Pinto, F., Moreira, M. H. 1999. Ecology of the polychaete *Nereis diversicolor* in the Canal de Mira (Ria de Aveiro, Portugal): Population dynamics, production and oogenic cycle. *Acta Oecologica* 20 (4), 267-283 pp.
- Andries, J. 2001. Endocrine and environmental control of reproduction in Polychaeta. *Canadian Journal of Zoology*. 79, 254-270 pp.
- Bartels-Hardege, H., Zeeck, E. 1990. Reproductive behavior of *Nereis diversicolor* (Anellida: Polychaeta). *Marine Biology*. 106, 409-412 pp.
- Batista, F. M., Fidalgo e Costa, P., Matias, D., Joaquim, S., Massapina, C., Passos, A. M., Ferreira, P. P., Cancela da Fonseca, L. 2003a. Preliminary results on the growth and survival of the polychaete *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 19(1-4), 443-446 pp.
- Batista, F. M., Fidalgo e Costa, P., Ramos, A., Passos, A. M., Ferreira, P. P., Cancela da Fonseca, L. 2003b. Production of the ragworm *Nereis diversicolor* (O. F. Müller, 1776), fed with a diet for gilthead seabream *Sparus auratus* L., 1758: survival, growth, feed utilization and oogenesis. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 19(1-4), 447-451 pp.
- Bell, J. G., Koppe, W. 2010. "Lipids in Aquafeeds". *In: Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds* (Eds. Turchini, G. M., Ng, W., Tocher, D. R.). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. 21-60 pp.
- Bischoff, A. A., Fink, P., Waller, U. 2009. The fatty acid composition of *Nereis diversicolor* cultured in an integrated recirculated system: Possible implications for aquaculture. *Aquaculture*. 296, 271-276 pp.
- Blake, J. A., Ruff, R. E. 2007. Polychaeta. *In: The Light and Smith Manual: Intertidal Invertebrates from Central California to Oregon* (Ed. Carlton, J. T.). University of California, Berkeley. 309-410 pp.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917 pp.
- Bradshaw, W., Holzapfel, C. 2007. Evolution of Animal Photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 38, 1-25 pp.
- Brockington, S., Clarke, A. 2001. The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 258, 87-99 pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardoso, P. G., Pereira, E., Grilo, T. F., Duarte, A. C., Pardal, M. A. 2011. Kinetics of Mercury Bioaccumulation in the Polychaete *Hediste diversicolor* and in the Bivalve *Scrobicularia plana*, Through a Dietary Exposure Pathway. *Water, Air & Soil Pollution*. 223 (1), 421-428 pp.
- Carvalho, S., Constantino, R., Cerqueira, M., Pereira, F., Subida, M. D., Drake, P., Gaspar, M. B. 2013. Short-term impact of bait digging on intertidal macrobenthic assemblages of two south Iberian Atlantic systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 132, 65-76 pp.
- Cesário, R. I. T. 2007. Efeito da bioturbação na distribuição de metais e de isótopos estáveis de Pb em sedimentos de sapal, no estuário do Tejo. Dissertação de Mestrado em Biologia e Gestão de Recursos Marinhos. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. 76 pp.
- Cohen, A. N., Weinstein, A., Emmett, M. A., Lau, W., Carlton, J. T. 2001. Investigations into the introduction of non-indigenous marine organisms via the cross-continental trade in marine baitworms. A report for the U.S. Fish and Wildlife Service. San Francisco Bay Program. Sacramento Fish and Wildlife Office. USA. 34 pp.
- Dales, R. P., 1950. The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* O. F. Müller. *Journal of the Marine Biological Association UK*. 29, 321-360 pp.
- De Silva, S. S., Francis, D. S., Tacon, A. G. 2010. "Fish Oils in Aquaculture: In Retrospect". *In: Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds* (Eds. Turchini, G. M., Ng, W., Tocher, D. R.). CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. 1-20 pp.
- Dhainaut, A. 1984. Oogenesis in polychaetes. Ultrastructural differentiation and metabolism of nereid oocytes. *Fortschr. Zool*. 29, 183-204 pp.
- Dinis, M. T. 1986. Quatre Soleidae de l'estuaire du Tage. Reproduction et croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup. These Doctorat, Université Bretagne Occidentale, Brest. 357 pp.
- Durou, C., Mouneyrac, C. 2007. Linking steroid hormone levels to sexual maturity index and energy reserves in *Nereis diversicolor* from clean and polluted estuaries. *General and Comparative Endocrinology*. 150, 106-113 pp.
- Durou, C., Mouneyrac, C., Amiad-Triquet, C. 2008. Environmental quality assessment in estuarine ecosystems: Use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). *Water Research*. 42, 2157-2165 pp.
- Falcão, M., Caetano, M., Serpa, D., Gaspar, M., Vale, C. 2006. Effects of infauna harvesting on tidal flats of a coastal lagoon (Ria Formosa, Portugal): Implications on phosphorus dynamics. *Marine Environmental Research*. 61, 136-148 pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferreira, P. P. 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. IPIMAR. 235 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Cancela da Fonseca, L., 1995. Resultados Preliminares sobre a "Minhoca-da-Pesca" (*Hediste diversicolor* O.F. Müller 1776) no Sistema Lagunar da Carrapateira (Costa Sudoeste de Portugal). 8º Congresso do Algarve, 933-941 pp.
- Fidalgo e Costa, P. 1999. Reproduction and growth in captivity of the polychaete *Nereis diversicolor* O.F. Müller, 1776, using two different kinds of sediment: Preliminary assays. Boletín del Instituto Español de Oceanografía. 15 (1-4), 351-355 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Narciso, L., Cancela da Fonseca, L. 2000. Growth, survival and fatty acid profile of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller, 1776) fed on six different diets. Bulletin of Marine Science. 67(1), 337-343 pp.
- Fidalgo e Costa, P., 2001. Bio-ecologia e produção do poliqueta *Nereis diversicolor* O. F. Müller, recurso zoológico de ambientes costeiros. Tese de doutoramento. Universidade de Lisboa. 166 pp.
- Fidalgo e Costa, P. 2003. The oogenic cycle of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Annelida: Polychaeta) in shallow water environments in southwestern Portugal. Boletín del Instituto Español de Oceanografía. 19(1-4), 17-29 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Cancela da Fonseca, L., Passos, A. M. 2003. Polychaetes and their potential use in aquaculture. World aquaculture. September, 41-43 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Cancela da Fonseca, L., Oliveira, R. F. 2006. Feeding ecology of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) (Annelida, Polychaeta) on Estuarine and Lagoon Environments in the Southwest Coast of Portugal. Pan-American Journal of Aquatic Sciences. 1(2), 114-126 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Gil, J., Passos, A. M., Pereira, P., Melo, P., Batista, F., Cancela da Fonseca, L. 2006. The market features of imported non-indigenous polychaetes in Portugal and consequente ecological concerns. Scientia Marina. 70S3, 287-292 pp.
- García-Alonso, J., Müller, C. T., Hardege, J. D. 2008. Influence of food regimes and seasonality on fatty acid composition in the ragworm. Aquatic Biology. 4, 7-13 pp.
- Gillet, P., Mouloud, M., Mouneyrac, C., Simo, P., Gilbert, F. 2012. Preliminary data on the bioturbation activity of *Hediste diversicolor* (Polychaeta, Nereididae) from the Loire Estuary, France. The Open Marine Biology Journal. 6, 53-56 pp.
- Gillooly, J., Brown, J., West, G., Savage, V. M., Charnov, E. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. Science. 293, 2248-2251 pp.
- Gomes, T., Gonzalez-Rey, M., Rodríguez-Romero, A., Trombini, C., Riba, I., Blasco, J., Bebiani, M. J. 2013. Biomarkers in *Nereis diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) as management tools for environmental assessment on the southwest Iberian coast. Scientia Marina. 77S1, 69-78 pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Glencross, B. D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*. 1, 71-124 pp.
- Golding, D., Yuwono, E. 1994. Latent capacities for gametogenic cycling in the semelparous invertebrate *Nereis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91, 11777-11781 pp.
- Haska, C. L., Yarish, C., Kraemer, G., Blaschik, N., Whitlatch, R., Zhang, H., Lin, S. 2012. Bait worm packaging as a potential vector of invasive species. *Biological Invasions*. 14, 481-493 pp.
- Hutchings, P. 1998. Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiversity and Conservation*. 7, 1133-1145 pp.
- Izquierdo, M. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *In: Mediterranean fish nutrition* (eds. Basurco, B., Nengas, I., Alexis, M., Izquierdo, M.). Zaragoza: CIHEAM (Cahiers Options Méditerranéennes). 63, 91-102 pp.
- Kristensen, E., Mikkelsen, O. 2003. Impact of the burrow-dwelling polychaete *Nereis diversicolor* on the degradation of fresh and aged macroalgal detritus in a coastal marine sediment. *Marine Ecology Progress Series*. 265, 141–153 pp.
- Lawrence, A., Soame, J. 2004. The effects of climate change on the reproduction of coastal invertebrates. *Ibis*. 146 (1), 29-39 pp.
- Lawrence, A., Soame, J. 2009. The endocrine control of reproduction in Nereidae: a new multi-hormonal model with implications for their functional role in a changing environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 364, 3363-3376 pp.
- Lindqvist, S., Gilbert, F., Eriksson, S. P., Hulth, S. 2013. Activities by *Hediste diversicolor* under different light regimes: Experimental quantification of particle reworking using time-resolved imaging. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 448, 240-249 pp.
- Luis, O. J. 1989. Contribuição para o conhecimento da nutrição de *Palaemon serratus* e *Penaeus kerathurus* (Crustacea, Decapoda), com ênfase para o papel dos lípidos no crescimento e reprodução. Doctoral thesis. Universidade de Lisboa. 374 pp.
- Marty, R., Retière, C. 1999. Larval-to-juvenile mobility activities of a holobenthic species, *Nereis diversicolor* (O. F. Müller) (Polychaeta, Nereidae) -their involvement in recruitment. *Bulletin of Marine Science*. 65(3), 761-773 pp.
- Nesto, N., Libertini, A., Prevedelli, D., Simonini, R., Masala, C. T., Da Ros, L. 2010. Spawning induction, fertilization and larval development of *Hediste diversicolor* (Nereididae, Polychaeta) under different experimental conditions. *Rapport Commission International Mer Méditerranée*. 39, 604 pp.
- Nesto, N., Simonini, R., Prevedelli, D., Da Ros, L. 2012. Effects of diet and density on growth, survival and gametogenesis of *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776) (Nereididae, Polychaeta). *Aquaculture*. 362, 1-9 pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nielsen, A., Eriksen, N., Iversen, J., Riisgård, H. 1995. Feeding, growth and respiration in the polychaetes *Nereis diversicolor* (facultative filter-feeder) and *N. virens* (omnivorous) – a comparative study. *Marine Ecology Progress Series*. 125, 149-158 pp.
- Olive, P. 1999. Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism. *Hydrobiologia*. 402, 175-183 pp.
- Olivier, M., Desrosiers, G., Caron, A., Retière, C., Caillou, A. 1996. Juvenile growth of *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) feeding on a range of marine vascular and macroalgal plant sources under experimental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208, 1-12 pp.
- Olsgard, F., Brattegard, T., Holthe, T. 2003. Polychaetes as surrogates for marine biodiversity: lower taxonomic resolution and indicator groups. *Biodiversity and Conservation*. 12, 1033-1049 pp.
- Pinto, F. C., 1997. Estudo da dinâmica populacional, produção e ciclo reprodutor de poliqueta *Nereis diversicolor* (O.F. Müller, 1776) no Canal de Mira, Ria de Aveiro. Dissertação para obtenção de grau de Mestre, Aveiro, 125 pp.
- Pires, A., Gentil, F., Quintino, V., Rodrigues, A.M. 2012. Reproductive biology of *Diopatra neapolitana* (Annelida, Onuphidae), an exploited natural resource in Ria de Aveiro (Northwestern Portugal). *Marine Ecology*. 33(1), 56-65 pp.
- Rangel, L. F. 2008. Parasitas metazoários de poliquetas (*Nereis diversicolor* e *Diopatra neapolitana*) da Ria de Aveiro. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada. Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 105 pp.
- Ravana, A., Moreira, M. H. 2013. Polychaeta (Annelida) from the continental shelf off Aveiro (NW Portugal): Species composition and community structure. *Check List* 9(3), 533-539 pp.
- Riisgård, H., Larsen, P. 2010. Particle capture mechanisms in suspension-feeding invertebrates – Review. *Marine Ecology Progress Series*. 418, 255-293 pp.
- Rosa, S., Granadeiro, J., Vinagre, C., França, S., Cabral, H., Palmeirim, J. 2008. Impact of predation on the polychaete *Hediste diversicolor* in estuarine intertidal flats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 78, 655-664 pp.
- Rouse, G., Pleijel, F. 2001. *Polychaetes*. Oxford University Press, Oxford. 354 pp.
- Rustan, A., Drevon, C. 2005. Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. 1-7 pp.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*. 177, 191-199 pp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Soltanian, S., Stuyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*. 35(2), 109-138 pp.
- Tait, R. V., Dipper, F. A. 1998. *Elements of Marine Ecology* (4th Edition). Butterworth Heinemann, Oxford. 462 pp.
- Techapremreecha, S., Khongchareonporn, N., Chaicharoenpong, C., Aranyakananda, P., Chunhabundit, S., Petsom, A. 2011. Nutritional composition of farmed and wild sandworms, *Perinereis nuntia*. *Animal Feed Science and Technology*. 169, 265-269 pp.
- Vedel, A., Riisgård, H. 1993. Filter-feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*: growth and bioenergetics. *Marine Ecology Progress Series*. 100, 145-152 pp.
- Virgilio, M., Abbiati, M. 2004. Habitat discontinuity and genetic structure in population of the estuarine species *Hediste diversicolor* (Polychaeta: Nereididae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 61, 361-367 pp.
- Vetvicka, V., Sima, P. 2004. β -Glucan in invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*. 1, 60-65 pp.
- Younsi, M., Dass, T., Dass, O., Scaps, P. 2010. Polychaetes of commercial interest from the Mediterranean East Coast of Algeria. *Mediterranean Marine Science*. 11(1), 185-188 pp.

Anexos

Tabela II – Composição da ração semi-húmida (formulada para linguado).

Matéria seca	Ração semi-húmida
	%
Farinha de peixe 70 LT	20,0
Farinha de peixe 60	17,0
Farinha de krill	9,0
CPSP G	8,0
Farinha de lula	7,0
Farinha de soja 48	10,0
Farinha de trigo	13,0
Trigo DDGS	3,0
Óleo de peixe	10,30
Vit. & Min. Premix com Asta	1,0
Algatrium DHA 70%	1,70
Beta-glucanos (suplemento)	0,50
TOTAL	100,0
Composição teórica	%
Proteína bruta	52,12
Proteína digestível	48,47
Gordura bruta	20,03
Fibra	1,31
Amido	9,45
Energia Bruta (MJ/kg)	23,33
Arg	3,35
His	1,25
Ile	1,99
Leu	3,27
Lis	3,68
Thr	2,12
Trp	0,52
Met + Cis	1,97
Fen + Tir	3,60
Fósforo	1,14
Ác. Oleico	1,98
ARA	0,24
EPA	2,24
DHA	2,41
Astaxantina (mg/kg)	25,0
Vitamina E (mg/kg)	150,0
Vitamina C (mg/kg)	1000,0
Vitamina A (mg/kg)	20000,0
Beta-glucanos	0,50

Tabela III – Número de juvenis de *Hediste diversicolor* estimado, provenientes do evento reprodutivo induzido.

	T _{ambiente} (16,5°C)			T _{20°C}			T _{25°C}		
Nº juvenis *	420	2940	3220	0	2100	2240	3920	1540	3500

* Obtido através de uma regra de três simples, na qual se estimou o número de indivíduos presentes no volume de sedimento ocupado ($V = 0,021 \text{ m}^3$) com base no número médio de indivíduos encontrados em 5 subamostras obtidas com o segmento do tubo utilizado ($V = 0,00015 \text{ m}^3$).