



***Efeito de três dietas no crescimento do anelídeo poliqueta
Hediste diversicolor***

António Pedro Manso de Oliveira dos Santos

[2014]



***Efeito de três dietas no crescimento do anelídeo poliqueta
Hediste diversicolor***

António Pedro Manso de Oliveira dos Santos

Dissertação para a Obtenção do Grau de Mestre em
Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da
Doutora Ana Pombo, da Especialista Teresa Baptista e do
Doutor Pedro Fidalgo e Costa

[2014]

Título: Efeito de três dietas no crescimento do anelídeo poliqueta *Hediste diversicolor*
Copyright © António Pedro Manso de Oliveira dos Santos

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2014

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/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora Professora Doutora Ana Pombo pela inteira disponibilidade em participar neste trabalho, pelos conselhos que me deu ao longo do mesmo e que permitiram tornar esta dissertação mais valiosa em todos os campos e apoiando-me com o seu entusiasmo constante levando-me a acreditar que tudo era possível. Muito obrigado por me ajudar a perceber que eu nem sempre estive correto.

Agradeço igualmente à minha co-orientadora Professora especialista Teresa Baptista pela compreensão da minha teimosia que nem sempre foi proveitosa e, acima de tudo, pela partilha do seu conhecimento em aquacultura. Obrigado pelo apoio e conselhos experientes e sábios ao longo de todo o tempo desta tese.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Pedro Fidalgo e Costa estou muito grato pela inteira disponibilidade em participar neste trabalho, contribuindo desta forma com a enorme mais valia dos seus conhecimentos técnicos sobre a espécie em causa, permitindo tornar este trabalho mais rico.

À Professora Doutora Susana Mendes pela paciência em me auxiliar com a parte estatística e pela disponibilidade constante, estou muito grato.

Ao Tiago Simões um muito obrigado pela ajuda em toda a parte laboratorial e, claro, pelos conselhos que me deu ao longo de toda essa parte!

Ao Ricardo Freire e ao Renato Bagarrão pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem sempre que foi necessário, um muito obrigado!

Não podia deixar de agradecer à minha família, mais concretamente à minha Mãe, ao meu Pai e à minha Avó por sempre acreditarem nas minhas “maluquices”, darem aso a muitas delas e de estarem sempre ao meu lado seja qual for o motivo! Obrigado pela vossa sabedoria e educação que me transmitiram ao longo de todos os dias da minha vida!!!

Um profundo e sentido agradecimento à Joana, por fazer parte da minha vida e de ser um alicerce fulcral nestes últimos anos, pois em todos os momentos deste trabalho me incentivou a fazer mais e melhor.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que tornaram possível este trabalho em todas as suas vertentes, contribuindo de forma positiva para a minha formação, tanto intelectual como pessoal.

Um muito obrigado!

Resumo

Resumo

Hediste diversicolor (OF Müller, 1776) ou a comumente denominada minhoca da lama, é um anelídeo poliqueta que tipicamente habita em ambientes marinhos rasos de águas salobras, em diferentes partes da Europa. Esta espécie tem uma elevada tolerância fisiológica a factores ambientais extremos, tais como a salinidade, temperatura e níveis de oxigénio dissolvido, podendo assim ser cultivada e reproduzida em diferentes tipos de sedimentos. No ambiente selvagem como também em condições laboratoriais, estes poliquetas podem utilizar diferentes tipos de alimentos. Com vista a evidenciar o potencial do cultivo de *H. diversicolor* foi determinado o crescimento final dos juvenis engordados, expresso em peso final (g). Foram também determinados outros parâmetros: a taxa específica de crescimento (%), a taxa de sobrevivência (%) e perfil de ácidos gordos dos juvenis, alimentados com três diferentes dietas. Neste trabalho foram utilizados poliquetas juvenis, provenientes de uma reprodução controlada anteriormente realizada para o efeito no laboratório de aquacultura do Instituto Politécnico de Leiria. Os indivíduos foram alimentados com duas dietas comerciais, ração seca e extrudida de dourada (*Aquagold*, Sorgal SA, Ovar, Portugal) e ração semi húmida de linguado (Moist sole, Sparos Lda, Olhão, Portugal) e ainda com uma dieta não processada, peixe congelado, mais concretamente, carapau (*Trachurus trachurus*). Os juvenis de *H. diversicolor* foram colocados em três triplicados correspondentes a cada dieta. Em cada triplicado foram colocados 30 indivíduos. Todos os parâmetros físico-químicos foram controlados diariamente. A maior taxa de crescimento foi observada quando os juvenis foram alimentados com ração de dourada (0.146 g d^{-1}) por cada 10 indivíduos. Foi registada uma taxa de sobrevivência de 100 % como resultado da administração da dieta ração de linguado, provavelmente relacionado com o imunoestimulante incluído nesta ração, que contém extratos de algas vermelhas (*Ergosan*). No entanto, nos outros dois tratamentos foram também registados resultados semelhantes, 99 e 96 %, para as dietas peixe (*Trachurus trachurus*) e ração de dourada, respetivamente. Na avaliação do teor de proteína (%) foi registado o valor mais elevado no tratamento ração de linguado, 8.87 %. De seguida, antes de se proceder ao perfil de ácidos gordos, foi determinado o teor de gordura (%) dos indivíduos cultivados e das respectivas dietas. Os resultados mostraram que o teor de gordura das dietas foi refletido na gordura dos poliquetas cultivados. Desta forma o tratamento ração de linguado apresentou o valor mais elevado 2.25 %. Contudo, no tratamento ração de dourada os valores encontrados foram similares, 2.18 %. O menor valor registado foi no tratamento da dieta peixe. De acordo com o perfil de ácidos gordos, os principais ácidos gordos encontrados nos juvenis, alimentados com as três dietas, foram ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n9), ácido eicosapentanoico (20:5n3) e docosahexaenóico (22:6n3). Embora os resultados da dieta peixe não tenham proporcionado a maior taxa

Resumo

de crescimento e o maior ganho de peso final, quando comparada com as outras duas dietas utilizadas, pode ser referido que a dieta peixe é adequada para alimentação de *H. diversicolor*.

.

Palavras-chave: Poliquetas; Aquacultura; Crescimento; Dietas; Perfil lipídico; Gordura total; Proteína bruta.

Abstract

Abstract

Hediste diversicolor (O.F. Müller, 1776) or so called common ragworm, is an Annelida polychaeta is typically an inhabitant of shallow marine and brackish waters in different parts of Europe. This species has a high physiological tolerance to extreme environmental factors such as salinity, temperature and dissolved oxygen levels. Can be farmed and reproduced in different types of sediment. In the field and also under laboratory conditions this worm can utilize different types of food. In order to highlight the potencial of *H. diversicolor* we have determined the growth, expressed as: final weight (g). Also other parameters were determined: specific growth rate (%). survival rate (%) and fatty acid profile of the juvenile worms fed with three different diets. This experiment was carried out with juvenile worms, from a controlled reproduction with wild adults, reared in aquaculture laboratory of Polytechnic Institute of Leiria. *H. diversicolor* individuals were fed with two commercial diets, seabream dry food (*Aquagold*, Sorgal SA, Ovar, Portugal) and semi wet pellets for cultured sole (*Moist sole*, Sparos Lda, Olhão, Portugal), and with non processed diet, fish fillet from the mackerel *Trachurus trachurus*. *H. diversicolor* juveniles were placed in three replicates for each diet, with 30 worms per replicate. All physicochemical parameters, such as temperature and salinity, were controlled daily. The higher growth rate was observed when juveniles were fed with seabream dry food (0,146 g⁻¹ for 10 individuals). Survival rate of 100 % was observed in the *moist sole* diet treatment, probably related to the immunostimulant included in this feed that contained red algae extracts (*Ergosan*). However, in the other two treatments there were also reported similar results, 99 and 96 %, for seabream dry food and fish diets, respectively. In the evaluation of protein content (%), was determined that *moist sole* feed provided the highest percentage to the cultured worms, with 8.87 %. The results showed that the total fat content of the diets was reflected in the fat of the cultured worms. So, the treatment fed with *moist sole* diet was the one with the higher fat content 2.25 %. Individuals fed with seabream dry food shown similar results 2.18 %. The lower percentage was related to the fish fillet diet, with 0.85 %. According to the fatty acid profile, the major fatty acids found in the juveniles fed with the three diets were palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1n9); eicosapentanoic acid (20:5n3) and docosahexaenoic acid (22:6n3). Although results show that mackerel fillet was not the diet with the higher growth rate and final weight achieved, when compared to the other two diets, but it is proved that it can be suitable to feed *H. diversicolor*.

Key-words: Polychaetes, Aquaculture; Growth, Diets; Fatty acid profile; Total fat; Crude protein.

ÍNDICE	Pag.
Resumo	ix
Abstract	xiii
Introdução	1
1.1. Biologia geral dos poliquetas	1
1.2. Espécie <i>Hediste diversicolor</i>	2
1.2.1. Anatomia, características externas e especificidades dos poliquetas	2
1.2.2. Ciclo de vida e reprodução	5
1.2.3. Distribuição e habitat	7
1.2.4. Alimentação	8
1.3. Ecologia	9
1.4. Aquacultura, comércio e indústria de poliquetas	10
1.5. Ácidos gordos em <i>H. diversicolor</i>	12
Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	14
Materiais e Métodos	17
3.1. Condições e especificidades da reprodução	17
3.1.1. Preparação do sistema de cultivo	17
3.1.2. Recolha e seleção dos reprodutores	19
3.1.3. Alimentação e rotinas dos reprodutores	19
3.1.4. Alimentação e rotinas após reprodução	20
3.2. Condições de cultivo do ensaio de crescimento	20
3.2.1. Recolha dos juvenis	20
3.2.2. Preparação do sistema de cultivo	21
3.2.3. Seleção e aclimação dos juvenis	23
3.2.4. Alimentação e rotinas	24
3.2.5. Recolha e análise dos indivíduos adultos	25
3.3. Ácidos gordos	26
3.3.1. Extração da gordura pelo método modificado de Bligh & Dyer (1959)	26
3.3.2. Metilação ácida dos ácidos gordos	27
3.3.3. Análise no cromatógrafo gasoso (GC)	27
3.4. Análise proteica do teor de proteína bruta	28
3.5. Análise estatística	29
Resultados	33
4.1. Ensaio de crescimento	33
4.1.1. Perfil lipídico e ácidos gordos	40
Discussão dos resultados	45
Perspetivas Futuras	59
Bibliografia	63
Anexos	73

Introdução

1.1. Biologia geral dos poliquetas

O filo annelida (an-nel'i-da) (L. annelus, pequeno anel, + ida, pl. sufixo) consiste comumente na designação de vermes segmentados. É um filo bastante diversificado que comporta aproximadamente 15 000 espécies, e de entre as mais comuns estão as minhocas da terra e as minhocas de água doce (classe Oligochaeta). Contudo sensivelmente dois terços do filo é constituído pela classe polychaeta, que engloba os anelídeos marinhos, que por sua vez são os organismos menos conhecidos pela população em geral (Barnes *et al.*, 2004; Purschke, 2005). Os anelídeos são protostómios celomados pertencentes ao superfilo Lophotrochozoa, que exibem uma clivagem espiral e desenvolvimento de mosaico. São um grupo de organismos bem desenvolvido, em que o sistema nervoso é mais centralizado e o sistema circulatório já se pode caracterizar com alguma complexidade (Hickman *et al.*, 2006). Os indivíduos deste filo possuem o corpo dividido por anéis ou dividido mediante segmentos (também designados por metâmeros), daí a designação de anelídeos. Cada um dos anéis ou segmentos formam uma série linear e são externamente circundados ou revestidos por outros anéis circulares chamados de *annuli*. A segmentação corporal referida é denominada de metamerização, que resulta na divisão do corpo do animal em séries de segmentos, em que cada um deles contém componentes semelhantes de todos os sistemas de órgãos. Nos anelídeos, os segmentos são delimitados internamente pelos septos. Esta segmentação evoluiu de forma independente nos anelídeos, artrópodes e vertebrados (Barnes *et al.*, 2004; Purschke, 2005; Hickman *et al.*, 2006).

Mais concretamente, os poliquetas são animais invertebrados marinhos muito comuns, contudo habitam abaixo da superfície, sendo difícil a sua observação casual. De entre as 9000 espécies descritas, existe uma ampla gama distinta em termos de formas corporais e de hábitos de vida, refletindo-se no agrupamento de 86 famílias desta mesma classe. A maioria dos espécimes encontrados não excede os 10 cm de comprimento e o diâmetro pode variar de 2 a 10 mm. Espécies pertencentes ao género *Eunice* e *Hediste* podem incluir animais com um comprimento superior a 1 metro. Muitos poliquetas têm uma aparência muito distinta e fora do vulgar, com colorações avermelhadas, rosadas ou verdes, e ainda com uma combinação de cores (Barnes *et al.*, 2004).

Introdução

O poliqueta geralmente é segmentado, com um corpo formado por segmentos cilíndricos, ou setíferos, cada um destes ladeado por um par de parápodes, isto é, apêndices carnudos para locomoção ou natação (Purschke, 2005; Tzetlin & Filippova, 2005). Na parte anterior do corpo existe o prostómio, onde nele está incluída toda a parte responsável pela agregação dos órgãos sensoriais. Por sua vez, a boca está situada na parte ventral do corpo, denominada de peristómio, sendo aqui que começa o primeiro segmento corporal. A parte não segmentada ou parte terminal, o pigídio, é onde se localiza o ânus, mas apenas alguns poliquetas possuem esta estrutura, contudo os diferentes hábitos/estilos de vida destes anelídeos desta classe levou a que houvessem diferentes graus de modificações a este nível (Barnes *et al.*, 2004; Purschke, 2005).

Este tipo de invertebrados pode ser caracterizado como errante ou como sedentários. Os poliquetas errantes incluem espécies que são estritamente pelágicas, alguns que se movimentam/rastejam ativamente por baixo de conchas e rochas, alguns que são construtores de galerias em sedimento como areia e lama e outros que vivem em tubos estacionários, na qual se insere a espécie *Hediste diversicolor*, que será abordada ao longo desta dissertação. Por sua vez, as espécies sedentárias constroem e habitam tubos/galerias com variados níveis de complexidade. Algumas dessas espécies denominadas por tubícolas sedentários não saem das suas galerias ou tubos e somente projetam as suas cabeças para fora das mesmas em busca de alimento. (Fidalgo e Costa, 2000; Scaps, 2002; Barnes *et al.*, 2004)

1.2. Espécie – *Hediste diversicolor*

1.2.1. Anatomia, características externas e especificidades dos poliquetas

A espécie *Hediste diversicolor* O. F. Müller, 1776 pertence à família Nereididae e à ordem Phyllodocida (Scaps, 2002; Breton *et al.*, 2003). Em *H. diversicolor* cada setífero é composto por um par de parápodes. Cada parápode consiste em duas divisões, uma superior e uma ventral, o notopódio e o neuropódio, respetivamente. Cada uma destas divisões é suportada internamente por cerdas quitinosas, interligadas internamente aos músculos dos parápodes, proporcionando assim o movimento destes e permitindo a deslocação do animal (Barnes *et al.*, 2004; Tzetlin & Filippova, 2005).

Introdução

Assemelhando-se a um gênero de tentáculos, e comportando a parte sensorial, os *cirri*, projetam-se a partir da base dorsal do notopódio e da base ventral do neuropódio. Os notopódio e o neuropódio assumem diferentes formas consoante o taxa a que pertencem e podem ainda ser divididos em diversos lobos. Nos parápodes as cerdas podem ter diferentes formas num mesmo organismo. A sua função está relacionada com a parte motora, mais concretamente com o melhoramento da tração, quer ao nível do sedimento quer ao nível de outras superfícies (Purschke, 2005; Tzetlin & Filippova, 2005). Algumas são do tipo espátula que são utilizadas para escavar, aquando da realização das galerias, outras assemelham-se a pagaias, usadas no auxílio da natação, outras possuem saliências microscópicas, semelhantes a ganchos, usadas com o intuito de segurar/agarrar as paredes interiores das galerias ou tubos.

Em termos musculares os poliquetas são animais de corpo mole. A sua mobilidade e a manutenção da forma do corpo são afetados pelo sistema muscular. O sistema muscular é composto por vários componentes, tais como fibras circulares e longitudinais das paredes do corpo, pelas parápodes, fibras dorsoventrais, bem como pelas estruturas musculares dos septos e mesentério (ligamento muscular). Portanto, o conhecimento da construção do sistema muscular dos poliquetas é importante para a compreensão das tendências evolutivas deste grupo e dos diferentes hábitos de vida observados (Tzetlin & Filippova, 2005).

A cabeça dos poliquetas pode consistir somente no prostómio, prostómio e peristómio, ou prostómio, peristómio e um ou mais segmentos adicionais (Fig.1) No geral, estes animais são únicos dentro do filo dos anelídeos no que concerne à existência de diferentes apêndices sensoriais cefálicos, com funções no sistema nervoso e órgãos sensoriais (Barnes *et al.*, 2004; Hickman *et al.*, 2006). Os apêndices encontrados no prostómio são as antenas e os palpos. Para finalizar, a sua anatomia externa consiste num corpo segmentado, composto por três regiões: a cabeça ou prostómio, com os órgãos sensoriais; o tronco, organizado por contínuos segmentos homólogos, que possuem um par de prolongamentos laterais, os parápodes, que contêm as sedas quitinosas; e o pigídio, no extremo posterior, com o ânus (Barnes *et al.*, 2004; Purschke, 2005; Hickman *et al.*, 2006; Rangel, 2008).

Introdução

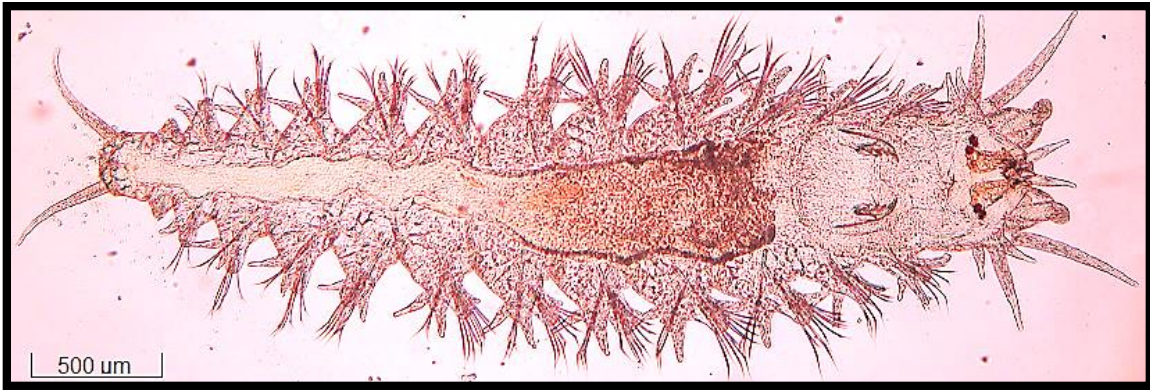


Figura 1. Preparação de microscopia óptica de um juvenil de *H. diversicolor*.

Relativamente a questões sensoriais, *H. diversicolor* pode responder a uma variedade de estímulos sensoriais e conseqüentemente possuem uma variedade de estruturas sensoriais. Dentro do contexto sensorial, podem ser destacadas importantes estruturas como os palpos, antenas, apêndices no tronco e olhos. Pode também ser destacado o órgão apical, que corresponde ao órgão sensorial mais importante da fase larvar, que compreende uma série de células multiciliadas e várias células de suporte (Orrage & Muller, 2005; Purschke, 2005).

Até recentemente, era amplamente aceite que os invertebrados não possuíam um elevado grau de especificidade e memória nas suas estratégias imunes, porém estudos recentes têm desafiado esse ponto de vista de tal forma que a nossa compreensão das capacidades dos sistemas imunitários dos invertebrados precisa de ser reavaliado (Rowley & Powell, 2007). Pois há evidências que sugerem a existência de um elevado grau de memória e especificidade em alguns invertebrados. Os níveis elevados de fagocitose podem ser a explicação parcial para esse fenómeno (Dhainaut & Scaps, 2001; Rowley & Powell, 2007).

Em termos de defesa imunológica, *H. diversicolor* apresenta uma reação imunológica designada por encapsulação, que consiste no isolamento de corpos estranhos por granulócitos G2, e produção de um pigmento castanho, de natureza melanínica. A melanina destrói os parasitas devido à sua toxicidade (Porchet-Henneré & Vernet, 1992). Está descrito que os poliquetas são sujeitos numerosos parasitas e a bactérias, presentes na água e no sedimento. A primeira proteção bacteriana está presente no muco que reveste a parede da galeria (Dhainaut & Scaps, 2001). Mais recentemente os autores Cuvillier-Hot *et al* (2014) afirmam que o sistema imunitário dos

Introdução

poliquetas comporta tanto a imunidade celular como a imunidade humoral. Na imunidade celular está incluída uma variedade de mecanismos como a fagocitose, mecanismos citotóxicos e processos de encapsulação que resultam na eliminação de corpos estranhos, como descrito anteriormente. Já na imunidade humoral comportam células “especiais” que segregam substâncias antimicrobianas, mais concretamente peptídeos antimicrobianos e proteínas, e segregam ainda outros compostos ativos no fluido celómico.

Além dos poliquetas estarem sujeitos a patologias, também atuam como vetores virais, mais concretamente de *White spot syndrome virus* (WSSV), ou síndrome dos pontos brancos, encontrados em reprodutores de *Penaeus monodon*. *H. diversicolor* acumula o patogénico no trato digestivo por meio da alimentação, porém, este vírus não é prejudicial para o poliqueta hospedeiro (Vijayan *et al.*, 2005).

1.2.2. Ciclo de vida e reprodução

O ciclo de vida associado a este poliqueta é bastante complexo e é denominado por bento pelágico (Marty & Retière, 1999; Scaps, 2002). Toda a família Nereididae apresenta fecundação externa, sendo portanto denominada por monotélica, ou seja, existe apenas um único evento reprodutivo, ocorrendo a morte dos indivíduos após a reprodução (Scaps, 2002; Fidalgo e Costa, 2003). O processo de morte poderá ser explicado pelo processo de autofagocitose das fibras do músculo da parede do corpo, causando um enfraquecimento geral nos indivíduos maduros (Bartels-Hardege & Zeeck 1990). *H. diversicolor* é uma espécie dioica, em que os sexos se encontram separados e é átoca, isto é, ocorre uma estratégia reprodutiva onde há um sincronismo na maturação sexual, e onde se garante a proximidade dos parceiros sexuais aquando da libertação dos gâmetas, não se reproduzindo na coluna de água, mas sim no sedimento (Hickman *et al.*, 2006). Todavia, o poliqueta *H. diversicolor* carece de órgãos sexuais ou gónadas bem definidas. Tanto o macho como as fêmeas possuem as suas células germinativas no interior do celoma, a partir de um epitélio germinativo que se localiza na parte ventral do celoma (Dales, 1950; Marty & Retière, 1999; Scaps 2002; Fidalgo e Costa, 2003).

Durante o processo de maturação sexual existe uma diferenciação em termos da coloração do corpo dos animais. Antes da maturação, os poliquetas exibem uma coloração avermelhada, enquanto os indivíduos maduros assumem a cor verde brilhante e verde mais escurecido, nos machos e nas fêmeas, respetivamente (Scaps,

Introdução

2002). O método mais frequentemente utilizado para análise da maturação dos oócitos consiste na avaliação do diâmetro médio, após ter sido retirada uma amostra do líquido presente no celoma (Fidalgo e Costa, 2003). Os oócitos poderão ser considerados maduros após possuírem um tamanho entre 150 μm e os 275 μm . Este processo de maturação e desova, ou mesmo todo o processo de reprodução, é induzido pelo aumento da temperatura e por alterações do fotoperíodo (Olive *et al.*, 1997; Olive *et al.*, 1999; Abrantes *et al.*, 1999; Fidalgo e Costa *et al.*, 2000). A maturação é despoletada por temperaturas superiores a 6°C (Scaps, 2002). Contudo convém ser referido que a época de postura de *H. diversicolor* descrita na bibliografia possui uma grande variação, tanto como as diferentes condições ambientais descritas dos diferentes locais experienciados. A grande gama de temperaturas onde este organismo pode ser encontrado é presumivelmente a principal causa das diversas descrições em termos das diferentes épocas de reprodução (García-Arberas & Rallo, 2002; Scaps, 2002). O evento reprodutivo de *H. diversicolor* foi descrito por Bartels-Hardege & Zeeck (1990), onde os autores referem que as fêmeas libertam os seus ovos de forma espontânea dentro das galerias através de movimentos corporais. Por sua vez os indivíduos machos maduros aproximam-se da galeria em busca da fêmea. Assim ocorre o encontro, o macho liberta o esperma diretamente na proximidade da galeria sem que haja qualquer tipo de contacto entre os indivíduos maduros. Findo este processo, as fêmeas começam a realizar um processo de ventilação intenso que faz com que o esperma se desloque para o interior da galeria, este fenómeno é possível pois a fêmea utiliza o seu proboscis como auxílio. Os ovos fertilizados permanecem na galeria protegidos pela fêmea. Os ovos possuem um tamanho considerável, com um diâmetro superior ou igual a 200 μm , e eclodem em fase trocófora (Scaps, 2002). As larvas são bentónicas e têm um rápido desenvolvimento. Estas são lecitotróficas (possuem reservas alimentares), mas logo passam a alimentarem-se do muco e do filme microbiano presente nas galerias. Após 10 a 14 dias atingem os 7 a 8 segmentos corporais e começam a abandonar a galeria. Nos dias seguintes ocorre a morte das fêmeas reprodutoras (Bartels-Hardege & Zeeck, 1990; Marty & Retière, 1999; Scaps, 2002).

1.2.3. Distribuição e habitat

A família Nereididae é uma das mais diversas e abundantes de poliquetas com aproximadamente 425 espécies que ocorrem numa variedade de ambientes marinhos e dulçaquícolas (Breton *et al.*, 2003)

O poliqueta *H. diversicolor* (O. F. Müller, 1776) tem uma distribuição alargada, distribuindo-se por estuários e lagoas, desde o Norte de África, Norte da Europa e costa Atlântica americana. Esta ampla distribuição é possível graças à elevada tolerância fisiológica do animal a variações ambientais, podendo crescer e reproduzir-se em diferentes tipo de sedimentos, tolera uma alargada gama de variações bruscas de temperatura, salinidade, sendo por isso considerada uma espécie eurialina, e ainda uma vasta tolerância a condições de hipoxia, podendo salientar-se também a sua diferenciação em termos de hábitos alimentares, como veremos adiante, que provavelmente lhe permite a colonização de diversos habitats, com diferentes fatores ambientais (Scaps, 2002; Breton, *et al.*, 2003; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006). Mais concretamente este anelídeo tem como habitat águas rasas marinhas, águas salobras, em zonas temperadas, nas áreas geográficas referidas anteriormente, desempenhando um papel de extrema importância ecológica. Contudo devido à confusão ainda instalada sobre os organismos pertencentes a este grupo taxonómico, *H. diversicolor* foi descrita primeiramente como sendo uma espécie cosmopolita (Scaps, 2002; Eklöf, 2010). O autor Scaps (2002) refere ainda que até à data, parece que a gama total de organismos desta espécie se restringe apenas a ambientes marinhos rasos e águas salobras do Norte da Europa e América. Porém esta espécie de poliqueta possui uma enorme distribuição por toda a Europa, estendendo-se desde o Norte Europeu e mar Báltico, até Marrocos e mares Mediterrâneo, Negro e Cáspio. Pela sua grande capacidade de tolerar diferenças bruscas tanto de temperatura como de salinidade, permitido assim colonizar e habitar as diferentes áreas citadas anteriormente. A sua densidade populacional varia desde 35 a 3700 indivíduos/m², tanto em áreas costeiras como estuarinas (Amiard-Triquet *et al.*, 2008). Em termos mais específicos do seu habitat, *Hediste diversicolor* habita em zonas lodosas, arenosas, mas também é possível ser encontrada em áreas de cascalho e de argilas, onde constrói galerias em forma de U ou de Y. A profundidade de cada galeria aumenta com o tamanho corporal dos indivíduos, bem como com a temperatura do mar, mas usualmente a profundidade da galeria ronda os 15 centímetros. Há que referir que toda a atividade exercida pelo poliqueta dentro da sua galeria é denominada de bioturbação, sendo um fenómeno que desempenha um papel

Introdução

importante no funcionamento dos ecossistemas marinhos e límnicos (Marty & Retière, 1999; Duport *et al.*, 2006; Hedman *et al.*, 2011) e que consiste na própria construção das galerias, irrigação das mesmas, mistura de sedimentos e produção de *pellets* fecais que influenciam a distribuição e o encaminhamento da matéria orgânica no sistema água-sedimento do local, ou seja, é como se ocorresse uma reformulação/renovação do sedimento (Banta *et al.*, 1999; Duport *et al.*, 2006; Cuny *et al.*, 2007).

1.2.4. Alimentação

Em termos dos hábitos alimentares descritos na bibliografia para *H. diversicolor*, estes são de ordem variada, desde herbívoros até omnívoros. Os alimentos ingeridos vão desde micro e macrozoobentos, diatomáceas, matéria orgânica fragmentada e/ou detritos (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006). Assim esta espécie possui interessantes hábitos alimentares, alternando os em função da disponibilidade de alimento, isto é, pode ser detritívoro, carnívoro (Scaps, 2002; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006), herbívoro (Paramore & Hughs, 2004), e mesmo alimentar-se de bactérias através de atividades bacteriolíticas (Riisgard, 1991; Scaps, 2002; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006), sendo realizados através de alguns métodos de captação de alimento. Esses são enunciados por Fidalgo e Costa *et al.*, (2006), que refere algumas dessas estratégias: *deposit feeding*, em que os organismos recolhem/capturam o alimento na superfície do sedimento e em redor das galerias, alimentação por suspensão, ou por filtração, que consiste num processo em que o poliqueta produz uma teia de muco dentro da galeria e através de movimentos dorso ventrais, gera uma corrente contínua que permite a captura de fitoplâncton, sendo este ingerido posteriormente. Esta última estratégia é adotada quando existe uma grande concentração de fitoplâncton na coluna de água e corresponde ao mecanismo mais usual por parte de *H. diversicolor* (Riisgard, 1991). Todos estes processos são confirmados e relatados também por Riisgard *et al.*, (1995); Fidalgo e Costa (2002) e por Kristensen *et al.*, (2003). De referir que os mecanismos anteriores não são dissociados dos hábitos alimentares, funcionando em conjunto com os mesmos. Recentemente Rossi *et al.*, (2008) descreveu que, organismos que atuam através de mecanismos de alimentação por suspensão podem ter importantes consequências para as funções do ecossistema, pois estes organismos aceleram a biodeposição e a remoção do carbono orgânico presente na coluna de água, influenciando as trocas de carbono e nutrientes na interface sedimento-água. Tais processos foram também descritos por Hedman *et al.*, (2011), que constataram, após comparação de duas espécies de poliquetas, *Marenzelleria neglecta* e *H. diversicolor*, que a última possui uma maior eficiência ao nível da bioturbação.

1.3. Ecologia

Estuários e baías rasas estão entre os ecossistemas costeiros mais afetados negativamente pelas atividades antropogénicas, poluentes orgânicos e inorgânicos e pelas mudanças ao nível dos habitats (Omena *et al.*, 2012), salientando ainda que as atividades humanas estão na causa, direta ou indireta, da depleção e alteração das comunidades biológicas marinhas (Fidalgo e Costa *et al.*, 2002; Costa e Silva *et al.*, 2008). Posto isto, a espécie tratada nesta dissertação, *H. diversicolor*, desempenha um enorme papel no que respeita à “saúdável” manutenção dos ecossistemas, por variadas características e processos. Dois deles e talvez os mais importantes são os processos de bioirrigação e bioturbação. Atuam a nível direto no ecossistema, mais propriamente junto do sedimento, sendo crucial a sua gestão (Moreira *et al.*, 2006; Nogaro *et al.*, 2008). Assim, este organismo possibilita uma série de processos como, uma desnitrificação do sedimento (Gilbert *et al.*, 2003) a criação de um relevante fluxo ente nutrientes e oxigénio, uma dinâmica microbiana (Kristensen *et al.*, 2003; Duport *et al.*, 2006; Aberson *et al.*, 2011), uma acumulação de metais tóxicos (Cardoso *et al.* 2009; Tairova *et al.*, 2009), acumulação de hidrocarbonetos em zonas costeiras contaminadas (Cuny *et al.*, 2007; Malmquist *et al.*, 2013) e por último mas não menos crucial é a sua utilização como bioindicador (Catalano *et al.*, 2012).

Outra questão necessária de salientar prende-se com o facto inerente à exploração direta dos recursos estuarinos, onde *H. diversicolor* está implicado. Pois, quer ao nível do impacto da sua captura, quer ao nível do pisoteio e revolvimento de grandes extensões de sedimento intertidal, existe uma influencia negativa de forma significativa, tanto nos ciclos biogeoquímicos, como nas comunidades biológicas locais (Gambi *et al.*, 1994; Olive, 1999, Fidalgo e Costa 2002; Pires *et al.*, 2012), criando-se desta forma um encadeamento negativo em toda a flora e fauna dos estuários, que são cruciais no ciclo de vida de muitos peixes, aves, invertebrados, entre outros (Amiard-Triquet *et al.*, 2008; Mouneyrac *et al.*, 2009) e mais concretamente, os macroinvertebrados, que são um ponto-chave em termos de alimento para uma diversidade de animais estuarinos que agem como predadores, e como *H. diversicolor* exhibe um perfil nutricional elevado comparativamente a outros macroinvertebrados, é uma das presas com maior importância nos estuários Europeus (Rosa *et al.*, 2008).

Introdução

Todavia, em Portugal, como referido por Fidalgo e Costa na sua tese de doutoramento (2002) e por Fidalgo e Costa *et al* (2006), não existe uma legislação definida e clara, no que concerne à espécie *H. diversicolor*, sendo que o volume total real das capturas desta e de outras espécies de poliquetas é quase impossível de ser calculado, pois as leis e normas são muito difusas. E apesar destas leis já terem sido formuladas há algum tempo, a captura destes invertebrados parece ser continuamente e indiscriminadamente efetuada, sem que nada seja feito mesmo com a legislação Portaria nº 1228/2010 que refere que os mariscadores apenas podem efetuar a sua atividade laboral mediante a obtenção de licenças. Carvalho *et al.*, (2013) refere que a apanha em Portugal é realizada de Norte a Sul do país, contribuindo para a economia local das regiões. Assim, urge ser criado um método mais eficaz que permita o controlo e reformulação das capturas de organismos estuarinos para que futuramente não suceda a extinção destas espécies de organismos, pois com sugere Shokri *et al.*, (2009), a análise da estrutura ecológica dos invertebrados pode providenciar uma ferramenta de apoio à gestão e conservação de habitats marinhos.

1.4. Aquacultura, comércio e indústria de poliquetas

A recolha de poliquetas tem vindo a aumentar desde que foi constatado que poderiam proporcionar um equilíbrio nutricionalmente correto em termos de ácidos gordos polinsaturados, que são essenciais para a maturação em diferentes espécies utilizadas em aquacultura (Meunpol *et al.*, 2005; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006), e a sua utilização como isco para a pesca desportiva também apresenta elevado valor (Olive *et al.*, 1999). A sua utilização em aquacultura não passa apenas pelo simples cultivo, mas hoje em dia, a utilização de *H. diversicolor* passa também como um excelente efetivo no auxílio e controlo da aquacultura moderna, como por exemplo, nos cultivos multi-tróficos (Bischoff *et al.*, 2009). Vijayan *et al.*, (2005) salienta que na Índia, quase todas as maternidades de crustáceos peneídeos utilizam os poliquetas para promover a maturação e conseqüente desova dos reprodutores capturados em meio selvagem de *Penaeus monodon*. Além disso, estes organismos são considerados como os mais proeminentes zoobentos em sistemas de cultivo de camarão e foram reconhecidos como importantes presas de várias espécies de crustáceos peneídeos, sendo considerados as melhores dietas com vista à maturação de organismos cultivados (Meunpol *et al.*, 2005). Inclusive já na década de 90, Bray & Lawrence (1992), referiam que os poliquetas são um componente indispensável na maturação de reprodutores de

Introdução

camarões em aquacultura, devido ao seu enorme valor nutritivo. Como referido anteriormente, a importância da comercialização de poliquetas aumentou exponencialmente com a descoberta do seu potencial como alimento para a aquacultura e o seu cultivo iniciou-se na década de 1980 em Inglaterra. A nível Europeu, o cultivo efetua-se na Holanda e no Reino Unido. O êxito desta ligação entre a investigação universitária e o setor privado foi garantido, tendo sido produzidas 15 toneladas em 1992/93 (Olive, 1994; Fidalgo e Costa, 2006). Por sua vez, em países como Espanha, França, Itália e Portugal encontram-se à venda poliquetas oriundos do sudeste asiático através de importações maioritariamente da China e EUA (Batista *et al.*, 2006). Em termos monetários, o autor Haska *et al.*, (2012) refer que o estado do Maine é atualmente um dos maiores exportadores mundiais de poliquetas para isco de pesca, tendo esta indústria sido avaliada em 7,3 milhões dólares/ano. Já no final da década de 90, Olive, 1999, refere que na Europa, é estimado que este mercado renda um total de 200 milhões ECU (*European currency unit*). Atualmente a empresa líder de cultivo de poliquetas (*Nereis virens*), como relata Nesto *et al.*, (2012) é a *Topsy Baits* com uma produção anual de 125 toneladas. Com esta informação é necessário salientar o impacto negativo que tais importações poderão acarretar, porque a introdução de espécies exóticas está a ameaçar o bem-estar ecológico e económico dos ecossistemas costeiros marinhos, podendo levar ao desaparecimento das espécies autóctones. (Fidalgo e Costa *et al.*, 2006; Haska *et al.* 2012).

Há que referir a interessante utilização de *H. diversicolor* como alimento em aquaculturas, pois de facto é necessária a criação de um novo alimento neste tipo de cultivos, porque atualmente a exigência de alimento é enorme. Outra questão tem a ver com a depleção destes organismos no seu ambiente natural, e onde o aparecimento de sistemas intensivos de cultivo destes animais poderia aliviar os efeitos nefastos da sua captura insustentável, reduzindo também a necessidade de importação (Olive, 1999). E a nível global existe um amplo nicho de mercado, e mais concretamente na Europa, o mercado é dominado por apenas uma empresa, e onde a sua produção recai sobre a espécie *Nereis virens*, havendo então todo um mercado a explorar no que diz respeito à espécie *Hediste diversicolor* (Fidalgo e Costa, com. pess.).

1.5. Ácidos gordos em *H. diversicolor*

Presentemente os ácidos gordos representam um fator de avanço e de grande impacto na aquacultura, devido a serem um componente de extrema necessidade na nutrição humana e animal e nas últimas décadas, os lípidos, e em especial os ácidos gordos alcançaram uma grande notoriedade pela sua relevância ao nível da teia trófica (Bischoff *et al.*, 2009). Os peixes, como em todos os invertebrados, não conseguem sintetizar ácidos gordos polinsaturados (PUFA) *de novo* a partir de ácidos gordos saturados e monoinsaturados, fazendo com que os PUFA's sejam um dos importantes compostos essenciais (Monroig *et al.*, 2013).

Os ácidos gordos possuem uma variedade de estruturas, mas em organismos marinhos, geralmente, contêm desde 14 a 24 átomos de carbono, variando no grau de insaturação. Devido a propriedades bioquímicas e a limitações, muitos ácidos gordos presentes na alimentação são incorporados em animais marinhos com pequenas ou nenhuma modificação relativamente à sua estrutura original, fazendo com que estes componentes sejam vantajosos como marcadores biológicos (Budge *et al.*, 2002). Salientam ainda que os ácidos gordos podem ser transpostos da presa para o predador, desde o início, até ao final da teia trófica. Modificações na dieta do animal podem resultar em alterações significativas na concentração de ácidos gordos em menos de 3 semanas (Kirsch *et al.*, 1998). Porém, a concentração em ácidos gordos presentes nos animais marinhos é influenciada por diversos fatores incluindo hábitos alimentares, gametogénese e pela temperatura ambiental. Contudo a dieta é o fator mais determinante na quantidade de ácidos gordos presente (Passos *et al.*, 1995). *H. diversicolor* poderá ser considerado um organismo adequado como fonte destes componentes lipídicos. Portanto, atualmente os poliquetas são uma importante dieta em aquacultura pois desempenham um papel importante na maturação das gónadas e indução de postura, em diferentes espécies cultivadas, como os linguados *Solea vulgaris* e *Solea senegalensis*, e também em alguns camarões, como o *Penaeus kerathurus* (Passos *et al.*, 1995; Fidalgo e Costa *et al.*, 2000; Meunpol *et al.*, 2005; Bischoff *et al.*, 2009). A importância destes invertebrados não se resume apenas ao seu valor nutritivo, mas também devido ao facto de hoje em dia existir uma crescente procura e utilização de farinha e óleo de peixe como alimentos em aquacultura, provocando desta forma uma pressão sobre os *stocks* de peixes no meio selvagem.

2.1. Objetivos gerais

Atualmente a aquacultura de organismos marinhos tem vindo a representar um nicho de mercado bastante alargado, quer em termos de novas espécies que vão surgindo, quer em termos das espécies já utilizadas em cativeiro. Desta forma, com o exponencial incremento da população Humana e com o crescente aumento pela necessidade de alimento surge, paralelamente a estas premissas, um aumento significativo do *know-how* necessário a este tipo cultivo.

Para além de espécies de peixes cultivadas com o objetivo de aumentar a produção de proteína para consumo humano, surgem também outro tipo de espécies, como as de invertebrados. Dentro das espécies de invertebrados poderá estar associada a aquacultura de poliquetas, como *Hediste diversicolor*. Porém este tipo de cultivo necessita ainda de ser otimizado para que a curto prazo esta vertente aquícola seja uma realidade, pois, este tipo de poliqueta poderá representar um elemento fulcral na constituição de dietas para peixes em cultivo, nomeadamente de reprodutores, para uso em ensaios e monitorização ecológica, como isco vivo para pesca comercial e desportiva (Fidalgo e Costa, com. pess.).

Assim sendo, os objetivos gerais deste trabalho compreendem:

- a) Avaliar o efeito de diferentes alimentos administrados durante o crescimento dos juvenis de *H. diversicolor*;
- b) Identificar quais os ácidos gordos e quantidade proteica presentes na sua constituição após terem sido ministrados diferentes alimentos.

2.2. Objetivos específicos

a) Aquacultura - crescimento e engorda

A par da utilização das 3 dietas diferentes, Carapau (*Trachurus trachurus*), Ração de dourada (*Aquagold*) e Ração de linguado (*Moist sole*), pretende-se avaliar nos poliquetas engordados com as referidas dietas:

- 1) O peso final (g) adquirido ao fim dos 60 dias de experimentação;
- 2) A taxa específica de crescimento (%);
- 3) A taxa de incremento diária (g dia^{-1});
- 4) A sobrevivência (%);

b) Análise laboratorial

Esta análise laboratorial compreende três diferentes etapas, de modo a analisar os poliquetas alimentados com as 3 diferentes dietas:

- 1) Extração e quantificação da gordura total dos poliquetas;
- 2) Quantificação dos ácidos gordos presentes nos poliquetas e nas dietas, pelo método de Bligh & Dyer (1959);
- 3) Quantificação proteica dos poliquetas, pelo método descrito por Kjeldhal (1883);

Materiais e Métodos

3.1. Condições e especificidades da reprodução

3.1.1. Preparação do sistema de cultivo

Antes de se proceder à recolha dos reprodutores a utilizar foi necessário preparar todas as condições necessárias à experiência, recolhendo-se o sedimento na Lagoa de Óbidos, Portugal (Fig.2), em período de baixa-mar e com uma granulometria entre os 250 a 500 μm . Após a sua recolha foi previamente esterilizado numa estufa a 90°C durante 24 horas (Batista *et al.*, 2003).



Figura 2. Áreas da lagoa de Óbidos (seta) onde o sedimento e os reprodutores utilizados foram recolhidos. Fonte: *Google Earth*.

Materiais e Métodos

Após o sedimento estar completamente seco foi devidamente crivado. Para tal utilizaram-se dois crivos com malhagens distintas, o primeiro crivo com uma malhagem de 1,18 mm onde ficavam retidas as partículas mais grosseiras como conchas e pedras, e um segundo crivo, com uma malha de 500 μm , colocado por de baixo do primeiro crivo, onde após crivagem se obteve um sedimento mais fino e uniforme com uma granulometria de 250 a 500 μm , apropriada para a reprodução destes organismos (Fidalgo e Costa, com. pess.).

Finda a crivagem, o sedimento foi colocado em duas caixas plásticas com uma capacidade aproximada de 80 litros e com as seguintes dimensões de 35 cm de largura; 35 cm de altura; 50 cm de comprimento, cada uma. O sedimento foi colocado em cada caixa perfazendo uma altura total de 15 cm, para que aquando da colocação da água de cultivo, este não baixasse dos 12 cm, correspondendo a uma altura ideal para este ensaio (Fidalgo e Costa, com. pess.).

Relativamente à água utilizada no cultivo, preparou-se continuamente uma diluição de água salgada (35) com água doce para se obter a salinidade desejada. Relativamente à água salgada adicionou-se 10 ml L⁻¹ de lixívia durante cerca de duas horas (para provocar a morte de quaisquer organismos que pudessem estar presentes e que viessem a alterar as características ótimas do cultivo) e posteriormente neutralizou-se com 10 ml L⁻¹ de tiosulfato de sódio, em todo este processo foi incluído arejamento constante com pedras difusoras. Após esta aplicação a água salgada foi diluída com água doce proveniente da rede pública perfazendo uma salinidade de 15, utilizada no decorrer do ensaio.

Logo que a água foi adicionada ao sedimento nas caixas de cultivo, colocaram-se resistências de aquecimento (Eheim/Jaeger 75 W) de modo a garantir uma temperatura constante de 25°C \pm 1. Colocaram-se também dispositivos de arejamento conectado a uma pedra difusora em cada caixa/aquário de forma a difundir ar atmosférico pela totalidade do volume de água. Assim que se estabeleceram os parâmetros desejados para a experiência, estes foram mantidos e constantemente monitorizados, verificando-se a temperatura com um termómetro de mercúrio e a salinidade com um refratómetro.

3.1.2. Recolha e seleção dos reprodutores

Após o estabelecimento de todos os parâmetros ótimos de cultivo, procedeu-se à recolha dos indivíduos utilizados como reprodutores. Para tal, estes espécimes foram recolhidos no mesmo local que os sedimentos, na lagoa de Óbidos. Recolheram-se 32 indivíduos de *H. diversicolor* previamente selecionados, com o intuito de terem um tamanho e coloração similares. Verificou-se igualmente a existências de lesões ou de outros sinais que poderiam vir a intervir negativamente no sucesso do cultivo. De seguida foram colocados em recipientes plásticos de transporte, cujo sedimento e a água têm a mesma proveniência dos organismos, de modo a diminuir o *stress* induzido pela deslocação até ao local da experimentação. Já no laboratório, analisaram-se novamente os animais capturados e registou-se o peso individual. Dos 32 indivíduos dividiram-se 16 para cada uma das duas caixas. De salientar que foi recolhida também uma amostra de 5 indivíduos para verificação do estado de maturação dos oócitos e verificar a proporção sexual (*sex ratio*) através do processo de picadas a fresco. Após se ter procedido ao acondicionamento dos indivíduos nas duas caixas, estes foram alimentados com ração semi-húmida (*Moist sole* Sparos Lda, Olhão, Portugal) enriquecida com *Ergosan* (imunoestimulante à base de algas *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*) com 0.65 g por cada caixa, de modo a garantir que o alimento administrado fosse suficiente para todos os poliquetas presentes no cultivo.

3.1.3. Alimentação e rotinas dos reprodutores

Os parâmetros salinidade e temperatura foram analisados diariamente e ajustados quando necessário. Foram efetuadas renovações de água em cada uma das caixas, duas vezes por semana, tendo sido retirados 15 litros de água e repostos novamente, com água limpa e previamente esterilizada. Esta esterilização foi efetuada recorrendo-se a hipoclorito de sódio na razão de 10 ml l⁻¹ e seguidamente neutralizado com tiosulfato de sódio, na mesma proporção.

A alimentação foi administrada 3 vezes por semana nas primeiras duas semanas e posteriormente foi administrada diariamente visto que os animais reagiam de forma positiva aquando da colocação do alimento. O parâmetro concentração de amónia também foi monitorizado uma a duas vezes por semana com recurso a *kits* (Sera). O alimento não ingerido era prontamente removido do sedimento com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Este procedimento teve como objetivo evitar a decomposição e a consequente degradação da qualidade da água, o que seria prejudicial ao cultivo, pois levaria ao desenvolvimento de fungos e bactérias.

3.1.4. Alimentação e rotinas após reprodução

Após cerca de um mês de acondicionamento dos reprodutores ocorreu a reprodução. Tal foi perceptível através da observação das muitas galerias formadas no substrato e da análise microscópica de amostras de água do cultivo que continham as larvas. Durante este período a alimentação passou a ser fornecida diariamente e numa quantidade 1 g dia⁻¹ de ração semi-húmida de linguado de modo a garantir que todas as larvas e juvenis tivessem acesso ao alimento, pois a densidade em cada caixa rondava os milhares de indivíduos. Com a observação diária dos indivíduos, era possível constatar o incremento de tamanho dos animais, e determinar qual a melhor altura para se proceder à seleção dos mesmos e dar início ao ensaio de crescimento.

3.2. Condições de cultivo do ensaio de crescimento

3.2.1. Recolha dos juvenis

Para ser efetuada a recolha e posterior seleção, foi necessário retirar toda a água dos tanques de cultivo. Depois recolheram-se pequenas amostras de sedimento que foram colocadas em caixas plásticas brancas, previamente cheias com água de salinidade igual à do cultivo. Esta seleção foi efetuada recorrendo-se a pipetas Pasteur. À medida que se recolhiam os indivíduos, estes eram colocados numa outra caixa plástica de forma a reunir apenas os poliquetas desejados. Com este processo foi possível a execução de uma seleção de organismos com um tamanho semelhante.

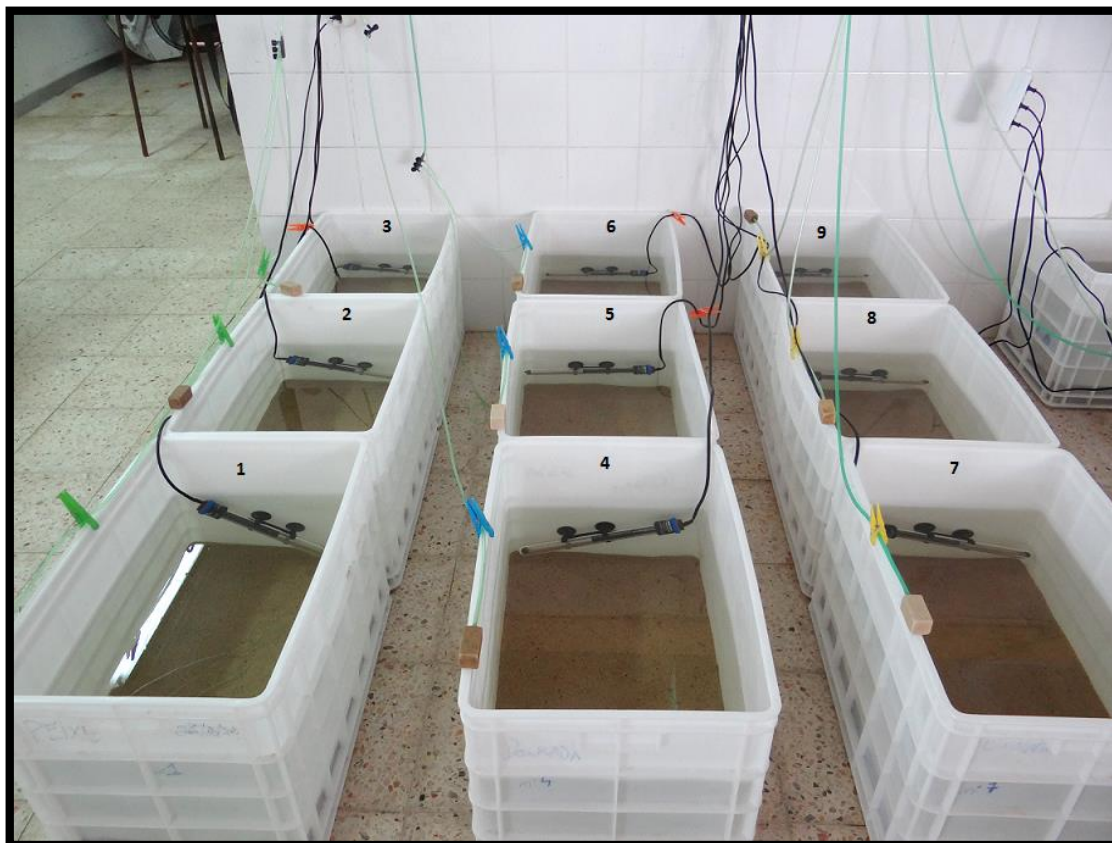


Figura 3. Sistema de cultivo utilizado no ensaio de crescimento: 1, 2 e 3 representam os triplicados relativos à alimentação peixe (*Trachurus trachurus*); 4, 5 e 6 os triplicados relativos à alimentação ração de dourada; 7, 8 e 9 os triplicados relativos à alimentação ração de

3.2.2. Preparação do sistema de cultivo

O sistema de cultivo foi previamente preparado e monitorizado para que após a seleção dos indivíduos, estes fossem imediatamente colocados nas condições desejadas (Fig.3). Foram preparadas nove caixas plásticas iguais às utilizadas anteriormente na fase de reprodução. Em cada caixa foi colocada uma altura de sedimento com cerca de 5 cm, o relatado como sendo o ideal para esta fase do ciclo de vida (Fidalgo e Costa, com. pess.). O sedimento (250-500 μm) foi recolhido na praia do Baleal (39°22'01.03 N; 9°20'21.47 W) em período de baixa-mar, resultando numa areia superficial com uma granulometria adequada para o processo de crescimento, e contendo uma granulometria semelhante à utilizada no processo de reprodução anterior.

Materiais e Métodos

Todo o sedimento foi crivado através de uma malhagem 1 mm para que todas as partículas grosseiras fossem eliminadas. Após concluído o processo de crivagem e análise do sedimento, este foi distribuído pelas 9 caixas plásticas e fez-se uma altura de 5 cm. Posteriormente procedeu-se à respetiva lavagem do substrato e eliminação da matéria orgânica que pudesse estar presente. Esta lavagem foi promovida através da adição de algumas gotas de hipoclorito de sódio diretamente sobre o sedimento e de seguida realizou-se uma lavagem com água doce corrente para eliminar o excesso de cloro (Fidalgo e Costa, com. pess.). As 9 caixas foram cheias com 40 litros de água doce e arejamento constante durante 7 dias, para assim ser garantida a correta lavagem e também a eliminação de organismos que pudessem ainda estar presentes. Desta forma abdicou-se do processo moroso de secagem do substrato na estufa, como o utilizado nos tanques/caixas destinados à reprodução. Para uma melhor segurança dos parâmetros relativos à qualidade da água de cultivo, foram analisadas as concentrações de cloro e de amónia em todos os triplicados com recurso a *kits* (Sera NH₄/NH₃).

Seguidamente os tanques foram preparados para o cultivo, procedendo-se à remoção de toda a água doce presente, e adicionando-se água com uma salinidade ajustada para os 15. Segundo Nielsen *et al* (1995) e Fidalgo e Costa *et al* (2000) esta salinidade foi a que possibilitou um maior crescimento desta espécie em condições controladas. De referir que toda a água salgada utilizada no cultivo foi previamente tratada, antes de ser empregue, e que as águas, tanto a doce como a salgada, são aquecidas por meio de resistências ou aquecedores (Eheim/Jaeger 75 W) à temperatura de 20°C ± 1.

Após análise de todos os parâmetros de qualidade da água, sedimento e de arejamento constante, procedeu-se então à seleção dos poliquetas a serem utilizados no ensaio de crescimento.

3.2.3. Seleção e aclimação dos juvenis

À medida que a recolha e seleção eram efetuadas foram organizados grupos de 10 indivíduos (Fig.4) que posteriormente eram colocados em caixas de Petri e se observaram à lupa estereoscópica. Este procedimento visava uma verificação final do seu estado anatómico, garantindo desta forma que os animais selecionados estavam em boas condições, não apresentando falhas ou lesões do seu corpo, possibilitando uma garantia em termos de integridade física nos triplicados. Posteriormente os indivíduos foram pesados, em grupos de 10 indivíduos cada, numa balança analítica (Sartorius TE1245), sendo o seu peso registado. Depois, cada grupo foi colocado no tanque/caixa de cultivo correspondente. Este processo foi realizado até que em cada um dos triplicados estivessem 30 indivíduos, perfazendo 270 poliquetas no total, obtendo-se assim uma densidade de 150 indivíduos/m² em cada caixa.

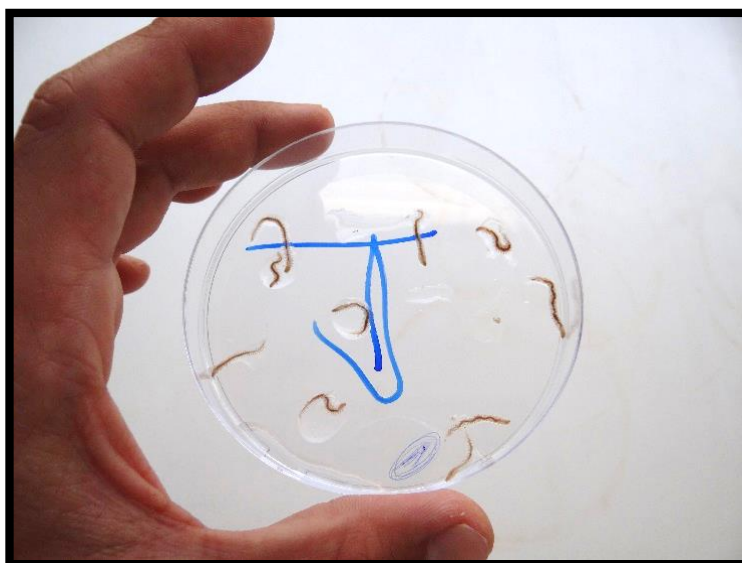


Figura 4. Grupo de Indivíduos (*H. diversicolor*) juvenis selecionados para o início do ensaio de crescimento

3.2.4. Alimentação e Rotinas

Os poliquetas só foram alimentados passadas 24 horas da sua colocação nos tanques. Este ensaio de crescimento foi efetuado com recurso a 3 dietas diferentes. A dieta peixe (*Trachurus trachurus*, carapau proveniente da costa Portuguesa), que após a aquisição dos exemplares, estes foram filetados, congelados e mantidos a -4°C até à sua administração. Ração semi-húmida com *Ergosan (Moist sole Sparos Lda, Olhão, Portugal)*, e ração extrudida (*Aquagold, Sorgal SA, Ovar, Portugal*), destinada a linguados e douradas de cultivo, respetivamente. O processamento do alimento foi feito com recurso a um almofariz, onde cada dieta foi devidamente pesada e macerada, garantindo desta forma um tamanho adequado para os poliquetas. Todo alimento utilizado foi devidamente preservado no frio para manter a sua qualidade nutricional e não haver uma possível degradação do mesmo, estando as rações comerciais preservadas a 8°C .

Na primeira semana de cultivo, a percentagem de alimento foi 30 % da biomassa inicial, por forma a garantir que todos os animais tinham acesso ao alimento. Posteriormente procedeu-se à diminuição da percentagem para 20 %, correspondente ao peso inicial, após ter-se verificado algum alimento acumulado na superfície do substrato. Na terceira semana voltou se a ajustar a percentagem de alimento para os 30 %.

De referenciar que todas as semanas a água de cultivo foi renovada retirando-se 20 litros de água de cultivo, na primeira semana, e nas semanas seguintes 10 litros por caixa, repondo-se sempre com água previamente aquecida à mesma temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 1$) e devidamente ajustada à salinidade (15). A temperatura e a salinidade foram monitorizadas diariamente em cada uma das caixas cultivo, sendo esta última ajustada quando necessário. Semanalmente, foram efetuadas análises aleatórias a 3 caixas de cultivo, verificando-se novamente a concentração de amónia e cloro da água. De igual forma, verificou-se também que algum do alimento administrado permanecia sem ser capturado, originando na superfície do substrato, alguma acumulação de fungos. Estes fungos foram imediatamente removidos com pipetas Pasteur como em procedimentos anteriormente referidos.

3.2.5. Recolha e análise dos indivíduos adultos

Findos os 60 dias da experimentação, e após ter sido verificado que os poliquetas já possuíam um tamanho considerável e que o suposto tamanho comercial foi atingido, procedeu-se à recolha dos mesmos. Para tal foi providenciado um local adjacente ao laboratório de aquacultura onde foi colocado uma superfície plástica, para que se pudesse colocar todo o sedimento das 9 caixas e se realizar a recolha dos animais sem que houvesse perdas ou danos a nível anatómico (Fig. 5). Os poliquetas foram recolhidos e pesados em grupos de dez indivíduos (Sartorius TE1245).

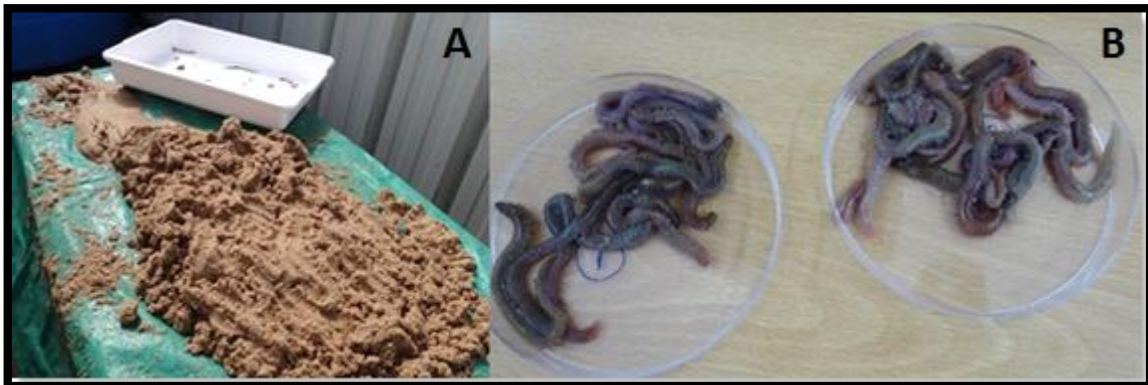


Figura 5. Recolha dos poliquetas engordados (A); poliquetas alimentados com ração de dourada ao final dos 60 dias de ensaio (B).

Após a recolha dos dados do ensaio de crescimento, foram analisados os seguintes parâmetros:

- 1) Registo dos pesos finais (g);
- 2) Taxa específica de crescimento (%);

$$\mu = \frac{\ln(P_t - P_0)}{t - 1}$$

Onde: (P_0 e P_t) representam a biomassa média (g) no dia 0 e no dia t , respetivamente, dividido pelo total de dias do ensaio (60 dias).

- 3) Taxa de incremento diária (g dia⁻¹);

$$Tx. \text{ inc. diária} = \frac{(Pf - Pi)}{60}$$

Onde: (Pf) representa o peso médio final (g) e (Pi) o peso médio inicial (g), dividido pelo número de dias do ensaio (60 dias).

- 4) Sobrevivência (%);
- 5) Quantificação da gordura total e ácidos gordos pelo método modificado de Bligh & Dyer (1959);
- 6) Quantificação da proteína bruta pelo método de Kjeldahl (1883);

3.3. Ácidos gordos

3.3.1. Extração da gordura total pelo método modificado de Bligh & Dyer (1959)

Para se efetuar a extração da gordura selecionaram-se indivíduos aleatoriamente de cada tratamento e procedeu-se à elaboração das amostras, compostas por 5 gramas por cada triplicado, através de cortes de regiões corporais dos poliquetas, registando-se o peso de cada amostra.

Posteriormente as amostras foram homogeneizadas com uma ponta de micropipeta para que desta forma se provocasse a rotura celular do conteúdo da amostra. O homogeneizado foi dissolvido em 30 ml de metanol: clorofórmio (2:1 v/v). Esta mistura foi depois submetida ao vortex durante 5 minutos. Depois foi adicionado 4 ml de solução saturada de NaCl, 10 ml de água ultrapura e 10 ml de clorofórmio, e a solução foi novamente agitada no vortex durante 5 minutos. Seguidamente repetiu-se o procedimento anterior por mais 5 minutos, por forma a garantir uma correta homogeneização da amostra. Findo o processo de uniformização da amostra, esta foi centrifugada a 5000*g durante 10 minutos (Eppendorf 5804r). Concluída a centrifugação, houve a formação de duas fases distintas. Recolheu-se apenas a camada orgânica inferior e colocou-se imediatamente numa coluna de sulfato de sódio anidro, preparada com antecedência, por forma a filtrar apenas a fração orgânica desejada, e retendo a restante fração aquosa possivelmente presente na amostra.

O filtrado foi recolhido e colocado em tubos periformes, previamente pesados, e o solvente foi então evaporado recorrendo-se ao rotavapor (Laborota-4000, Heidolph) a uma temperatura de 40°C, até restar apenas a parte referente à gordura. De seguida, pesou-se o produto final.

$$\text{Teor de gordura (\%)} = \frac{(M_f - M_i)}{P_a} \times 100$$

Onde: (M_f) representa a massa final (g), (M_i) a massa inicial (g) e P_a é o peso da amostra (g)

3.3.2. Metilação ácida dos ácidos gordos

Para cada amostra, cerca de 0,15 g da gordura extraída foi colocada em tubos de vidro de 15 ml e adicionou-se 5 ml de reagente de metilação (Metanol/Cloreto de Acetilo; 20:1, v/v) a cada tubo. Os tubos foram roscados e colocados em banho-maria durante uma hora a 80°C. Os tubos foram então retirados do banho e deixados a arrefecer até temperatura ambiente. A cada tubo adicionou-se 1 ml de água miliQ e 2 ml de n-heptano e levou-se a agitar (“vortex”) durante 1 minuto. Centrifugou-se durante 5 minutos a 1500*g. Finalmente recolheu-se a fase orgânica (superior), contendo os ácidos gordos metilados para “vials” de GC de 2 ml.

3.3.3. Análise no cromatógrafo gasoso (GC)

Os triacilglicerídeos totais (TAG) analisaram-se através de um cromatógrafo gasoso Finnigan TRACE GC Ultra (Thermo Electron Corporation), provido de uma pré-coluna, TR-FAME (30mx0,25mm IDx0,25m), um auto sampler AS 3000 Thermo Electron Corporation e um detetor de chama de ionização (FID). A temperatura do injetor, em modo splitless, e o detetor foram programadas para 250°C e 260°C, respetivamente. O gás de arraste utilizado foi Hélio, com um caudal de 1,5 ml min⁻¹. Ar e hidrogénio foram fornecidos ao detetor, com um caudal de 350 ml min⁻¹ e 35 ml min⁻¹, respetivamente. O forno foi programado para estar a 60°C durante 1 minuto, aumentando para 150°C a 15°C.min⁻¹, e permaneceram em patamar durante um minuto e voltou a aumentar, até 180°C, a 5°C.min⁻¹. Houve um novo patamar de 3 minutos e um novo incremento de temperatura até aos 220°C, a 10°C.min⁻¹ e um patamar final aos 220°C durante 1 minuto.

3.4. Análise proteica do teor de proteína bruta

Foi utilizado o método titulométrico descrito por Kjeldahl (1883). Neste procedimento são utilizados: um digestor, tubos de digestão e respetivo suporte e um sistema de exaustão de fumos com aspiração por trompa de água. Esta análise pressupõe duas etapas fulcrais necessárias para a extração proteica, são: a digestão e a destilação das amostras.

Para a quantificação de azoto utilizaram-se duas pastilhas do catalisador Kjeltabs (Panreac) em cada tubo Kjeldahl (Foss), a pesagem (Mettler Toledo, d=0,1 mg) aproximadamente 1 grama de amostra para um filtro de papel (Whatman n.º 1). Em cada tubo adicionou-se 20 ml de ácido sulfúrico (Panreac, 96 % PA-ISO) e iniciou-se assim a digestão no Digestor de Proteína (Foss – Digestor 2006) por um tempo máximo de 120 minutos com uma rampa de temperatura inicial de 200°C e final de 400°C. Finalizada esta etapa adicionaram-se 80 ml de água destilada a cada tubo. Para a destilação adicionaram-se 30 ml de ácido bórico a 4 % num Erlenmeyer. Após adição dos reagentes procedeu-se à colocação do preparado anterior na unidade de destilação com a introdução do respetivo tubo de Kjeldahl no capilar plástico adjacente, e realizando-se a destilação por um período de 6 minutos (tempo definido como padrão). Finalizada a destilação recorreu-se depois à titulação do conteúdo presente no Erlenmeyer com ácido clorídrico a 0,1 M. No final de cada titulação registou-se o volume final para cada uma das amostras.

$$Proteína (\%) = \frac{[(Va - Vb) \times NHCl \times 6.25 \times 0.014]}{m} \times 100$$

Onde (Va) representa o volume da amostra (ml), (Vb) o volume final (ml) e (m) a massa da amostra (g).

3.5. Análise estatística

Na primeira parte do trabalho, com o objetivo de avaliar o efeito das dietas administradas (peixe *Trachurus trachurus*, ração para dourada e ração para linguado) no peso final (g), e na segunda parte, com o intuito de averiguar eventuais diferenças estatisticamente significativas entre o teor em ácidos gordos dos poliquetas engordados, todas as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 5 % (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0.05$). Todos os cálculos foram realizados por via do *software* IBM SPSS *Statistics* 20, taxa de incremento diário e sobrevivência dos indivíduos em cultivo, realizou-se uma Análise de Variância (ANOVA), com um fator (Zar, 2009). Por conseguinte, todos os requisitos inerentes à realização do método (nomeadamente, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias) foram devidamente validados. Sempre que estes não foram cumpridos, procedeu-se à execução do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 2009). Sempre que adequado, isto é, sempre que foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, realizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD (Zar, 2009), permitindo assim identificar onde existiam as ditas diferenças.

Resultados

Resultados

4.1. Ensaio de crescimento

Primeiramente há que referir a aceitação positiva de todas as dietas utilizadas no cultivo, sendo que sempre que eram ministradas havia de imediato uma reação por parte de quase todos os organismos, e de salientar a aceitação da dieta peixe como demonstrado na figura 6 e após análise por observação direta diária durante o procedimento experimental. De salientar ainda que ficou provado que *H. diversicolor* pode alimentar-se, sobreviver e crescer com apenas uma única fonte de alimento, como foi o caso de cada dieta aplicada individualmente em cada tratamento durante os 60 dias de crescimento.

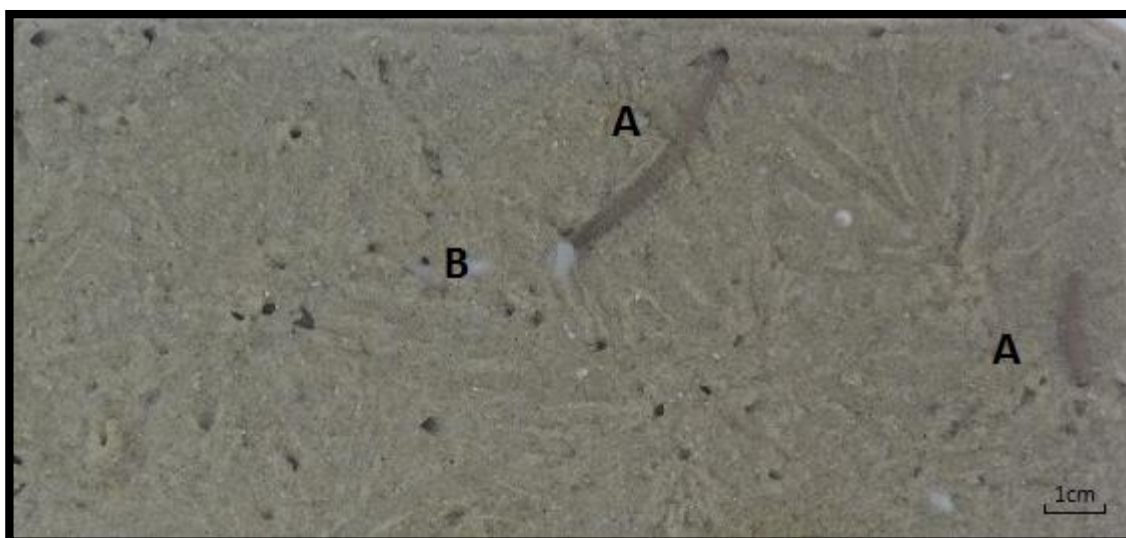


Figura 6. Resposta positiva de *H. diversicolor* (A) aquando alimentado com a dieta peixe (B)

Os pesos iniciais dos indivíduos alimentados com as diferentes dietas variaram cerca de $0.16 \text{ g} \pm 0.02$ no tratamento ração de linguado e aproximadamente $0.18 \text{ g} \pm 0.03$ no tratamento ração de dourada e novamente $0.18 \text{ g} \pm 0.04$ no tratamento com a dieta peixe. No que respeita aos pesos iniciais não apresentaram desta forma diferenças estatisticamente significativas, contudo a escolha dos indivíduos a serem colocados inicialmente tornou-se difícil, visto haver uma enorme discrepância de pesos da coorte. Assim, primeiramente tentou-se organizar o ensaio para que o peso inicial entre os indivíduos, dos diferentes tratamentos, fosse similar mas como evidencia o desvio

Resultados

padrão da Figura 7, esse objetivo veio a tornar-se difícil pois à medida que a seleção era efetuada a gama de pesos era cada vez menor.

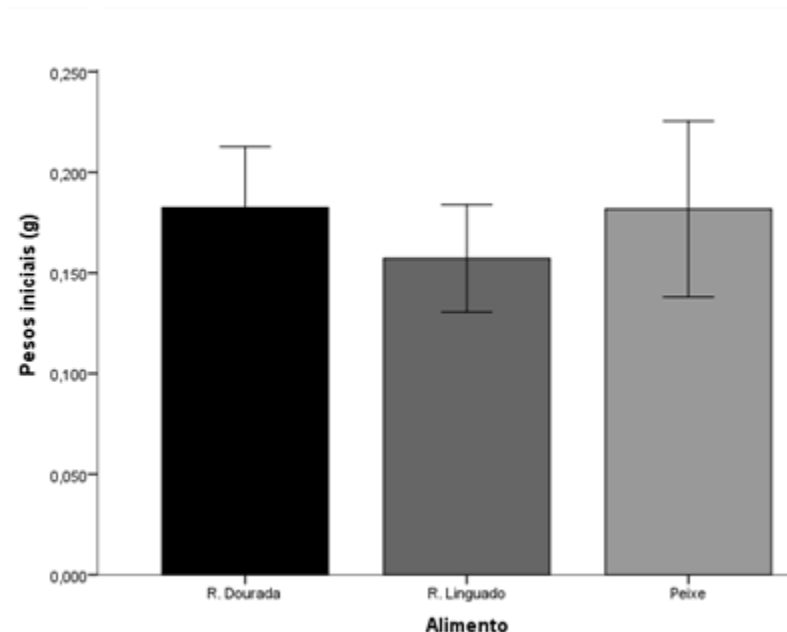


Figura 7. Pesos iniciais utilizados nos três tratamentos (ração para dourada, ração para linguado, peixe filetado). Peso inicial (g) de cada 10 juvenis no início do ensaio de crescimento. Os resultados referem-se à média de três ensaios independentes realizados em triplicado e são expressos sob a forma de médio \pm desvio-padrão (SD)

Relativamente aos pesos finais dos juvenis engordados ao fim dos 60 dias de experimentação, os resultados evidenciam diferenças estatisticamente significativas (p -value <0.05) quando comparadas as três dietas. De notar que a dieta que teve maior influência no ganho de peso (g) foi a dieta ração para dourada (*Aquagold*), e por sua vez a dieta que proporcionou o menor ganho de peso final (g) foi a dieta peixe (*Trachurus trachurus*) (Fig. 8), obtendo-se respetivamente os valores médios de 8,92 g \pm 1 e 5.25 g \pm 0.26.

Resultados

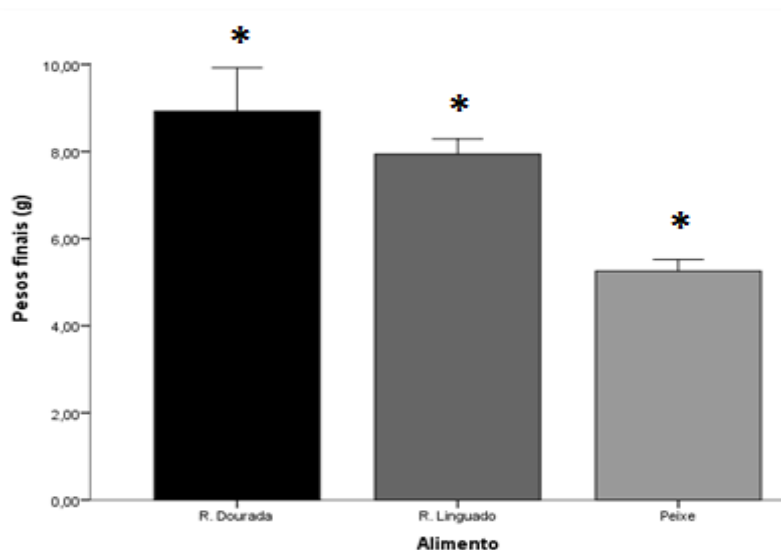


Figura 8. Efeito da dieta (ração de dourada, ração de linguado e peixe) no peso final médio (g) de cada 10 juvenis ao fim de 60 dias. Os resultados referem-se à média de três ensaios independentes realizados em triplicado e são expressos sob a forma de médio \pm desvio-padrão (SD); (*) p-value<0,05 (Tukey HSD)

Por sua vez, com a administração da dieta ração de linguado (*Moist sole*) o peso final médio, por cada 10 indivíduos, obtido foi de 7.94 g \pm 0.34. De referir que aquando da recolha dos indivíduos engordados foi possível observar e retirar um casulo intacto de umas das galerias, composto por muco, com um poliqueta no seu interior, evidenciando o estado saudável do cultivo (Fig. 9). Verificou-se igualmente que já existiam poliquetas, em todos os tratamentos, com uma coloração esverdeada, evidenciando que já estariam numa fase de maturação avançada (Fig. 10).

Resultados



Figura 9. Muco que reveste internamente a galeria com poliqueta (*H. diversicolor*) no seu interior. Recolhido após término dos 60 dias de ensaio de crescimento



Figura 10. Poliqueta *H. diversicolor* recolhido no final do primeiro ensaio, evidenciando o seu estado de maturação sexual através da coloração esverdeada

Resultados

Seguidamente, a taxa específica de crescimento (%) obtida no final da experiência foi de 5.65 %, 6.50 % e de 6.57 % respetivamente para os poliquetas alimentados com peixe (*Trachurus trachurus*), ração de dourada (*Aquagold*) e ração de linguado (*Moist sole*), existindo diferenças estatisticamente significativas entre estas ($p\text{-value}<0.05$), pelo que através do teste de comparações múltiplas (teste de *Tukey*) se veio a verificar que o alimento peixe provoca as diferenças observadas na taxa específica de crescimento (Fig. 11).

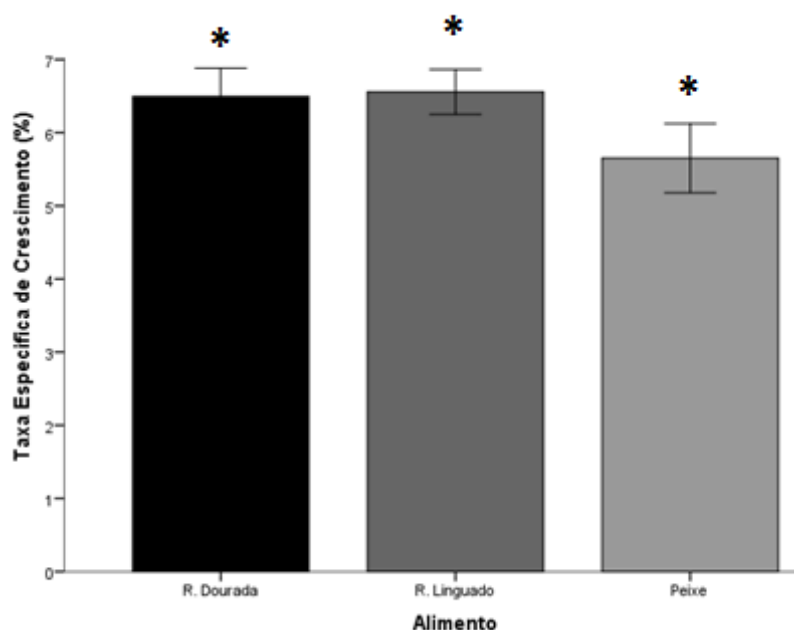


Figura 11 – Efeito das dietas (ração para dourada, ração para linguado e peixe) na taxa específica de crescimento (%) de cada 10 juvenis; Os resultados obtidos traduzem uma média de três ensaios independentes realizados em triplicados, e as barras representam o peso médio de 10 juvenis e as linhas verticais a média \pm (SD); (*) $p\text{-value}<0.05$ (Tukey HSD)

A taxa de incremento diária (g dia^{-1}) evidenciou diferenças entre as três dietas, (Fig.12). Os valores médios obtidos no tratamento ração de dourada foram os mais elevados, registando-se um incremento na ordem dos 0.146 g dia^{-1} , sendo que no tratamento ração de linguado a taxa obtida foi muito similar à anterior dieta, havendo um incremento de 0.129 g dia^{-1} . Finalmente o menor valor observado foi o de 0.085 g dia^{-1} no ensaio alimentado com peixe, existindo diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tratamentos ($p\text{-value}<0.05$).

Resultados

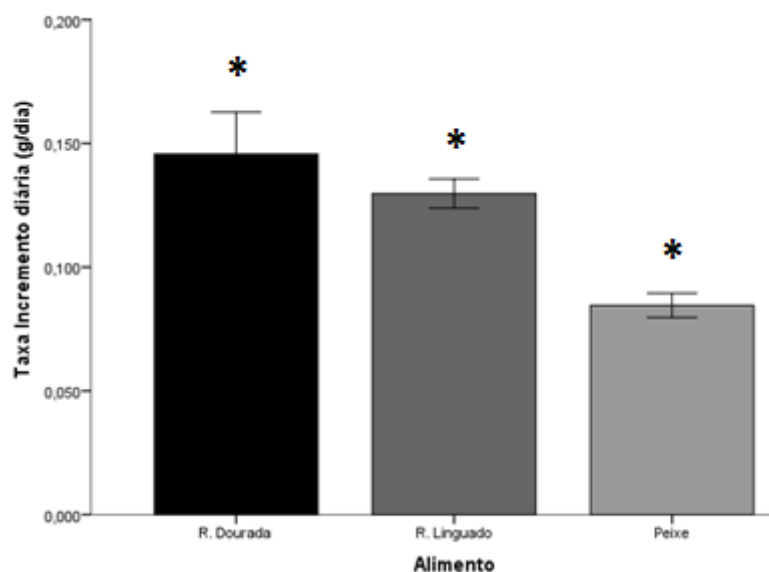


Figura 12. Efeito das dietas ração de dourada, ração de linguado e peixe na taxa de incremento diária (g dia^{-1}) de cada 10 juvenis; Os resultados obtidos traduzem uma média de três ensaios independentes realizados em triplicados, e as barras representam o peso médio de 10 juvenis e as linhas verticais a média \pm (SD);(*) p-value<0.05 (Tukey HSD)

Comparando a sobrevivência (%) no final do ensaio, entre as 3 dietas, esta foi bastante similar nos três tratamentos experimentados e não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (Fig.12). Destacando-se imediatamente a sobrevivência total dos poliquetas sujeitos ao tratamento ração de linguado (*Moist sole*), pois registou-se a sobrevivência total (100 %) dos indivíduos engordados. Relativamente aos outros tratamentos, onde a dieta administrada foi ração de dourada (*Aquagold*) e peixe (*Trachurus trachurus*), a percentagem obtida foi de 96 e de 99 %, respetivamente.

Resultados

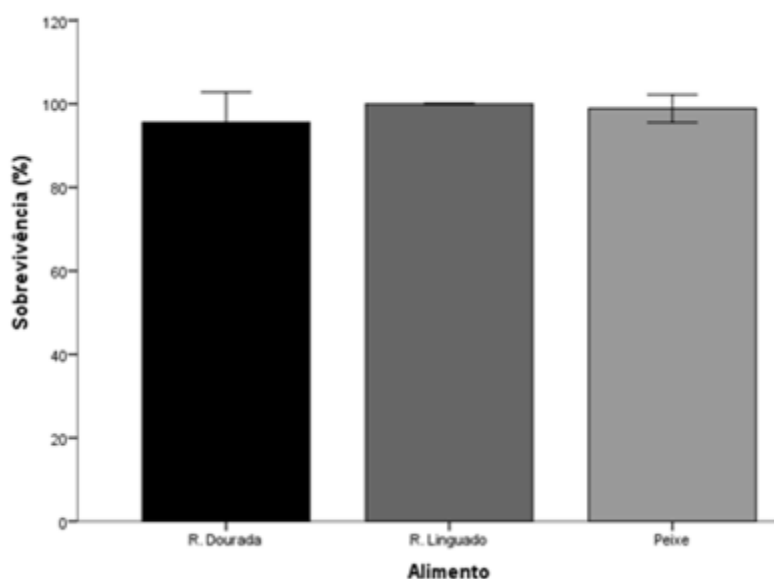


Figura 13. Sobrevivência dos juvenis ao longo de 60 dias de crescimento alimentados com três diferentes dietas (ração para dourada, ração para linguado e peixe. (Os resultados referem-se à média de três ensaios independentes realizados em triplicado e as barras representam a sobrevivência dos juvenis e as linhas verticais a média \pm desvio-padrão

Pela análise do gráfico da figura 14 a proporção do teor em proteína bruta foi superior no tratamento onde a dieta administrada foi ração de linguado (*moist sole*), com um valor médio de 92.24 mg g^{-1} (8,87 %). Seguidamente o valor intermédio observou-se no tratamento em que a dieta utilizada foi ração de dourada (*Aquagold*), com um valor médio de $91,10 \text{ mg g}^{-1}$ (8,65 %) e conseqüentemente o valor médio mais baixo do teor em proteína foi proporcionado pelo alimento carapau filetado, $90,65 \text{ mg g}^{-1}$ (8,61 %). Em relação à proporção de gordura foram novamente as dietas comerciais ração de linguado e ração de dourada com os valores mais elevados, 2.25 e 2.18 %, respetivamente. Por último a dieta peixe obteve um total de 0.85 % de gordura.

No decorrer do ensaio de crescimento, a concentração de amónia nos triplicados referentes à dieta peixe (*Trachurus trachurus*) foram os mais elevados, registando-se uma média de 4.0 mg L^{-1} . Nos restantes tratamentos a concentração de amónia permaneceu abaixo dos 2.0 mg L^{-1} .

Resultados

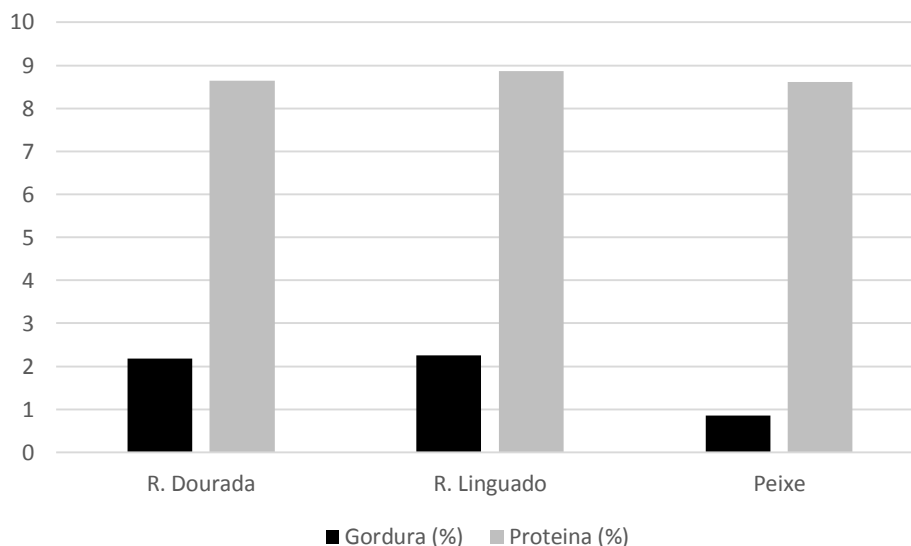


Figura 14. Percentagem (%) de gordura total e de proteína bruta dos poliquetas alimentados com as 3 diferentes dietas

4.1.1. Perfil lipídico e ácidos gordos

Observou-se que os ácidos gordos palmitoleico (16:1) e linoleico (18:2n6) não cumpriam a homogeneidade de variâncias. Como tal, foi realizado o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* para esses dois ácidos. Seguidamente, após todos os pressupostos estarem cumpridos realizou-se uma ANOVA com um fator, e desta forma verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas nos ácidos gordos Palmítico (16:0) quando comparadas os três alimentos (peixe, ração para dourada e ração para linguado) e no ácido Eicosatrienóico (20:3) quando comparadas apenas duas dietas (peixe e ração de linguado). Assim, como o nível de significância ou *p-value* foi inferior a 0.05, foi necessário realizar-se o teste de comparações múltiplas ou teste de *Tukey*.

Após a identificação dos ácidos gordos encontrados nos poliquetas observou-se que o ácido gordo palmitico (16:0) foi o mais abundante em todas as 3 dietas utilizadas, sendo que a maior concentração foi encontrada nos poliquetas alimentados com a dieta peixe, cerca de 22 %. Nas restantes dietas os valores foram de 19.15 e 16.63 % para ração de dourada e ração de linguado respetivamente. Outro ácido gordo em grande abundância foi o 20:5n3 (eicosapentaenoico ou EPA), com maior concentração observada nos poliquetas alimentados com ração de dourada, 17.38 %, sendo que as restantes dietas apresentaram valores bastante similares ao anterior, 16.10 e 14.80 % para as dietas peixe e ração de linguado, respetivamente.

Resultados

Por último o terceiro ácido gordos em maior concentração encontrado foi o 18:1n9 com o valor mais elevado nos poliquetas alimentados com ração de linguado, 13.45 %. As restantes dietas obtiveram os valores de 10.71 e 5.89 %, para ração de dourada e peixe, respetivamente.

A abundância dos ácidos gordos mais relevantes, ou seja, com valores de concentração (%) superiores a uma unidade, presentes na constituição dos poliquetas engordados encontram-se elencados na tabela I. Por sua vez, a totalidade de ácidos gordos presente na gordura amostrada encontra-se descrita na tabela II.

Tabela I. Abundância dos ácidos gordos maioritários em percentagem por dieta, presentes nos poliquetas alimentados com Peixe, Ração de dourada e Ração de linguado. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão (SD) (n=3) (* - p <0.05) representa diferenças estatisticamente significativas entre cada um dos ácidos gordos

Ácidos Gordos	Peixe	Ração de dourada	Ração de linguado
14:0	0.97 \pm 0.49	2.02 \pm 0.55	1.56 \pm 0.31
16:0	22.40 \pm 0.11*	19.15 \pm 0.33*	16.63 \pm 1.71*
16:1	2.23 \pm 1.03	2.46 \pm 0.06	1.09 \pm 0.05
16:3	4.07 \pm 1.62	4.45 \pm 1.81	5.80 \pm 1.14
18:0	8.35 \pm 0.90	7.21 \pm 1.14	6.04 \pm 0.72
18:1n9	5.89 \pm 4.72	10.71 \pm 7.16	13.45 \pm 3.88
18:1n7	3.31 \pm 0.85	2.54 \pm 0.26	2.45 \pm 0.45
18:2n6	5.21 \pm 4.72	4.50 \pm 0.58	8.03 \pm 1.45
18:3n6	1.0 \pm 0.48	0.88 \pm 0.34	0.57 \pm 0.25
20:1n9	2.17 \pm 1.05	3.20 \pm 1.42	2.90 \pm 0.67
20:2	1.16 \pm 0.05	1.57 \pm 0.48	1.97 \pm 0.25
20:3	2.23 \pm 0.49*	2.70 \pm 0.42	3.44 \pm 0.21*
20:4n6	1.25 \pm 0.83	2.42 \pm 1.09	2.50 \pm 0.38
20:5n3	16.10 \pm 3.97	17.38 \pm 2.21	14.80 \pm 1.73
22:4n6	2.14 \pm 0.33	1.08 \pm 0.82	1.04 \pm 0.21
22:5n3	3.15 \pm 0.83	2.66 \pm 0.22	1.87 \pm 0.28
22:6n3	8.72 \pm 1.52	6.72 \pm 1.41	6.72 \pm 0.81

Resultados

Tabela II. Quantidade de ácidos gordos presentes na gordura dos poliquetas amostrados (peso húmido em mg 100⁻¹ g de amostra) alimentados com Peixe, Ração de dourada e Ração de linguado

Mg 100 ⁻¹ amostra	Peixe	R. Dourada	R. Linguado
Saturados	304	690,62	574,88
Insaturados	89,21	340,54	502,88
Polinsaturados	399,2	929,44	1041,75
Omega 3	304,56	695,86	642,71
Omega 6	87,17	218,76	382,5
(n3/n6)	3,49	3,18	1,68
DHA/EPA	0,54	0,36	0,45
TOTAL	833,55	2084,3	2237,51

Discussão e conclusão

Com a crescente procura por uma nova formulação de alimento para ser administrado em aquacultura e com a conseqüente depleção dos poliquetas no seu ambiente natural, urge então a formulação de novos métodos e aperfeiçoamento das técnicas existentes no crescimento de *H. diversicolor*, para desta forma tornar viável o seu cultivo à escala comercial, possibilitando a minimização dos efeitos negativos causados por inúmeros fatores, ambientais e humanos (Nesto *et al.*, 2012; Omena *et al.*, 2012).

Pelo facto de *H. diversicolor* possuir uma panóplia de hábitos alimentares (Scaps, 2002; Fidalgo e Costa *et al.*, 2006), torna-se fundamental perceber qual ou quais os alimentos que permitem um rápido e fácil crescimento desta espécie em cultivo. Já foram efetuados diversos estudos ao nível de diferentes alimentos aplicados no crescimento de poliquetas. Alguns desses alimentos/dietas analisados foram de variadas ordens, desde plantas marinhas e macroalgas (Oliver *et al.*, 1996; Nesto *et al.*, 2012); alimento seco para peixes ornamentais *Tetramin* (Prevedelli & Vandini, 1998; Prevedelli & Vandini, 1999; Fidalgo e Costa *et al.*, 2000); microalgas (Riisgard *et al.*, 1996); fezes de amêijoia (Ferreira *et al.*, 2003); carne de camarão (Nielsen *et al.*, 1995); artémia, ração para dourada e ração para camarão de cultivo (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000).Salientando que os melhores resultados foram obtidos com os alimentos *Tetramin*, ração para dourada e carne de camarão.

Neste contexto, e tendo em conta as dietas já estudadas e relatadas foi utilizada a dieta ração de dourada, *Aquagold* (alimento seco e extrudido) como um controlo para comparação com as restantes dietas, ração semi-húmida de linguado *Moist sole* (enriquecida com imunoestimulante) e a dieta peixe (*Trachurus trachurus*). Desta forma foi utilizada como controlo a ração *Aquagold*, pois evidenciou bons resultados tanto em trabalhos efetuados por Fidalgo e Costa *et al* (2000), como em experiências realizadas na ESTM (Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, IPL) onde foi efetuada a reprodução da espécie *H. diversicolor* sob diferentes temperaturas, salinidades e fotoperíodo. Contudo, tanto a dieta ração de linguado como a dieta peixe, ainda não foram analisadas por nenhum autor.

Os parâmetros utilizados neste ensaio têm em consideração trabalhos efetuados anteriormente e que de facto a salinidade de 15 empregue no crescimento teve como referência os estudos efetuados por Nielsen *et al* (1995) e Fidalgo e Costa *et al* (2000), onde os autores referem que esta salinidade foi a que permitiu a obtenção das melhores

Discussão e Conclusão

taxas de crescimento. No decorrer do cultivo, todos os parâmetros foram mantidos como ótimos e monitorizados regularmente, bem como toda a administração de alimento. De salientar que as pequenas oscilações dos parâmetros (salinidade, temperatura e amónia), bem como o alimento não ingerido que permanecia no sedimento, foram controlados de forma a não comprometerem nem alterarem o resultado do ensaio.

Apesar do menor peso final verificado por parte dos poliquetas alimentados com a dieta peixe, é possível inferir que de facto a dieta composta unicamente por músculo branco de peixe, pode constituir a totalidade ou parte da dieta destes organismos, pois observou-se o seu crescimento ao longo do período de tempo da experimentação. Os poliquetas reagem sempre à presença do alimento assim que este era colocado nos tanques. Esta dieta apesar de refletir os valores mais baixos em termos de crescimento final, pode, como confirmado pelos restantes parâmetros que de seguida serão abordados, ser um excelente complemento a dietas já existentes e que já confirmaram ter influência num crescimento ótimo. Contudo, essas dietas possuem um elevado custo monetário associado. Posto isto, este alimento, ou qualquer outra fonte proteica marinha, que possa ter ainda um custo associado mais baixo, visto que atualmente a pesca excessiva leva a que muito do pescado não seja vendido em lota e seja assim considerado como um subproduto, que desta forma poderá ser convenientemente aproveitado, ou até mesmo produtos provenientes de rejeições. Esta vertente relativa aos subprodutos poderá ser valorizada e evidenciada de forma positiva, se se pretender efetivar o cultivo comercial desta espécie. Tal evidência poderá levar uma futura empresa (*Startup*), que cultive esta espécie, a ter um contrato com a doca local, no âmbito de comprar o pescado não comercializado e que de outra forma seria descartado. Pois com o ensaio de crescimento, ficou provado que este peixe, que posteriormente foi sujeito a congelação (por via a ser melhor conservado), e descongelado antes de fornecido ao cultivo, foi de facto bem aceite quando incluído na dieta de *H. diversicolor*. Tal dieta poderá ser comparada com a carne de camarão, pois ambas são compostas unicamente por músculo não processado, sendo diretamente retirado do animal. Esta dieta composta por carne de camarão foi testada por Nielsen *et al* (1995), onde os autores compararam esta última dieta com uma suspensão de microalgas, obtendo os melhores resultados, em termos de crescimento, pela administração da carne de camarão. Estes autores referem ainda que este tipo de dieta pode ser empregue como a única fonte de alimento para esta espécie, tal como é sugerido neste presente trabalho para a dieta peixe (*Trachurus trachurus*).

Discussão e Conclusão

Um dos pontos negativos da dieta peixe poderá ser a influência negativa que provoca na qualidade da água de cultivo, pois, foram detetadas por vezes, antes das renovações da água, concentrações elevadas de amónia, cerca de 4.0 mg L^{-1} . Estes valores poderão não ter implicações na taxa de sobrevivência, todavia, como relatam Moreira *et al* (2006), algumas concentrações tóxicas podem ter efeito na diminuição dos níveis de alimentação desta espécie, o que poderá estar na origem do baixo peso final registado comparativamente às outras dietas utilizadas. Porém, mesmo esse baixo peso registado (aproximadamente 0.5 gramas por indivíduo), pode ser considerado como o peso mínimo de mercado (Nesto *et al.*, 2012). Futuramente estas concentrações de amónia poderão ser evitadas com a possível liofilização do alimento fresco, mas mais uma vez tem de se ter em conta o elevado custo do processo. Em relação às dietas ração de dourada (*Aquagold*) e ração de linguado (*Moist Sole*) os valores de amónia observados para a outra dieta não se verificaram. Essa ausência de amónia pode ter sido devida ao facto destas rações serem secas e extrudidas, o que permitirá reduzir a matéria orgânica das mesmas pela melhor facilidade que o alimento é assimilado por parte dos poliquetas. Contrariamente ao peixe que não foi submetido a qualquer processamento. Para além da dieta peixe, as restantes dietas foram eficientemente assimiladas por parte dos organismos em cultivo. Esta evidência pode ser descrita pois quando o alimento/dieta era colocada em cada tratamento, havia imediatamente uma reação positiva por parte da maioria dos indivíduos em cultivo. O alimento era capturado e de seguida era direcionado para o interior das galerias, ou seja, com o auxílio das fortes mandíbulas o alimento era capturado junto do sedimento, resultando em *deposit feeding*. Possivelmente os restantes indivíduos, os poliquetas que não se observavam aquando da alimentação, optavam por outros métodos alimentares. Esse resultado é confirmado pela existência de formações mucosas, ou redes de muco, que sugere a captura de alimento sem que seja necessário o poliqueta emergir da sua galeria, ou seja, captação de partículas suspensas (Fidalgo e Costa *et al.*, 2000). Há que salientar também que em todo o sedimento e em todos os tratamentos foi possível observar marcas no sedimento provenientes da locomoção dos poliquetas, evidenciando a sua atividade constante durante todos os 60 dias de cultivo.

Ao nível do peso final observado nas restantes dietas, ou seja, ração de dourada e de linguado, com elevado teor proteico, 46 e 52.12 %, respetivamente, foi similar, apesar da dieta ração de dourada ser a que apresentou um maior peso final. Tal resultado foi também evidenciado e registado por Fidalgo e Costa *et al* (2000), onde a dieta ração para dourada, de entre as testadas, foi a que permitiu um dos melhores crescimentos. Também Batista *et al* (2003) testou esta dieta comercial, obtendo valores

similares aos registados neste ensaio de crescimento. A dieta ração de linguado, rica em proteína, proporcionou bons resultados de crescimento e conseqüentemente peso final. Sendo assim esta dieta poderá ser uma boa alternativa ao crescimento deste poliqueta em aquacultura. Torna-se ainda importante referir que o conteúdo proteico das rações comerciais ração de dourada e de linguado pode não ter sido crucial no peso final, pois a dieta com 46 % de proteína bruta, obteve um maior peso final comparativamente à dieta ração de linguado que apresenta um teor em proteína bruta mais elevado (52.12 %), apesar das dietas constituídas por um elevado teor proteico promoverem um maior crescimento relativamente a outros alimentos com menor percentagem proteica (Nesto *et al.*, 2012).

Em termos da taxa específica de crescimento (%) esta variou entre 6 e 7 % em todos os tratamentos, estando assim em concordância com os resultados obtidos por Nielsen *et al* (1995), Fidalgo e Costa *et al* (2000) e Batista *et al* (2003) e Nesto *et al* (2012) onde os autores elaboraram estudos com dietas comerciais, atingindo este intervalo de valores.

Em relação à sobrevivência, esta foi bastante similar em todos os tratamentos. Não sendo registada nenhuma mortalidade no decorrer do crescimento, apenas foi verificada quando se procedeu à recolha dos poliquetas engordados. Assim, pode ser possível concluir que os organismos morreram logo no início da experiência e que as dietas administradas não demonstram ter qualquer influência negativa em termos da sobrevivência, como corroborado pelo tratamento estatístico, não tendo sido encontradas diferenças significativas ($p\text{-value} < 0,05$), ou que a mortalidade tenha sucedido devido a fenómenos de canibalismo entre os animais (Bischoff *et al.*, 2009). De destacar a taxa de sobrevivência de 100 % associada à dieta ração de linguado com o imunoestimulante *Ergosan*. Tal evidência poderá ser explicada pelo facto do imunoestimulante ter atuado eficazmente no sistema imunitário dos indivíduos cultivados, pois como referido e citado anteriormente, a imunidade destes organismos poderá possuir alguma complexidade a nível dos anelídeos em geral. Este estimulante imunológico constituído por duas espécies de algas é um composto acessório de algumas rações utilizadas em aquaculturas, nomeadamente de trutas. Heidarieh *et al* (2012), trabalharam com este composto em trutas arco-íris de cultivo, tendo verificado o aumento dos parâmetros de crescimento obtendo-se assim uma performance positiva. Estes autores relatam ainda aspetos interessantes relativos à utilização de *Ergosan*, referindo que este atua na redução de bactérias patogénicas, na digestibilidade proteica

Discussão e Conclusão

e ainda no melhoramento da atuação das enzimas digestivas portanto possui uma influência direta nos bons resultados de crescimento observados.

Os restantes valores médios de sobrevivência, 96 % e 99 %, para ração de dourada e dieta peixe, respetivamente, parecem ser igualmente concordantes com Fidalgo e Costa *et al* (2000), onde foi observado uma sobrevivência de 100 % com a dieta ração de dourada *Aquagold* e por Batista *et al* (2003) que registaram um valor de 95.3 %, sendo desta forma similar ao valor observado no crescimento efetuado com a mesma dieta, cerca de 96 %. Estes resultados são também favorecidos pela baixa densidade de indivíduos utilizados ao longo dos 60 dias de crescimento (150 ind/m²) pois, a sobrevivência é afetada negativamente pelas elevadas densidades de cultivo (Safarik *et al.*, 2006; Nesto *et al.*, 2012).

Por sua vez, o teor proteico de poliquetas é algo que ainda não foi muito aprofundado nem estudado, pois muitos dos autores que trabalham com estes organismos se focam apenas nos teores lipídicos e consequentemente no perfil em ácidos gordos. Os resultados do teor em proteína, relativamente ao peso húmido encontrados no poliqueta *H. diversicolor* no final do ensaio do crescimento foram, 90.65 mg g⁻¹, 91.10 mg g⁻¹ e 92.24 mg g⁻¹, para as dietas peixe, ração de dourada e ração de linguado, respetivamente. Os resultados sugerem que quanto maior o teor proteico do alimento, maior será a assimilação de proteína pelo poliqueta. Tal pode ser evidenciado pelo maior teor em proteína bruta das rações (ver anexo a), presente na ração de linguado, cerca de 48 %, que por sua vez foi o alimento que proporcionou o maior valor em proteína por peso húmido na constituição final dos poliquetas engordados. A ração de dourada, por sua vez, possui na sua constituição um teor de proteína bruta muito similar à dieta anterior, 46 %. Fazendo com que a concentração de proteína encontrada nos poliquetas alimentados com estas duas dietas fosse de alguma forma similar, 8.65 e 8.87 %, ração de dourada e de linguado, respetivamente. Porém, o teor de proteína presente na dieta peixe (*Trachurus trachurus*), apesar de mais baixo comparativamente às rações comerciais utilizadas, possui uma excelente fonte proteica, com valores na ordem dos 20 g de proteína por cada 100 g de parte edível (Nunes, *et al.*, 2008). Assim, a dieta peixe parece nutricionalmente favorável em termos deste constituinte, de forma a proporcionar óptimos valores nos animais alimentados apenas com esta dieta. Estes resultados observados diferem dos resultados de outros autores com outras espécies de poliquetas. Lemieux *et al* (1997) registaram o valor máximo, para a espécie *Nereis virens*, de 41.4 mg g⁻¹. Esta espécie, talvez seja a que se assemelhe mais à *H. diversicolor*, logo pelos valores encontrados, a espécie em estudo revelou um maior teor

Discussão e Conclusão

em proteína. Outros valores encontrados para o teor proteico foram estudos realizados por Neuoff (1979) para a espécie *Nereis succinea*, tendo sido registados valores elevados na ordem dos 400 mg g⁻¹ (peso seco). Os maiores valores de proteína encontrados são da espécie *Perinereis nuntia*, onde foi registado o valor de 512 mg g⁻¹ em animais sujeitos a condições laboratoriais (Techapremreecha *et al.*, 2011).

Em termos de gordura total os resultados demonstram que a dieta/alimento tem uma influência direta na sua acumulação por parte dos organismos. De entre os resultados, os poliquetas que foram alimentados com a dieta ração de linguado foram os que demonstraram um maior teor de gordura na sua constituição, refletindo em parte o teor de gordura da dieta que foram alimentados. Mais propriamente a ração de linguado possui um total de 20.03 % de gordura, enquanto a ração de dourada 18 % e a dieta peixe, como é proveniente de um peixe semi-gordo, possui um valor de 2.9 g por cada 100 g de parte edível (Nunes *et al.*, 2008), ou seja, ainda mais baixo que as dietas anteriores, espelhando desta forma o valor mais baixo encontrado no final do crescimento. Poucos trabalhos se declinam nas concentrações de gordura dos poliquetas, contudo parece importante conhecer toda a fisiologia destes organismos, por forma a ser criado um perfil nutricional mais completo. Tal perfil foi realizado por Techapremreecha *et al* (2011) com o poliqueta *Perinereis nuntia*, onde foi registado de entre outros parâmetros, a gordura de indivíduos selvagens e de indivíduos cultivados, chegando-se à conclusão de que os poliquetas cultivados possuem um teor em gordura superior aos poliquetas provenientes do meio natural. Tal constatação poderá ser refletida também em *H. diversicolor*, pois como ficou provado neste trabalho, o teor em gordura da dieta é refletido no teor encontrado nos poliquetas.

No que respeita à concentração e abundância de ácidos gordos nos poliquetas poderá ser afirmado que existem poucos estudos nesta área, o que neste trabalho, através da administração de diferentes dietas, com diferentes perfis destes constituintes, poderá levar a uma melhor compreensão de como a aquacultura destes organismos pode ser vantajosa. Segundo o autor Fidalgo e Costa *et al* (2000) o perfil em ácidos gordos das dietas possui um papel essencial nas taxas de crescimento e sobrevivência de *H. diversicolor* em experiências laboratoriais.

Relativamente ao perfil de ácidos gordos saturados encontrados para este poliqueta, pode ser referenciada a grande concentração do ácido palmítico (16:0), verificando-se uma maior incidência nos poliquetas alimentados com peixe (*Trachurus trachurus*), cerca de 22.4 % ± 0.11 e seguidamente nos tratamentos onde o alimento foi

ração para dourada e para linguado, $19.15 \% \pm 0.33$ e $16.63 \% \pm 1.71$, respectivamente. Sendo que este ácido gordo foi o que se observou em maior quantidade em todos os tratamentos e no total de todos estes ácidos. Possivelmente estes elevados valores encontrados, refletem de alguma forma o elevado teor deste ácido na constituição nutricional das dietas ministradas (anexo a), pois todas as três possuem elevadas concentrações do ácido palmítico. Comprovando uma concordância com outros autores, Luís & Passos (1995), García-Alonso *et al* (2008) e Bischoff *et al* (2009). De mencionar que este último autor a par desta dissertação, apresentam o valor mais elevado de ácido Palmítico (16:0) descrito para *H. diversicolor*, cerca de $24.6 \% \pm 1.1$. De mencionar ainda que este ácido gordo, devido às elevadas concentrações em que foi encontrado, evidencia que poderá ter um importante papel a nível fisiológico, pois é o primeiro metabolito da síntese de ácidos gordos e o produto inicial da lipogénese nos poliquetas, como reporta García-Alonso *et al* (2008), que também observaram elevadas concentrações deste ácido.

Em relação a outros ácidos gordos saturados, verificou-se igualmente uma concentração considerável do ácido gordo esteárico (18:0), com valores na ordem dos $8.3 \% \pm 0.90$, novamente pela influência da dieta peixe. Pode salientar-se uma vez mais que tal concentração encontrada nos poliquetas retrata o teor da dieta que foi utilizada de forma linear (ver anexo b). Novamente o valor encontrado foi o mais elevado comparativamente à bibliografia existente para esta espécie. García-Alonso *et al* (2008), Bischoff *et al* (2009), Luís & Passos (1995) reportam valores de 6 %, 6.1 % e 7.60 %, respectivamente como os mais elevados para este ácido gordo.

Ao nível de ácidos gordos monoinsaturados ou *MUFAs* (*Monounsaturated Fatty Acids*), podem ser destacados o palmitoleico (16:1), com uma maior incidência nos poliquetas referentes à dieta ração para dourada, $2.46 \% \pm 0.06$, o oleico (18:1n9) com o valor maior na dieta ração para linguado, $13.45 \% \pm 3.88$, o cis oleico (18:1n7), com $3.31 \% \pm 0.85$ na dieta peixe e o eicosanóico (20:1n9), com maior percentagem na dieta ração para dourada, $3.20 \% \pm 1.42$. Tais concentrações diferem pela metade, quando comparadas com os valores análogos das dietas administradas. Assim, o padrão encontrado para os ácidos gordos saturados tende a ser menos linear quando comparados os ácidos gordos monoinsaturados, pois as dietas contêm valores bastante diferentes do que os apresentados pelos animais alimentados com estas mesmas dietas. Podendo estar interligado com a importância desta classe de lípidos, podendo estes serem menos essenciais que os saturados. Contudo há a referir que os ácidos cis oleico (18:1n7) e eicosanóico (20:1n9) exibem a exceção à regra pois os valores

Discussão e Conclusão

encontrados nos poliquetas de todos os tratamentos são superiores aos valores que as dietas representam, o que leva a crer que este animal consegue sintetizar ou mesmo produzir de alguma forma estes ácidos gordos.

Seguidamente os ácidos gordos polinsaturados ou PUFAs (*Polyunsaturated fatty acids*), talvez os componentes lipídicos com a maior importância, destacam-se o alfa linolénico (18:3n6), com $1 \% \pm 0.48$ relativo à dieta peixe, o araquidónico (C20:4n6), com $2.5 \% \pm 0.38$ na dieta ração para linguado, o eicosapentaenóico ou EPA (C20:5n3), com valores de $17.38 \% \pm 2.21$ nos poliquetas alimentados com ração de dourada e o docosahexanóico ou DHA (22:6n3) com o valor mais elevado observado na dieta carapau filetado, com $8.72 \% \pm 1.52$. É importante e interessante observar o facto de que quase todos os ácidos gordos polinsaturados, à exceção do DHA (22:6n3), apresentam na constituição dos poliquetas valores bastante mais elevados do que os valores encontrados nas dietas para os mesmos ácidos gordos. Tal faz transparecer a importância desta classe de lípidos a nível metabólico e na fisiologia destes animais, havendo portanto uma possível biossíntese destes compostos por parte destes organismos.

Em suma, de entre todas as classes de ácidos gordos presentes nos poliquetas amostrados destacam-se três com os valores mais elevados: o ácido gordo palmítico (16:0), o oleico (18:1n9) e o eicosapentaenóico ou EPA (20:5n3), presentes em animais alimentados com as dietas peixe, ração de linguado e ração de dourada, respetivamente. Estes resultados corroboram os obtidos pelos autores Luis & Passos (1995); García-Alonso *et al* (2008) e Bischoff *et al* (2009), em que obtiveram também os valores mais elevados para estes ácidos gordos.

Por outro lado, os resultados dos ácidos gordos presentes nas dietas utilizadas neste ensaio (ver anexo b), permitem evidenciar que em termos gerais, os ácidos gordos mais evidentes foram o palmítico (16:0), com valores na ordem dos 20 % nas dietas peixe e ração de dourada, palmitoleico (16:1) na dieta ração de dourada (5.41 %), oleico (18:1n9) com um valor bastante elevado, (23.48 %) na dieta ração de linguado, e linoleico (18:2n6) com 10.54 % também presente nesta última dieta. Em termos de ácidos gordos polinsaturados verificou-se o valor mais elevado para o ácido docosahexanóico (DHA) presente na dieta peixe, com o valor de 39.59 %, o que representa mais do dobro dos valores encontrados nas duas restantes dietas. De seguida, há a presença do ácido eicosapentaenóico (EPA) na dieta ração de dourada com o valor de 12.65 %.

Em relação ao ratio DHA/EPA, comprovou-se que a dieta peixe apresentou o maior ratio com um total de 0.54 %. Este valor já seria de esperar pois esta dieta, de entre as restantes, foi a que apresentou o maior valor ao ser analisado a sua constituição. De referir que as restantes dietas proporcionaram valores similares, mas analisando o conjunto de resultados, este ratio foi inferior a uma unidade, estando assim em concordância com Fidalgo e Costa *et al* (2000). Os autores referem ainda que tais resultados poderão estar relacionados com os hábitos alimentares omnívoros e oportunistas destes invertebrados.

Desta forma a dieta peixe, que na sua totalidade é constituída por carapau filetado, pode ser encarada como um alimento de baixo valor comercial, e por vezes existe em demasia nas lotas de pesca e mercados portugueses, veio assim a confirmar-se uma excelente alternativa às dietas comerciais. Não só pelos valores em ácidos gordos (peça chave a nível nutricional para posterior alimento de peixes em aquaculturas), como também em termos proteicos, e ainda por permitir um tamanho comercial, aquando da sua administração a poliquetas utilizados em aquacultura. Em suma, esta dieta pode servir possivelmente como um alimento completo num cultivo destes anelídeos em larga escala ou mesmo contribuir de forma a ser um aditivo/complemento a outras dietas comerciais utilizadas hoje em dia, não só apenas para este tipo de invertebrados mas talvez para outros animais de cultivo. Todavia há que tentar aperfeiçoar o melhor método de conservação e elaboração de um produto final mais fácil de administrar como a liofilização, sem que cause muita alteração em termos dos parâmetros qualidade da água, mais concretamente nas concentrações de amónia, que poderão causar alguns distúrbios no sistema de cultivo. Relativamente às restantes dietas (ração de dourada e ração de linguado) parecem também ser uma excelente alimentação. Fidalgo e Costa *et al* (2000) comprovaram também que a dieta ração de dourada contribui de forma eficaz para o crescimento desta espécie de poliquetas. Relativamente à dieta ração de linguado (*Moist sole*), pelo facto de na sua composição existir um enriquecimento com um imunoestimulante, possibilitou uma sobrevivência de 100 %. Assim no futuro, deve ter-se em conta este tipo de compostos, por forma a fortalecer o sistema imunitário dos animais, todavia não existe bibliografia que comprove ou que permita uma comparação de resultados relativos a este alimento.

Há a referir ainda que estes dois últimos alimentos possuem um custo de mercado bastante elevado, o que numa aquacultura comercial de poliquetas é um aspeto fundamental a ser tomado em conta. Concluindo-se assim que a dieta peixe

resulta na melhor opção se se quiser progredir no crescimento industrial. Mais ainda, é necessário efetuar mais experiências para efetivar a eficácia do peixe no crescimento de *H. diversicolor*, não sendo possível descartar outros possíveis peixes ou organismos, ou mesmo o complemento com outros compostos, como betaglucanos ou imunoestimulantes, de modo a fornecer uma dieta ótima que permita um eficaz e rápido crescimento.

Outro aspeto importante, que no decorrer das experimentações poderia ter sido controlado, foi o parâmetro físico do fotoperíodo. Torna-se relevante explicitar este facto pois, o fotoperíodo é um parâmetro que futuramente deverá ser tomado em conta, porque diversos autores apontam esta característica como fundamental quer em termos da reprodução quer em termos da maturação dos poliquetas em crescimento (Olive *et al.*, 1998; Olive & Rees, 1999; Last & Olive, 1999). No entanto, este aspeto não condicionou, nem parece ter tido alguma influência negativa no decorrer da experimentação, bem como nos resultados obtidos ao final dos 60 dias.

Outra forma de ser rentabilizado economicamente e comercialmente o cultivo dos poliquetas poderá ser pela futura implementação na aquacultura multi-trófica integrada. Pois segundo Hannah *et al* 2013, este tipo de aquacultura integrada oferece um meio natural para serem utilizados alguns dos resíduos de peixes em cultivo, para a produção de organismos de um nível trófico inferior com interesse comercial, aumentando a sustentabilidade ambiental e económica do cultivo. Assim, após se ter concluído com este e com outros trabalhos presentes na literatura, *H. diversicolor*, torna-se um excelente candidato para ser utilizado em sistemas de aquacultura integrada, não só pela sua facilidade em adaptar-se a um só tipo de alimento, quer seja proveniente de proteína animal, de fezes, quer de rações ou dietas comerciais, como também pela sua excelente condição de adaptabilidade a meios mais adversos, desde relativos à qualidade da água, à temperatura, até a diferenças de salinidade. Relacionando todos estes fatores e aliando ainda toda a sua vertente nutritiva, em termos de ácidos gordos, torna *H. diversicolor* como um dos invertebrados marinhos com maior potencial em aquacultura.

Discussão e Conclusão

Assim, a aquacultura representa hoje em dia uma alternativa que pode possibilitar a diminuição da captura de organismos do seu habitat natural, pois, como referido anteriormente, a captura destes organismos é desprovida de qualquer controlo, capturando-se indiscriminadamente espécies de elevado valor ecológico. Em jeito conclusivo poder-se-á referir que a aquacultura pode ter um impacto bastante positivo tanto na alimentação mundial como na ecologia e manutenção dos ecossistemas marinhos e dulçaquícolas (Fidalgo e Costa, 2002; Carvalho *et al.*, 2013).

Perspetivas Futuras

Perspetivas Futuras

O poliqueta *Hediste diversicolor* tem associada uma importância enorme em termos de potencialidades ecológicas, económicas. Contudo, deve ser feito futuramente um estudo mais alargado a nível do seu ciclo de vida, por forma a ser viável o seu cultivo a larga escala, como tanto promete e é evidenciado neste trabalho.

Para tal será necessário num futuro próximo serem perspetivadas diversos pontos relativos ao cultivo desta espécie, nomeadamente:

Um melhor conhecimento, ou mesmo ser criado algum método que permita determinar quando e como a maturação sexual é despoletada, para proporcionar animais com o mesmo tamanho comercial;

Conhecer quais as variações que controlam e atuam na maturação sexual, sendo esse conhecimento o que poderá permitir o desenvolvimento do cultivo a larga escala. Pois em aquacultura é sempre desejável ter algum domínio nesta fase, para que se possa obter um *stock* de novos exemplares sem que se dependa das condições ambientais;

Como se trata de uma espécie semélpara é mais uma vez crucial controlar a maturação dos indivíduos aquando do crescimento/engorda, para se evitar a maturação precoce dos indivíduos cultivados;

Identificar qual ou quais os fatores que permitem atenuar ou desencadear a maturação sexual nesta espécie, pois, um dos maiores problemas é referente à mortalidade ocorrida após a reprodução dos organismos;

Saber como e qual o melhor alimento a ser administrado de maneira a produzir poliquetas com um perfil nutricional elevado, e com um tamanho comercial atingido num menor intervalo de tempo, sem que se promova a mortalidade dos indivíduos pela consequente maturação antes do tempo desejado;

Reconhecer como atua de facto o fotoperíodo no ciclo de vida da espécie para que seja possível a sua aquacultura intensiva *outdoor*;

Tentar estudar fatores como salinidades mais baixas, permitindo atenuar os custos de produção a larga escala;

Estudar os fatores que permitam um ganho de peso similar e constante em todos os poliquetas cultivados;

Criar um método que permita uma recolha mais eficaz, aquando da captura dos organismos engordados e prontos a serem comercializados;

Perspetivas Futuras

Produzir e testar novas dietas orgânicas, e mesmo adaptar o cultivo destes organismos a aquaculturas já existentes (policultivo) de forma a haver uma reciclagem de nutrientes e uma diminuição de custos;

Criar novas e verdadeiras políticas que promovam o incentivo à aquacultura sustentável, proporcionando uma diminuição das capturas no ambiente selvagem, pois é verificada a depleção destes organismos no seu meio natural de uma forma abrupta.

.

Bibliografia

Bibliografia

- Aberson, M. J. R., Bolam, S. G., Hughes, R. G. (2011). The dispersal and colonisation behaviour of the marine polychaete *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) in south-east England. *Hydrobiologia*. 627: 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
- Amiard-Triquet, C., Durou, C., Mouneyrac, C. (2008). Environmental quality assessment in estuarine ecosystems: Use of biometric measurements and fecundity of the ragworm *Nereis diversicolor* (Polychaeta, Nereididae). Elsevier. *Water research*. 42: 2157-2165 pp.
- Banta, G. T., Holmer, M., Jensen, M. H., & Kristensen, E. (1999). Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in a sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology*, 19(2), 189-204 pp.
- Barnes, R. D. & Ruppert, E. E., Fox, R. S. (2004). *Invertebrate Zoology* 7th edition, Brooks/Cole-Thompson, Belmont, CA, USA, ISBN 0-03-025982-7.963, 413-463 pp.
- Bartels-Hardege, H. D., & Zeeck, E. (1990). Reproductive behaviour of *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta). *Marine Biology*, 106(3), 409-412 pp.
- Batista, F. M., Fidalgo e Costa, P., Passos, A. M., Ramos, A., Pousão, P., Cancela da Fonseca, L. (2003). Production of the ragworm *Nereis diversicolor* (OF Müller, 1776), fed with a diet for gilthead seabream *Sparus auratus*, 1758: survival, growth, feed utilization and oogenesis. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 19(1), 447-452 pp.
- Batista, F., Cancela da Fonseca, L., Fidalgo e Costa, P., Gil, J., Melo, P., Passos, A. M., Pereira, P. (2006). The market features of imported non-indigenous polychaetes in Portugal and consequent ecological concerns. *Scientia Marina*. 70S3: 287-292 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(3), 271-276 pp.
- Bray, W. A., Lawrence, L. (1992) Reproduction of *Penaeus* species in captivity. *Marine shrimp culture: principle and practices*. Elsevier, Amsterdam, 93–170 pp.
- Breton, S., Dufresne, F., Desrosiers, G., & Blier, P. U. (2003). Population structure of two northern hemisphere polychaetes, *Neanthes virens* and *Hediste diversicolor* (Nereididae), with different life-history traits. *Marine Biology*, 142(4), 707-715 pp.

Bibliografia

- Budge, S. M., Iverson, S. J., Bowen, W. D., & Ackman, R. G. (2002). Among-and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(5), 886-898 pp.
- Cardoso, P.G., Lillebo, A.I., Pereira, E., Duarte, A.C., Pardal, M.A., (2009). Different mercury bioaccumulation kinetics by two macrobenthic species: The bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Hediste diversicolor*. *Mar. Environ. Res.* 68, 12–18 pp.
- Carvalho, A. N., Vaz, A. S. L., Sérgio, T. I. B., & dos Santos, P. J. T. (2013). Sustainability of bait fishing harvesting in estuarine ecosystems—Case study in the Local Natural Reserve of Douro Estuary, Portugal. *Journal of Integrated Coastal Zone Management* 13(2):157-168 pp.
- Catalano, B., Moltedo, G., Martuccio, G., Gastaldi, L., Virno-Lamberti, C., Lauria, A., & Ausili, A. (2012). Can *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) be considered a good candidate in evaluating PAH contamination? A multimarker approach. *Chemosphere*, 86(9), 875-882 pp.
- Costa e Silva, M., Pereira, P., Falcão, M., Cancela da Fonseca, L. (2008) "Caracterização das comunidades de anelídeos poliquetas ao longo de um gradiente de profundidade na região do Ancão (Algarve – Portugal)." *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 3.3 214-231 pp.
- Cuny, P., Miralles, G., Cornet-Barthaux, V., Acquaviva, M., Stora, G., Grossi, V., & Gilbert, F. (2007). Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Marine pollution bulletin*, 54(4), 452-459 pp.
- Cu villier-Hot, V., Boidin-Wichlacz, C., & Tasiemski, A. (2014). Polychaetes as Annelid Models to Study Ecoimmunology of Marine Organisms. *Journal of Marine Science and Technology*, 22(1), 9-14 pp.
- Dales, R. P. (1950). The reproduction and larval development of *Nereis diversicolor* OF Müller. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 29(02), 321-360 pp.
- Dhainaut, A., & Scaps, P. (2001). Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian journal of zoology*, 79(2), 233-253 pp.
- Duport, E., Stora, G., Tremblay, P., & Gilbert, F. (2006). Effects of population density on the sediment mixing induced by the gallery-diffusor *Hediste (Nereis) diversicolor* OF Müller, 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 336(1), 33-41 pp.

Bibliografia

- Eklöf, J. (2010). Taxonomy and phylogeny of polychaetes. Department of Zoology; University of Gothenburg. ISBN 978-91-628-8092-7. (33) pp.
- Eklöf, J. (2010). Taxonomy and phylogeny of polychaetes. Department of Zoology; Zoologiska institutionen. ISBN 978-91-628-8092-7 Printed by IntellectualInfolog, Göteborg, Sweden
- Ferreira, P. P., Fonseca, L. C., Batista, F. M., Joaquim, S., Passos, A. M., Fidalgo e Costa, P., Massapina, C. (2003). Preliminary results on the growth and survival of the polychaete "*Nereis diversicolor*" (OF Müller, 1776), when fed with faeces from the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758). Boletín. Instituto Español de Oceanografía, 19(1), 443-446 pp.
- Fidalgo e Costa, P. (2002). Bio-ecologia e produção do poliqueta *Nereis diversicolor* (OF Muller), recurso zoológico de ambientes costeiros. Dissertação de doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (155) pp.
- Fidalgo e Costa, P. (2003). The oogenic cycle of *Nereis diversicolor* (OF Müller, 1776) (Annelida: Polychaeta) in shallow water environments in south western Portugal. Boletín. Instituto Español De Oceanografía, 19(1), 17-30 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Fonseca, L. C., Narciso, L. (2000). Growth, survival and fatty acid profile of *Nereis diversicolor* (OF Muller, 1776) fed on six different diets. Bulletin of marine science, 67 (1), 337-343 pp.
- Fidalgo e Costa, P., Oliveira, R. F., & Fonseca, L. C. D. (2006). Feeding ecology of *Nereis diversicolor* (OF Müller) (Annelida, Polychaeta) on estuarine and lagoon environments in the southwest coast of Portugal.
- Gambi, M. C., Castelli, A., Giangrande, A., Lanera, P., Prevedelli, D., & Zunarelli Vandini, R. (1994). Polychaetes of commercial and applied interest in Italy: an overview. Mémoires du Muséum national d'histoire naturelle. Série A, Zoologie, 162 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.
- García-Arberas L. y Rallo A., (2002). "Life cycle, demography and secondary production of the polychaete *Hediste diversicolor* in a Non-Polluted Estuary in the Bay of Biscay". Marine Ecology, 23 (3), 237-251 pp.
- Gilbert, F., Aller, R.C., Hulth, S., (2003). The influence of macrofaunal burrow spacing and diffusive scaling on sedimentary nitrification and denitrification: an experimental simulation and model approach. J. Mar. Res. 61, 101–125 pp.

Bibliografia

- Hannah, L., Pearce, C. M., & Cross, S. F. (2013). Growth and survival of California sea cucumbers *Parastichopus californicus* cultivated with sablefish *Anoplopomaf imbria* at an integrated multi-trophic aquaculture site. *Aquaculture*, 406, 34-42 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(2), 481-493 pp.
- Hedman, J. E., Gunnarsson, J. S., Samuelsson, G., & Gilbert, F. (2011). Particle reworking and solute transport by the sediment-living polychaetes *Marenzelleria neglecta* and *Hediste diversicolor*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2), 294-301 pp.
- Heidarieh, M., Mirvaghefi, A. R., Akbari, M., Farahmand, H., Sheikhzadeh, N., Shahbazfar, A. A., & Behgar, M. (2012). Effect of dietary Ergosan on growth performance, digestive enzymes, intestinal histology, hematological parameters and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 38(4), 1169-1174 pp.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., & Larson, A. (2006). *Integrated principles of zoology*. New York, NY: McGraw-Hill..ISBN 978-0-07-128797-5. (910) 362-374 pp
- Kirsch, P. E., Iverson, S. J., Bowen, W. D., Kerr, S. R., & Ackman, R. G. (1998). Dietary effects on the fatty acid signature of whole Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(6), 1378-1386 pp.
- Kristensen, E., Mikkelsen, O. L. (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*, Vol. 265: 141–153 pp.
- Last, K. S., & Olive, P. J. W. (1999). Photoperiodic control of growth and segment proliferation by *Nereis (Neanthes) virens* in relation to state of maturity and season. *Marine Biology*, 134(1), 191-199 pp.
- Lemieux, H., Blier, P. U., Dufresne, F., & Desrosiers, G. (1997). Metabolism and habitat competition in the polychaete *Nereis virens*. *Marine Ecology Progress Series*, 156, 151-156 pp.
- Luis, O. J., & Passos, A. M. (1995). Seasonal changes in lipid content and composition of the polychaete *Nereis (Hediste) diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 111(4), 579-586 pp.
- Malmquist, L., Christensen, J. H., & Selck, H. (2013). Effects of *Nereis diversicolor* on the transformation of 1-methylpyrene and pyrene: transformation

Bibliografia

- efficiency and identification of phase I and II products. *Environmental science & technology*. (2013), 47 (10), pp.
- Marty, R., & Retiere, C. (1999). Larval-to-juvenile mobility activities of a holobenthic species, *Nereis diversicolor* (OF Muller) (Polychaeta: Nereidae) their involvement in recruitment. *Bulletin of marine science*, 65(3), 761-773 pp.
 - Meunpol, O., Meejing, P., & Piyatiratitivorakul, S. (2005). Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture Research*, 36(12), 1216-1225 pp.
 - Monroig, Ó., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. (2013). Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Marine Invertebrates: Recent Advances in Molecular Mechanisms. *Marine drugs*, 11(10), 3998-4018 pp.
 - Moreira, S. M., Lima, I., Ribeiro, R., & Guilhermino, L. (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology*, 78(2), 186-201 pp.
 - Mouneyrac, C., Perrein-Ettajani, H., & Amiard-Triquet, C. (2010). Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution*, 158(1), 121-128 pp.
 - Nesto, N., Simonini, R., Prevedelli, D. & Da Ros, L. (2012). Effects of diet and density on growth, survival and gametogenesis of *Hediste diversicolor* (OF Müller, 1776) (Nereididae, Polychaeta). *Aquaculture* 362–363 (2012) 1–9 pp.
 - Nielsen, A. M., Eriksen, N. T., Iversen, J. L., & Riisgård, H. U. (1995). Feeding, growth and respiration in the polychaetes *Nereis diversicolor* (facultative filter-feeder) and *N. virens* (omnivorous)-a comparative study. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 125(1), 149-158 pp.
 - Nogaro, G., Charles, F., de Mendonça Jr, J. B., Mermillod-Blondin, F., Stora, G., & François-Carcaillet, F. (2008). Food supply impacts sediment reworking by *Nereis diversicolor*. *Hydrobiologia*, 598(1), 403-408 pp.
 - Nunes, M. L.; Batista, I.; Bandarra, N. M.; Morais, M. G.; Rodrigues. (2008). Produtos da pesca: Valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. P. o. Publicações Avulsas do Ipimar, 18, 77 pp.
 - Olive, P. J. (1999). Polychaete aquaculture and polychaete science: a mutual synergism. *Hydrobiologia*, 402, 175-183 pp.
 - Olive, P. J. W. (1994). Polychaeta as a world resource: a review of patterns of exploitation as sea angling baits and the potential for aquaculture based

Bibliografia

- production. Mémoires du Muséum national d'histoire naturelle. Série A, Zoologie, 162 pp.
- Olive, P. J. W., Fletcher, J., Rees, S., & Desrosiers, G. (1997). Interactions of environmental temperature with photoperiod in determining age at maturity in a semelparous polychaete *Nereis neanthes (virens)* sars. *Journal of thermal biology*, 22(6), 489-497 pp.
 - Olive, P. J., Rees, S. W. (1999). Photoperiodic changes influence the incorporation of vitellin yolk protein by oocytes of the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) Virens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 123(2), 213-220 pp.
 - Olive, P. J., Rees, S. W., Djunaedi, A. (1998). Influence of photoperiod and temperature on oocyte growth in the semelparous polychaete *Nereis (Neanthes) virens*. *Marine Ecology Progress Series*, 172, 169-183 pp.
 - Oliver, M., Desrosiers, G., Caron, A., & Retière, C. (1996). Juvenile growth of the polychaete *Nereis virens* feeding on a range of marine vascular and macroalgal plant sources. *Marine Biology*, 125(4), 693-699 pp.
 - Omena, E. P., Lavrado, H. P., Paranhos, R., & Silva, T. A. (2012). Spatial distribution of intertidal sandy beach polychaeta along an estuarine and morphodynamic gradient in an eutrophic tropical bay. *Marine pollution bulletin*, 64(9), 1861-1873 pp.
 - Orrhage, L., & Müller, M. C. (2005). Morphology of the nervous system of Polychaeta (Annelida). In *Morphology, molecules, evolution and phylogeny in Polychaeta and related taxa* Springer Netherlands. 79-111 pp.
 - Paramor, O. A. L., & Hughes, R. G. (2004). The effects of bioturbation and herbivory by the polychaete *Nereis diversicolor* on loss of saltmarsh in south-east England. *Journal of Applied Ecology*, 41(3), 449-463 pp.
 - Pires, A., Gentil, F., Quintino, V., Rodriguez, A. M., (2012.). Reproductive biology and *Diopatra neapolitana* (Annelida, Onuphidae), an exploited natural resource in Ria de Aveiro (Northwestern Portugal). *Marine Ecology* 33, 56-65 pp.
 - Porchet-Henneré, E., & Vernet, G. (1992). Cellular immunity in an annelid (*Nereis diversicolor*, Polychaeta): production of melanin by a subpopulation of granulocytes. *Cell and tissue research*, 269(1), 167-174 pp.
 - Prevedelli, D., & Vandini, R. Z. (1998). Effect of diet on reproductive characteristics of *Ophryotrocha labronica* (Polychaeta: Dorvilleidae). *Marine Biology*, 132(1), 163-170 pp.

Bibliografia

- Prevedelli, D., & Vandini, R. Z. (1999). Survival, fecundity and sex ratio of *Dinophilus gyrocolliatus* (Polychaeta: Dinophilidae) under different dietary conditions. *Marine Biology*, 133(2), 231-236 pp.
- Purschke, G. (2005). Sense organs in polychaetes (Annelida). In *Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in Polychaeta and Related Taxa*. Springer Netherlands- 53-78 pp.
- Rangel, L. (2008). Parasitas metazoários de poliquetas (*Nereis diversicolor* e *Diopatra neapolitana*) da Ria de Aveiro. Dissertação de Grau de mestre. Departamento de Zoologia – Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Riisgard, H. U. (1991). Suspension feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70, 29-37 pp.
- Riisgard, H. U. (1995). Feeding, growth and respiration in the polychaetes *Nereis diversicolor* (facultative filter-feeder) and *N. virens* (omnivorous) a comparative study. *Mar Ecol Prog Ser*, 125, 149-158 pp.
- Riisgard, H. U., Larsen, P. S. & Poulsen, L. (1996). Phytoplankton reduction in near-bottom water caused by filter-feeding *Nereis diversicolor*-implications for worm growth and population grazing impact. *Marine Ecology Progress Series*, 141, 47-54 pp.
- Rosa, S., Granadeiro, J. P., Vinagre, C., França, S., Cabral, H. N., & Palmeirim, J. M. (2008). Impact of predation on the polychaete *Hediste diversicolor* in estuarine intertidal flats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78(4), 655-664 pp.
- Rossi, M. C. S. (2008). Contribuição ao conhecimento taxonómico dos poliquetas sabelídeos (Polychaete:Sabellidae) da região Sudeste do Brasil. Tese de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 176 pp..
- Rowley, A. F., & Powell, A. (2007). Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific? *The Journal of Immunology*, 179(11), 7209-7214.
- Safarik, M., Redden A. M., & Schreider, M. J. (2006). Density-dependent growth of the polychaete *Diopatra aciculata*. *Scientia Marina*, 70(S3), 337-341 pp.
- Scaps, P. (2002). A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (OF Müller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia*, 470(1-3), 203-218 pp.
- Shokri, M.; Gladstone, W.; Kepert, A. (2009) - Annelids, arthropods or molluscs are suitable as surrogate taxa for selecting conservation reserves in estuaries. *Biodivers Conserv*, 18(5):1117-1130 pp.

Bibliografia

- Tairova, Z.M., Giessing, A.M.B., Hansen, R., Andersen, O. (2009). 1-Hydroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in the marine polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar. Environ. Res.* 67, 38–46 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 (3), 265-269 pp.
- Thayer PE, Stahlnecker JF (2006) Non-native invasive marine species in Maine: a report to the Maine State Legislature. Marine Resources Committee and Natural Resources Committee, 22 pp.
- Tzetlin, A. B., & Filippova, A. V. (2005). Muscular system in polychaetes (Annelida). In *Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in Polychaeta and Related Taxa*. Springer Netherlands. 113-126 pp.
- Vijayan, K. K., Stalin Raj, V., Balasubramanian, C. P., Alavandi, S. V., Sekar, V. T., & Santiago, T. C. (2005). Polychaete worms - a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Inter-Research*, 63, 107-111 pp.
- Zar, J.H. (2009). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 5th edition.

Anexos

ANEXO a

Ração Semi-húmida – *Moist sole*

Fabricante: Sparus

<i>Dry matter basis</i>	<i>CTRL</i>	<i>Vit C</i>	<i>Ergosan</i>	<i>Beta-glucanos</i>
	%	%	%	%
<i>Fishmeal 70 LT</i>	20.00	20.00	20.00	20.00
<i>Fishmeal 60</i>	17.00	17.00	17.00	17.00
<i>Krill meal</i>	9.00	9.00	9.00	9.00
<i>CPSP G</i>	8.00	8.00	8.00	8.00
<i>Squid meal</i>	7.00	7.00	7.00	7.00
<i>Soybean meal 48</i>	10.00	10.00	10.00	10.00
<i>Wheat meal</i>	13.00	13.00	13.00	13.00
<i>Wheat DDGS</i>	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Fish oil</i>	10.30	10.30	10.30	10.30
<i>Vit & Min Premix with Asta</i>	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>Algatrium DHA 70%</i>	1.70	1.70	1.70	1.70
Supplements				
<i>Vit C (mg/kg)</i>		1000.00		
<i>Ergosan (%)</i>			1.00	
<i>Beta-glucanos (%)</i>				0.50
TOTAL	100.00	100.00	100.00	100.00

<i>Theoretical composition</i>	<i>CTRL</i>	<i>Vit C</i>	<i>Ergosan</i>	<i>Beta-glucanos</i>	
<i>Crude protein</i>	52.12	52.12	52.12	52.12	%
<i>Digestible protein</i>	48.47	48.47	48.47	48.47	%
<i>Crude fat</i>	20.03	20.03	20.03	20.03	%
<i>Fiber</i>	1.31	1.31	1.31	1.31	0
<i>Starch</i>	9.45	9.45	9.45	9.45	%
<i>Gross Energy</i>	23.33	23.33	23.33	23.33	MJ/kg
<i>Arg</i>	3.35	3.35	3.35	3.35	%
<i>His</i>	1.25	1.25	1.25	1.25	%
<i>Ile</i>	1.99	1.99	1.99	1.99	%
<i>Leu</i>	3.27	3.27	3.27	3.27	%
<i>Lys</i>	3.68	3.68	3.68	3.68	%
<i>Thr</i>	2.12	2.12	2.12	2.12	%
<i>Trp</i>	0.52	0.52	0.52	0.52	%
<i>Val</i>	2.68	2.68	2.68	2.68	%
<i>Met + Cys</i>	1.97	1.97	1.97	1.97	%
<i>Phe + Tyr</i>	3.60	3.60	3.60	3.60	%
<i>Avail Phosphorus</i>	1.14	1.14	1.14	1.14	%
<i>Oleic</i>	1.98	1.98	1.98	1.98	%
<i>ARA</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	%
<i>EPA</i>	2.24	2.24	2.24	2.24	%
<i>DHA</i>	2.41	2.41	2.41	2.41	%
<i>Astax</i>	25.00	25.00	25.00	25.00	mg/kg
<i>Vitamin E</i>	150.00	150.00	150.00	150.00	mg/kg
<i>Vitamin C</i>	1000.00	2000.00	1000.00	1000.00	mg/kg
<i>Vitamin A</i>	20000.00	20000.00	20000.00	20000.00	UI/kg
<i>Ergosan</i>	0.00	0.00	1.00	0.00	%
<i>Beta-glucanos</i>	0.00	0.00	0.00	0.50	%

Ração AquaGold 5

Faricante - Sorgal (Aquasoja)

Alimento Composto Completo para Peixes (Douradas e Robalos)

Características Analíticas:

- Proteína Bruta	46.0%
- Gordura Bruta	18.0%
- Cinzas Brutas	9.5%
- Fibra Bruta	1.5%
- Fósforo	1.3%

Aditivos (por Kg de Alimento):

- Vitamina A	5.000 UI
- Vitamina D3	1.000UI
- Alfa Tocoferol	200mg
- Cobre	14mg
- Antioxidante (E321, E324)	
- Antifúngico (E200, E236, E260, E280, E282)	

Matérias-primas para Alimentação Animal:

- Farinha de Peixe	41.0%
- Bagaço de Soja	15.3%
- Óleo de Peixe	14.0%
- Glúten de Milho	11.0%
- Trigo Forrageiro	9.0%

- Farinha de Sangue	5.0%
- Ervilha Descascada	3.4%
- Premistura	0.6%
- Glúten de Trigo	0.5%
- Emulsionante (E484)	0.1%
- Ligante (E412, E413,E414)	0.1%

Anexo b

Ácidos gordos presentes nas 3 dietas administradas no ensaio de crescimento

	Carapau	Aquagold	Moist sole
C 14:0	1,55	5,12	2,99
C 16:0	19,75	20,07	16,94
C 16:1	1,18	5,41	2,32
C 16:3	0,31	0,28	0,15
C 18:0	8,67	3,62	4,74
C18:1n9	8,55	16,67	23,48
C18:1n7	2,42	1,94	2,59
C18:2n6	1,25	6,91	10,64
C18:3n6	0	0,17	0,18
C20:1n9	0,35	1,9	0,85
C 20:2	0,12	3,23	1,62
C 20:3	0,18	0,25	0,14
C20:4n6	2,21	0,88	0,73
C20:5n3	9,01	12,65	8,2
C22:4n6	0	0	0
C22:5n3	2,12	1,81	1,59
C22:6n3	39,59	12,88	16,72