



Comparação da biologia reprodutiva da amêijoa-boa, Ruditapes decussatus, e da amêijoa japónica, Ruditapes philippinarum, da Lagoa de Óbidos, Leiria, Portugal

Isabel Maria Pereira Duarte

2018



*Comparação da biologia reprodutiva da amêijoa-boa, *Ruditapes decussatus*, e da amêijoa japónica, *Ruditapes philippinarum*, da Lagoa de Óbidos, Leiria, Portugal*

Isabel Maria Pereira Duarte

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista e da Doutora Domitília Matias

2018

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Título: Comparação da biologia reprodutiva da amêijoia-boa, *Ruditapes decussatus*, e da amêijoia japónica, *Ruditapes philippinarum*, da Lagoa de Óbidos, Leiria, Portugal

Copyright© Isabel Maria Pereira Duarte

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

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

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Resumo

A amêijoia-boua, *R. decussatus*, em Portugal é um recurso de elevada relevância, sendo por isso importante a introdução de áreas para aumentar a sua produção sustentável. Contudo, esta espécie encontra-se em competição por espaço, alimento e recursos com a espécie de bivalve invasora *R. philippinarum*, uma vez que partilham o mesmo habitat. Procedeu-se à determinação dos estádios de desenvolvimento gonadal, através do estudo de preparações histológicas, onde se verificou sincronia entre os sexos, e onde as fases V e VI se mostraram as mais frequentes para *R. philippinarum* e as fases I e IV para *R. decussatus*. Foi ainda realizada a determinação do índice gonadal e do índice de condição. Na composição bioquímica foram avaliados e calculados os valores médios do teor de proteína (*R. decussatus*: 235,96±77,55 a 563,98±179,07µgmg⁻¹ AFDW; *R. philippinarum*: 237,70±21,63 a 1012,50±230,45µgmg⁻¹ AFDW), glicogénio (*R. decussatus*: 44,20±21,71 a 131,98±22,07µgmg⁻¹ AFDW; *R. philippinarum*: 18,08±10,67 a 102,10±35,75µgmg⁻¹ AFDW) e lípidos totais (*R. decussatus*: 38,91±24,11 a 68,84±13,81µgmg⁻¹ AFDW; *R. philippinarum*: 25,91±7,11 a 97,09±42,97µgmg⁻¹ AFDW) de ambas as espécies. Durante os meses de amostragem não foram encontradas diferenças acentuadas no ciclo reprodutivo, índice de condição e na bioquímica quando comparadas as duas espécies, *Ruditapes philippinarum* e *Ruditapes decussatus*.

Palavras-chave: Amêijoia japónica; Amêijoia-boua; ciclo reprodutivo; composição bioquímica; índice de condição; Lagoa de Óbidos; *Ruditapes decussatus*; *Ruditapes philippinarum*.

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Abstract

R. decussatus, in Portugal, is a resource of great relevance, and it is therefore important to introduce areas to increase its sustainable production. However, this species is in competition for space, food and resources with the species of invasive bivalve *R. philippinarum*, since they share the same habitat. The stages of gonadal development were determined through the study of histological preparations, where the synchrony between the sexes was verified, and where phases V and VI were the most frequent for *R. philippinarum* and phases I and IV for *R. decussatus*. The gonadal index and the condition index were also determined. In the biochemical composition, mean values of protein content (*R. decussatus*: 235.96 ± 77.55 to $563.98 \pm 179.07 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW; *R. philippinarum*: 237.70 ± 21.63 to $1012.50 \pm 230.45 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW), glycogen (*R. decussatus*: 44.20 ± 21.71 to $131.98 \pm 22.07 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW; *R. philippinarum*: 18.08 ± 10.67 to $102.10 \pm 35.75 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) and total lipids (*R. decussatus*: 38.91 ± 24.11 to $68.84 \pm 13.81 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW; *R. philippinarum*: 25.91 ± 7.11 to $97.09 \pm 42.97 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) of both species. During the sampling months, there were no marked differences in reproductive cycle, condition index and biochemistry when comparing the two species, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*.

Keywords: biochemical composition; condition index; European clam; Japanese carpet shell; Lagoa de Óbidos; reproductive cycle; *Ruditapes decussatus*; *Ruditapes philippinarum*.

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Índice	
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
1. Introdução	1
2. Material e Métodos	9
3. Resultados	19
4. Discussão	37
Referências	45

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Índice de Figuras

Figura 2.1. Localização da Lagoa de Óbidos, onde os indivíduos de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* foram recolhidos.

Figura 2.2. Fotomicrografias dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas femininas de *Ruditapes decussatus* (A1-F1) e de *Ruditapes philippinarum* (A2-F2). A - Repouso sexual; B - Início da gametogénese (Og – Ovogónia); C - Gametogénese avançada, (Po - ovócito pedunculado); D - Maduro; E – Desova parcial (Oo – Oócito); F - Desova.

Figura 2.3. Fotomicrografias dos diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas masculinas de *Ruditapes decussatus* (A1-E1) e de *Ruditapes philippinarum* (A2-E2). A - Repouso sexual; B - Início da gametogénese (Sg – Espermatogónia; Fw – Parede folicular); C - Gametogénese avançada; D - Maduro; E – Desova parcial (Sp – Espermatozoide).

Figura 3.1. Variação mensal da temperatura da superfície da água (TSM) na Lagoa de Óbidos de março a dezembro de 2017.

Figura 3.2. Variação mensal de clorofila *a* (Cl *a*) (média±DP, n=2) na Lagoa de Óbidos de março a dezembro de 2017.

Figura 3.3. Variação mensal de matéria orgânica em suspensão (MOS) (média±DP, n=2) na Lagoa de Óbidos de março a dezembro de 2017.

Figura 3.4. Variações mensais (gráfico de barras) e frequências dos dez meses de estudo (gráfico circular) do desenvolvimento gonadal das populações de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017. Fêmeas (A) e machos (B).

Figura 3.5. Variações mensais do índice gonadal (GI) (média, n=20) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

Figura 3.6. Variações mensais do índice de condição (média±DP, n=10) das populações de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Escala reprodutiva para *Ruditapes decussatus* de acordo com Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias et al. (2013) e utilizada para *Ruditapes philippinarum*.

Tabela 3.1. Variações mensais no índice gonadal (GI) (média, n = 10) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*, fêmeas e machos, da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

Tabela 3.2. Valores médios (\pm DP) de proteínas, glicogénio, lípidos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) e energia total (kJ mg^{-1} AFDW) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* durante o período de amostragem.

Tabela 3.3. Resultados da correlação de Pearson entre os parâmetros estudados de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* durante o período de amostragem (r - coeficiente de correlação; *p-value*; s.c.- sem correlação); * a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral) e ** a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

Lista de Abreviaturas

AFDW – Peso seco da carne sem cinzas

ANOVA – Método de análise de variância entre grupos

Cl *a* – Clorofila *a*

DGRM – Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

IG – Índice Gonadal

IC – Índice de Condição

MOS – Matéria Orgânica em Suspensão

r – Coeficiente de Correlação

DP – Desvio-padrão

TSM – Temperatura da superfície da água

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

1. Introdução

A alimentação dos organismos marinhos produzidos é considerada um dos grandes entraves ao crescimento da aquacultura, no entanto, em 2014, metade da produção mundial aquícola, foram algas marinhas e microalgas (27%) e diversos grupos de organismos filtradores, como é o caso dos bivalves (22,5%) (FAO, 2016). Ou seja, o cultivo de animais aos quais não é necessário fornecer alimentação foi de 22,7 milhões de toneladas, o que representa 30,8% da produção mundial de todas as espécies cultivadas (FAO, 2016). Assim, nas últimas décadas a produção de bivalves tem ocupado um lugar importante no desenvolvimento da aquacultura mundial, sendo que em 2014, a Europa produziu 632 000 toneladas de bivalves, tendo como principais produtores a Espanha, França e Itália (FAO, 2016).

Nas áreas costeiras de diversos países, a produção de bivalves tem sido uma importante fonte de rentabilidade e de alimentação (Cardoso *et al.*, 2013), sendo importante investir em espécies de elevado valor comercial como a amêijoia, a vieira e a ostra (Helm & Bourne, 2006; FAO, 2014; FAO, 2016) para produção em aquacultura.

Nas estatísticas de pesca portuguesas, realizadas pela DGRM (2015), a produção de amêijoia representa cerca de 47% da produção total de bivalves em 2014, sendo a espécie amêijoia-boia (*Ruditapes decussatus*) a mais produzida. Trata-se de uma espécie de elevado valor comercial e é também uma das espécies mais apreciadas pelos consumidores (Matias *et al.*, 2009). *R. decussatus* é produzida em maior escala nas Rias de Aveiro e Formosa (Matias *et al.*, 2013), contudo nos últimos anos a sua produção tem apresentado um decréscimo acentuado, não só devido a fatores como o excesso de captura de juvenis do meio natural, falha no recrutamento, mas sobretudo devido à introdução de espécies exóticas, não nativas, tais como *R. philippinarum*, denominada comumente de amêijoia japónica (Matias *et al.*, 2013; FAO, 2017a; FAO, 2017b).

A reprodução de diversas espécies de bivalves tem sido intensamente estudada nas últimas décadas, principalmente em espécies comerciais, sendo esta pesquisa crucial para a gestão da aquacultura e da pesca (Joaquim *et al.*, 2008a; Guerra *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2013). De acordo com Quayle (1943), os estudos reprodutivos em bivalves permitem entender o seu ciclo de vida, estratégias reprodutivas (Coe, 1943), os problemas de

conservação e os problemas relacionados à sua regulamentação, pelo que é extremamente importante o estudo do ciclo reprodutivo deste grupo de organismos. Desta forma, o conhecimento das épocas de maior intensidade reprodutiva, permitem estabelecer planos de gestão das pescas e o restabelecimento dos mananciais naturais (Galvão *et al.*, 2006). Em aquacultura, esta informação sobre a biologia reprodutiva proporciona não só uma melhor gestão do período de recolha de sementes para o cultivo, mas também o estabelecimento da produção em *hatchery* (Galvão *et al.*, 2006; Joaquim *et al.*, 2008a; Matias *et al.*, 2013).

R. decussatus (Linnaeus, 1758) é um molusco bivalve pertencente à família Veneridae, proveniente das águas costeiras do Mediterrâneo, Atlântico Europeu, Península Ibérica, da Noruega à Somália, no noroeste africano (Parache, 1982; FAO, 2017a), e em Portugal pode ser encontrado na Lagoa de Óbidos, Ria de Aveiro, Ria de Alvor e Ria Formosa, e nos estuários dos rios Arado, Tejo e Sado (Vilela, 1950), podendo ser ainda ocorrer nos Açores, na Lagoa da Fajã de Santo Cristo, na Ilha de São Jorge (Jordaens *et al.*, 2000). A amêijoabo é uma espécie eurialina e euritérmica, o seu habitat são zonas costeiras protegidas, como é o caso das lagoas e estuários, vivem sob o sedimento, geralmente em substrato arenoso e em substrato lodoso, a uma profundidade de 15 a 20 cm (FAO, 2017a). A densidade populacional, o estado fisiológico dos indivíduos, o tamanho dos sifões, a consistência do solo são fatores que circunscrevem a localização vertical dos organismos, já a sua localização horizontal é definida pela linha de maré (Vilela, 1950; Guelorget *et al.*, 1980). Relativamente à morfologia externa, a concha dos indivíduos apresenta estrias radiais e longitudinais bem marcadas, com uma forma oval, alongada e convexa (Banha, 1984; FAO, 2017a). A cor da concha é variável, depende da composição e do tipo de substrato, podendo apresentar uma cor acastanhada, amarela, uniforme ou listada (De Valence & Peyre, 1990; FAO, 2017a) e, geralmente, as valvas apresentam o contorno claro dos músculos adutores e da linha pálida (Poppe & Goto, 1991; FAO, 2017a). A morfologia interna, mostra que este bivalve é constituído por diversas estruturas, como o manto, brânquias, sifões, palpos labiais, músculo adutor e massa visceral (Vilela, 1950, FAO, 2017a). Os sifões são separados ao longo de todo o comprimento com pigmentação na extremidade distal (Parache, 1982; FAO, 2017a), a massa visceral é dividida em duas partes, o pé, que permite a locomoção e a própria massa visceral, onde se encontram os sistemas reprodutivo, digestivo, nervoso e circulatório (Vilela, 1950; Grassé, 1960). É um organismo filtrador, digerindo diferentes partículas suspensas em água, como bactérias, fitoplâncton, larvas,

ovos de invertebrados e protistas (Parache, 1982). A maturidade das amêijoas depende do seu tamanho e não da sua idade ou distribuição geográfica (Ojea *et al.*, 2004), sendo atingida quando estas apresentam cerca de 20 mm, como é uma espécie gonocórica, as fêmeas e os machos produzem, respetivamente, oócitos e espermatozoides e a fertilização é externa na coluna de água (Vilela, 1950; Camacho, 1980), no entanto alguns autores defendem que estes organismos apresentam hermafroditismo em juvenis, dissipando-se geralmente antes do estado funcional das gónadas (Lucas, 1968; Delgado & Pérez-Camacho, 2002).

R. philippinarum (Adams & Reeve, 1850) é um molusco bivalve pertencente à família Veneridae, proveniente do Oceano Pacífico Ocidental, Filipinas, sul e leste dos mares da China, Mar Amarelo, Mar do Japão, Mar de Okhotsk e em torno das Ilhas Kuril do Sul (FAO, 2017b; Moura *et al.*, 2017a). A amêijoa-japonesa foi deliberadamente introduzida em diversas partes do mundo como, na costa do Pacífico da América do Norte, ao longo das costas europeia e do Reino Unido, até à bacia do Mediterrâneo, devido ao elevado valor comercial que apresenta (Moura *et al.*, 2017a). Esta espécie habita em águas portuguesas há mais de duas décadas, no entanto, não se sabe como foi introduzida pela primeira vez em Portugal (Moura *et al.*, 2017a). *R. philippinarum* é uma espécie invasora, e pertence a um dos grupos de organismos mais invasivos que habitam o ecossistema marinho, uma vez que atingem rapidamente densidades elevadas, o que as torna na maior parte da biomassa bentónica (Moura *et al.*, 2017a). Apesar de não se dar muita importância aos bivalves invasores, quando comparados a outros grupos de organismos não-indígenas, estes causam graves impactos ecológicos e financeiros (Moura *et al.*, 2017a).

Os bivalves são organismos filtradores, consumindo elevadas quantidades de matéria orgânica, o que faz que entrem em competição por alimento com as espécies nativas, consequentemente interferem na respiração, reprodução e crescimento das espécies nativas (Moura *et al.*, 2017a). O crescimento rápido apresentado por espécies não-nativas, leva a que estas espécies (invasoras) se tornem dominantes em abundância e biomassa no ecossistema invadido, sendo uma ameaça para as espécies nativas (Moura *et al.*, 2017a). Também a proliferação e acumulação das conchas vazias dos bivalves invasores podem alterar a estrutura física do habitat, o que diminui a velocidade da camada limite e amplia a heterogeneidade e complexidade do mesmo (Moura *et al.*, 2017a). Em Portugal, *R. philippinarum* pode ser encontrada em vários estuários e lagoas costeiras (Moura *et al.*,

2017a), e atualmente é a espécie bivalve dominante em algumas das zonas, como por exemplo em algumas áreas do Estuário do Rio Tejo (Moura *et al.*, 2017a). Relativamente à morfologia externa, a concha destes organismos é espessa, equivalente, inequilateral, bicos na metade anterior, com estrias radiais muito marcadas, e na região média as estrias longitudinais não são perceptíveis, de cor castanha ou amarela (FAO, 2017b). Quanto à morfologia interna, tal e qual como *R. decussatus*, *R. philippinarum* é constituída por diversas estruturas, como o manto, brânquias, sífões, palpos labiais, músculo adutor e massa visceral, no entanto os seus sífões encontram-se ligadas na maior parte do seu comprimento (FAO, 2017b) e a massa visceral, também se divide em duas partes, o pé, que permite a locomoção e a própria massa visceral, onde se encontram os sistemas reprodutivo, digestivo, nervoso e circulatório.

Nos bivalves, o sistema reprodutivo forma uma estrutura difusa, ocupando os tecidos conjuntivos e desaparece no período de repouso, quase por completo. A formação dos gametas dá-se nas gónadas, nas fêmeas a oogénese, e nos machos a espermatogénese, ocorrem nos folículos gonadais onde existem células típicas de cada estágio do processo que levam à produção de oócitos e espermatozoides maduros que são emitidos na época de desova. As gónadas formam uma estrutura ácino (estrutura formada por um aglomerado de células) que após desenvolvida envolve a glândula digestiva e os restantes órgãos, e preenche os espaços livres entre eles. Apresentam formação dendrítica composta por gonoductos, ductos genitais e diversos canais menores, formando uma rede de folículos. A gametogénese, ou seja, o processo de formação de gametas, ocorre através de células precursoras que originam gonócitos. As células germinativas primordiais, células estaminais indiferenciadas, representam a primeira fase do desenvolvimento gonadal, encontrando-se na periferia dos ductos gonadais que se ligam ao tecido conjuntivo e são indiferenciados (não há distinção entre fêmeas e machos). Através de divisões sucessivas as células multiplicam-se ativamente e originam células diferenciadas, gónias primárias, nas fêmeas ovogónias primárias e nos machos espermatogónias primárias, são estruturadas em folículos tubulares, originando dois processos distintos, a ovogénese e a espermatogénese, dependendo se é fêmea ou macho, respetivamente (Joaquim *et al.*, 2008b; Guerra *et al.*, 2011). Nos machos, as espermatogónias primárias, formam uma ou duas camadas concêntricas que revestem a parede folicular, que após passar pelo processo de mitose são convertidas em espermatogónias definitivas, que se diferenciam em

espermátocitos primários, desprendendo-se da parede folicular e permanecem numa camada contínua. Estes são sujeitos ao processo de meiose, e são originados os espermátocitos secundários, permanecendo dentro de uma camada interna até se diferenciarem em espermátídios, que posteriormente se tornam em espermatozoides maduros, localizados no centro do folículo, com a cabeça apontada para a parede e o flagelo para o lúmen (Guerra *et al.*, 2011). Nas fêmeas, a ovogónia primária é agregada à parede folicular, como no processo da espermatogénese. Durante o ciclo reprodutivo, enquanto alguns folículos ficam em repouso, outros dividem-se por mitose, originando ovogónias secundárias, que por sua vez através da meiose originam os oócitos, enquanto outras continuam em repouso. Após a sua total formação os oócitos crescem até à fase final da ovogénese, dividindo-se em duas fases, a pré-vitelogénese e a vitelogénese. Na primeira fase, o crescimento é lento e os oócitos aumentam o tamanho e dá-se a primeira divisão meiótica, na segunda fase, os oócitos tornam-se maduros. Durante o processo de oogénese os oócitos são pequenos e encontram-se unidos à parede folicular, ao aumentarem de tamanho, são acompanhados por um pedúnculo, e na última fase, quando estão maduros, flutuam no lúmen (Bayne, 1976; Joaquim *et al.*, 2008b; Guerra *et al.*, 2011).

O ciclo reprodutivo é o culminar dos eventos que sucedem à ativação gonadal (Seed, 1976), assim é possível distinguir dois períodos distintos, o período reprodutivo e o de repouso. No processo de reprodução, os ciclos podem ser anuais, semi-anuais ou contínuos, podendo haver um ou dois períodos de reprodução por ano, com um período de repouso, ou uma geração contínua ao longo do ano. A determinação destes ciclos é definida por fatores endógenos (atividade hormonal e genética) e exógenos (temperatura, alimento, fotoperíodo, idade e tamanho), o que faz com que a reprodução seja uma resposta geneticamente controlada, pelo meio ambiente (Sastry, 1979). O culminar destes fatores determina o desenvolvimento do sistema reprodutivo dos bivalves, o que define o tempo e a dimensão de desova, no entanto de salientar que os fatores de maior importância são a temperatura e a qualidade e quantidade de alimento disponível (Gabbott, 1976; Bayne & Newell, 1983; Pérez-Camacho *et al.*, 2003; Joaquim *et al.*, 2011).

Associado à gametogénese, existe um ciclo anual de acumulação e uso de energia, ao qual os bivalves estão expostos (Albentosa *et al.*, 2007), regulado pela disponibilidade de alimento e temperatura, fatores externos variáveis de ano para ano, que originam alterações

ao longo dos anos, no momento do ciclo reprodutivo (Joaquim *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2011).

Nas regiões temperadas, a disponibilidade de nutrientes varia sazonalmente, e os bivalves tendem a responder a essas alterações de formas diferentes, muitas vezes o pico do período de produção de gâmetas coincide com o pico da disponibilidade de nutrientes, outras vezes, os nutrientes são armazenados em diversos órgãos do corpo e a produção de gâmetas dá-se em períodos onde a abundância de nutrientes é escassa, estas estratégias dependem de espécie para espécie. Contudo, existem espécies que encontram o equilíbrio em ambas as estratégias, o que provoca alterações nos componentes bioquímicos, demonstrando que estas alterações estão estreitamente relacionadas com o estado de maturação sexual (Sastry, 1979). Isto permite classificar as diferentes espécies de bivalves em conservadoras ou oportunistas, relacionando o desenvolvimento gonadal com a acumulação e utilização dos nutrientes (Bayne, 1976). Nas espécies conservadoras, a gametogénese ocorre devido a reservas previamente adquiridas (Zandee *et al.*, 1980, Bayne *et al.*, 1982) e nas espécies oportunistas, a gametogénese ocorre em períodos onde o alimento é abundante no ambiente (Pérez-Camacho *et al.*, 2003). São diversos os autores (Gabbot & Bayne, 1973; Barber & Blake, 1981; Lowe *et al.*, 1982; Fernández Castro & Vido de Mattio, 1987; Gouletquer *et al.*, 1988; Le Pennec *et al.*, 1991; Massapina *et al.*, 1999; Pérez-Camacho *et al.*, 2003; Ojea *et al.*, 2004; Joaquim *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2013) que relacionam os ciclos de desenvolvimento gonadal com os ciclos bioquímicos. O armazenamento de reservas, de energia, e a importância de cada componente bioquímico no processo de reprodução em diferentes condições nutricionais, desempenham uma função de elevada relevância nas estratégias de adaptação de cada uma das espécies nas diferentes áreas geográficas (Goodman, 1979; Pérez-Camacho *et al.*, 2003). Já foi evidenciado por vários autores (Shafee & Daoudi, 1991; Trigui-El-Menif *et al.*, 1995; Iglesias *et al.*, 1996; Avendaño & Le Pennec, 1997; Matias *et al.*, 2013), o facto de as diferentes respostas às condições disponíveis variarem de acordo com as populações geográficas, das mesmas espécies, que podem diferir em termos de níveis de fecundidade e composição bioquímica.

Nos bivalves marinhos, as reservas são acumuladas sob a forma de proteínas, glicogénio e lípidos, sendo posteriormente usados na síntese gametogénica quando a exigência metabólica é elevada (Giese, 1969; Bayne, 1976; Mathieu & Lubet, 1993; Dridi

et al., 2007). O componente bioquímico mais abundante nos tecidos são as proteínas, que são utilizadas em funções estruturais, representando uma reserva energética para bivalves adultos, especialmente na gametogênese e em situações de níveis baixos de glicogénio, ou de equilíbrio energético (Beninger & Lucas, 1984; Galap *et al.*, 1997). Relativamente à bioenergia, os hidratos de carbono são o tipo de reservas mais importantes para os bivalves, encontrando-se disponíveis para uso imediato, uma vez que são hidrossolúveis. Estes apresentam duas funções biológicas principais, o armazenamento de energia a longo prazo e elementos estruturais (Robledo *et al.*, 1995). O glicogénio é o hidrato de carbono de maior evidência para o fornecimento energético (Fernández Castro & Vido de Mattio, 1987) e ciclo reprodutivo, que representa a condição nutricional dos bivalves (Newell & Bayne, 1980; Uzaki *et al.*, 2003; Pazos *et al.*, 2005). As reservas de glicogénio, normalmente, são usadas durante os processos gametogénicos quando há carência de lípidos (Serdar & Lök, 2009). O elevado teor calórico dos lípidos (Serdar & Lök, 2009), torna-os numa reserva de elevada importância, desempenhando assim, um papel importante na formação de gâmetas, e é a principal reserva dos oócitos (Matias *et al.*, 2009, 2011).

Inteiramente relacionado aos ciclos de armazenamento e de consumo de reservas de nutrientes e gametogenicidade, está o índice de condição, usado para fins biológicos (Baird, 1958), reconhecido como um biomarcador útil, que reflete a capacidade que os bivalves têm de resistência ao stress natural desfavorável (Mann, 1978; Fernández Castro & de Vido de Mattio, 1987). A monitorização da atividade gametogénica, da composição bioquímica e o índice de condição, são parâmetros que possibilitam o conhecimento do ciclo reprodutivo das espécies de bivalves, considerando a variabilidade sazonal.

Estudos anteriores, realizados em populações portuguesas de *R. decussatus* (Vilela, 1950; Pacheco *et al.*, 1989; Matias *et al.*, 2013; Machado, 2015), defendem que a localização geográfica das populações (Ojea *et al.*, 2004) intervém nos padrões de armazenamento e utilização de nutrientes, e que tem influência no ciclo reprodutivo. Relativamente à *R. philippinarum*, a influência da localização geográfica é evidente, pois esta espécie demonstra um comportamento invasivo, apresentando uma rápida disseminação e crescimento, competindo por recursos e causando o declínio de espécies nativas (Chainho 2014; Chainho *et al.*, 2015; Ramajal *et al.*, 2016; Moura *et al.*, 2017a). *R. philippinarum* atinge maior tamanho, apresenta um crescimento mais rápido, maior

resistência aos parasitas (Breber 1985, Moura *et al.*, 2017a), maior espectro de alimentação e maior eficiência de conversão alimentar que *R. decussatus* (Bodoy *et al.*, 1980; Sorokin & Giovanardi, 1995; Moura *et al.*, 2017a). Outros estudos também indicam que na maior parte dos casos, esta amêijoia, prolifera muito mais eficazmente que *R. decussatus*, devido à escassez e ao controlo reduzido por inimigos naturais, como parasitas, patógenos e predadores, no local onde foram introduzidas em comparação com as espécies nativas (Colautti *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2017a).

Sabendo que a amêijoia japonesa é uma espécie invasora, é importante averiguar se a estratégia de reprodução, a ausência de predadores naturais, o seu estado fisiológico e o seu crescimento são vantajosas quando comparadas com a amêijoia-boia, espécie nativa, na Lagoa de Óbidos. Com base em estudos anteriores realizados em diferentes habitats, Poole Harbour (Inglaterra) e Baía de Santander (Espanha) (Moura *et al.*, 2017b), e devido à similaridade morfológica apresentada pelas duas espécies, a dúvida do real efeito nocivo, que *R. philippinarum* apresenta sobre *R. decussatus* não é realmente respondida, contudo na Lagoa de Veneza (Itália), a espécie invasora parece ter substituído a nativa (Moura *et al.*, 2017b). A coexistência destas duas espécies no mesmo local, torna a sua identificação morfológica difícil apenas através da análise da concha, assim Hurtado *et al* (2011) defendem a hibridação destas duas espécies, comprovando este facto através de um método de identificação de espécies que usa os diferentes comprimentos do espaço interno transcrito dos genes principais e secundários do RNA ribossómico. Após a identificação morfológica das duas espécies, Hurtado *et al* (2011) verificaram que nove dos mais de duzentos organismos identificados como *R. decussatus* apresentavam sequências de DNA, tanto de *R. decussatus* como de *R. philippinarum*. O presente estudo tem como objetivo a comparação dos ciclos reprodutivos das duas espécies de amêijoas, *R. decussatus* e *R. philippinarum*, provenientes da Lagoa de Óbidos. Este estudo servirá de base para traçar cenários que visem avaliar os efeitos potencialmente nocivos para a espécie nativa.

2. Materiais e Métodos

2.1. Metodologia:

Mensalmente, durante um período de dez meses (março a dezembro de 2017) procedeu-se à recolha de sessenta indivíduos adultos de cada espécie de amêijoia, *R. decussatus* (comprimento= $390,80 \pm 52,6$ mm; peso= $13,6607 \pm 3,6$ g; n=600) e a *R. philippinarum* (comprimento= $382,57 \pm 39,2$ mm; peso= $15,7630 \pm 4,9$ g; n=600), os organismos recolhidos são provenientes da Aldeia da Lapinha, Lagoa de Óbidos, Leiria, Portugal ($39^{\circ}24'57''$ N; $9^{\circ}13'18''$ W) (Figura 2.1.). Do mesmo local, foram recolhidas amostras de água (2L) para se proceder à quantificação da clorofila *a* (Cl *a*) e da matéria orgânica em suspensão (MOS). A temperatura da superfície do mar (TSM) foi medida no local através de um termómetro (Nahita – 10 a 200). As amostras (organismos e a água) foram transportadas para o laboratório afim de se proceder às respetivas análises.



Figura 2.1. Localização da Lagoa de Óbidos, onde os indivíduos de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* foram recolhidos.

A Lagoa de Óbidos é uma lagoa interior estabelecida na região litoral ocidental de Portugal, definindo-se por ser um sistema costeiro que ocupa uma depressão pouco profunda, separada do oceano por uma barreira natural arenosa, de 1,5Km de extensão (Freitas, 1989). A lagoa apresenta um comprimento e largura máximos de 4,5km e 1800m, respetivamente, com uma área de superfície molhada, variável, em média de $6,0\text{km}^2$, estando ligada ao mar por uma entrada adelgaça, que varia, de dimensão e posição, consoante as escalas de tempo e também

devido à intervenção antrópica com objetivo de melhorar o sistema (Oliveira *et al.*, 2006). A lagoa expõe duas regiões principais, com características morfológicas e sedimentares distintas, sendo elas a lagoa inferior, com diversos bancos arenosos e canais com velocidades fortes e a lagoa superior, que se caracteriza pelas baixas velocidades e pelo sedimento de fundo lamacento (Freitas, 1989; Oliveira *et al.*, 2006). As amostras para este estudo provêm da lagoa superior, que abrange uma bacia rasa e grande, com duas baías alongadas, o braço da Barrosa e o braço do Bom Sucesso, e uma de menores dimensões na margem sul, a Poça das Ferrarias (Oliveira *et al.*, 2006). Apresenta uma profundidade média de 2 a 3m no nível médio do mar, com marés semidiurnas, ou seja, com duas marés por dia, que variam entre 0,5 e 0,4m, dependendo da fase da maré (Malhadas *et al.*, 2009).

2.2. Parâmetros analíticos

2.2.1. Análise da água (Clorofila *a* e Matéria orgânica em suspensão)

A determinação da concentração da clorofila *a* (Cl *a*) foi efetuada segundo o método espectrofotométrico proposto por Jeffrey & Lorenzen (1980). As amostras de água, 500mL em duplicado, foram filtradas através de papel de vidro Whatman GF/C. Em seguida, extraiu-se a Cl *a* através da adição de 10mL de acetona a 90% (C₃H₆O) e colocou-se durante 24 horas a 4°C, na estufa. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras a 4000 rpm durante 10 minutos. Para a correção dos feopigmentos depois da primeira leitura de absorvância a 650nm e 750nm, adicionou-se ácido clorídrico diluído (HCl) e a absorvância foi novamente lida os mesmos comprimentos de onda. O teor de Cl *a* foi calculado de acordo com a equação de Lorenzen (1967):

$$Cl\ a\ (mgm^{-3}) = \frac{A * K * [(665_0 - 750_0) - (665_a - 750_a)] * v}{V * L}$$

Onde:

A – Coeficiente de absorção de clorofila *a* = 11

K – Fator a equacionar a redução da absorção da concentração inicial da clorofila = 2,43

665₀ – Absorvância a 665 antes da adição de HCl

750₀ – Absorvância a 750 antes da adição de HCl

665_a – Absorvância a 665 após da adição de HCl

750_a – Absorvância a 750 após da adição de HCl

v – Volume de acetona utilizado para a extração = 10 mL

V – Litros de água filtrada = 0,5L

L – Comprimento da cuvete = 1cm

A matéria orgânica em suspensão (MOS) foi determinada através do método gravimétrico de Strickland & Parsons (1972). As amostras de água, 500mL em duplicado, foram filtradas através de papel de vidro Whatman GF/C, tendo sido previamente colocados durante 2 horas a 450°C e pesados. A MOS foi determinada através da secagem do filtro a 80°C durante 24 horas na estufa, após esse tempo os filtros foram incinerados a 450°C durante 24 horas. Assim, determinou-se a MOS como a perda de peso devido às elevadas temperaturas de acordo com a equação de Jones & Iwama (1991):

$$\text{MOS}(\text{mgL}^{-1}) = \frac{\text{Peso matéria total (g)} - \text{Peso cinzas (g)}}{\text{Volume de água filtrada (L)}} * 1000$$

2.2.2. Análise laboratorial (estádio gametogénico, índice de condição e composição bioquímica)

Os indivíduos recolhidos, em laboratório, foram colocados em água do mar filtrada a 20°C durante 24 horas, de forma a esvaziar os seus estômagos (depuração), antes de se proceder à análise histológica, ao índice de condição e às análises bioquímicas.

2.2.2.1. Análise histológica

Dos organismos recolhidos, foram selecionados vinte (dez machos e dez fêmeas, quando era possível a sua distinção), de cada espécie e mês. A massa visceral foi separada dos sifões e das brânquias, sendo esta fixada em solução de Davidson durante 48 horas, tendo sido posteriormente transferida para álcool etílico a 70% para serem armazenadas até ao processamento. Posteriormente, as amostras foram colocadas num processador de tecidos (Leica TP1020) para desidratação, clarificação e impregnação de parafina nos tecidos, e posteriormente incluídas em blocos de parafina. Foram cortadas secções finas (6µm) desses tecidos no micrótomo (Sakura accucut SRM200), colocadas em lâminas que foram coradas com

hematoxilina e eosina. As preparações histológicas foram examinadas ao microscópio com ampliações de 10x, a cada indivíduo foi atribuído um estágio que representa o estado gonadal. Assim, caracterizou-se a maturidade reprodutiva do bivalve em seis etapas de acordo com a escala de Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias *et al.* (2013) (Tabela 2.1. e Figuras 2.2. e 2.3.).

Tabela 2.1. Escala reprodutiva para *Ruditapes decussatus* de acordo com Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias *et al.* (2013).

Estádio	Descrição histológica
Repouso sexual (Fase I)	Os folículos gonadais estão ausentes e o tecido muscular e conetivo ocupa toda a zona, da glândula digestiva ao pé. Não há evidências de desenvolvimento gonadal e a não é possível a determinação do sexo.
Início da gametogênese (Fase II)	Folículos e acini gonadal começam a aparecer em fêmeas e machos, respetivamente. Aumentam de tamanho e aparecem cobertos com oócitos na fase de crescimento nas fêmeas e com gâmetas imaturos (espermatogónia e espermatócitos) nos machos.
Gametogênese avançada (Fase III)	Os folículos ocupam uma grande parte da massa visceral. A presença de tecido muscular e conjuntivo é reduzida. No fim deste estágio, caracterizado pelo crescimento celular intenso nas fêmeas, o oócito projeta-se do centro do lúmen, permanecendo preso, através do pedúnculo. A abundância de oócitos livres é igual aos que se encontram unidos à parede do folículo. Nos machos, a maioria dos acini encontra-se cheia de espermatídios e espermatozoides.
Maduro (Fase IV)	Corresponde à maturidade, da maioria, dos gâmetas. Nos oócitos maduros ocorre a rutura do pedúnculo, e, conseqüentemente, os oócitos, ocupam o interior folicular. Nos machos, os acini gonadais contêm principalmente espermatozoides.
Desova parcial (Fase V)	Os gâmetas são libertados. Dependendo do grau de desova, os folículos estão mais ou menos vazios. As paredes do folículo estão rebentadas. Existem muitos espaços vazios entre e dentro dos folículos.

Desova (Fase VI)	Abundante tecido conjuntivo interfolicular. Resíduos ocasionais de espermatozoides ou oócitos reenviados.
---------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

O índice gonadal (IG) foi calculado usando o método proposto por Seed (1976):

$$IG = \frac{(\sum \text{Ind. cada estágio} * \text{Ranking do estágio})}{\text{Total ind. por mês}}$$

A cada estágio foi atribuído um número, período de repouso sexual = 0, início da gametogênese = 3, gametogênese avançada = 4, maduro = 5, desova parcial = 2 e desova = 1 (Matias *et al.*, 2013).

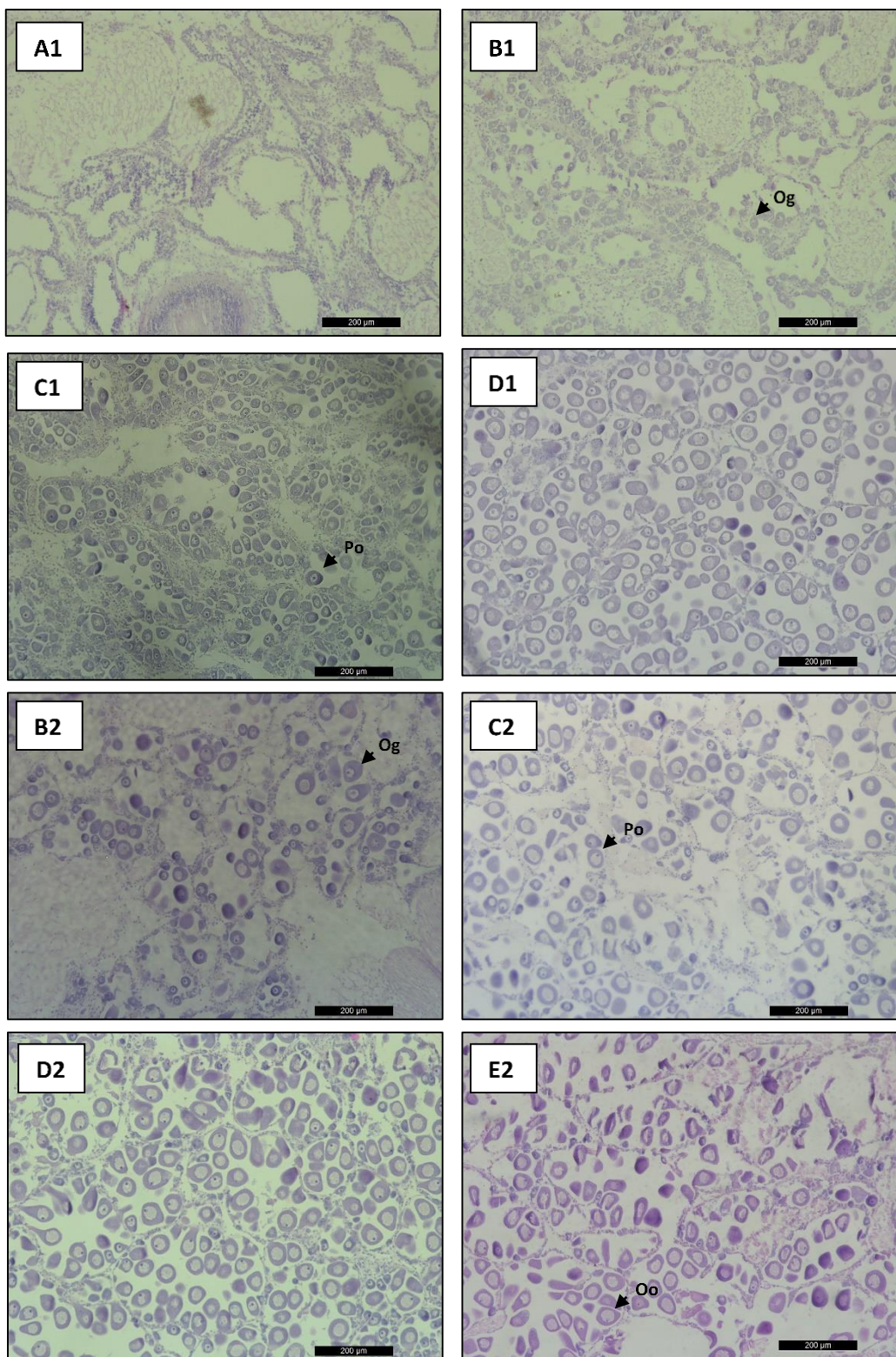


Figura 2.2. Fotomicrografias que mostram os diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas femininas de *Ruditapes decussatus* (A1-D1) e de *Ruditapes philippinarum* (B2-E2). A - Repouso sexual; B - Início da gametogénese (Og – Ovogónia); C - Gametogénese avançada, (Po - ovócito pedunculado); D - Maduro; E – Desova parcial (Oo – Oócito).

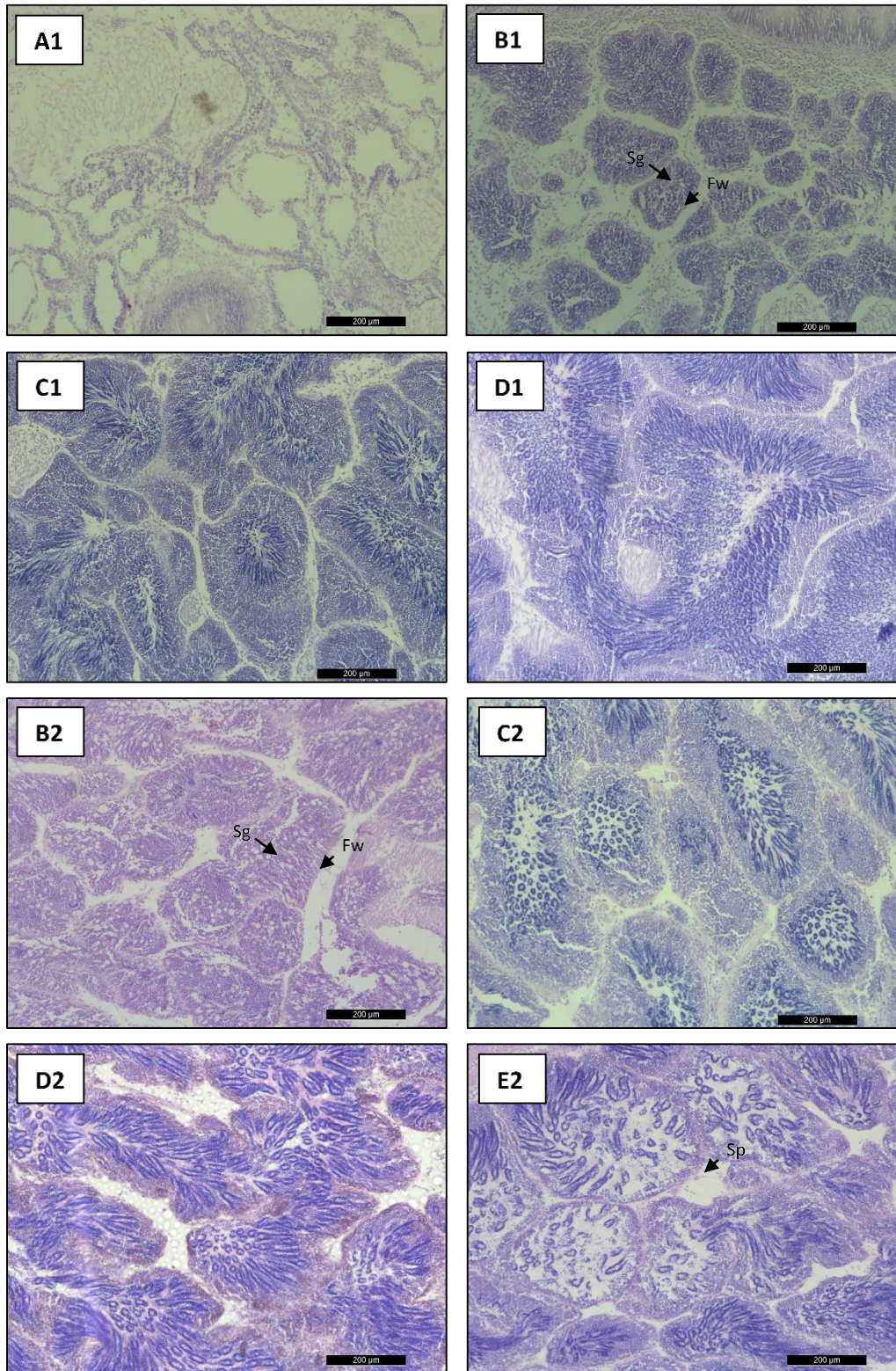


Figura 2.3. Fotomicrografias que mostram os diferentes estádios de desenvolvimento das gónadas masculinas de *Ruditapes decussatus* (A1-D1) e de *Ruditapes philippinarum* (B2-E2). A - Repouso sexual; B - Início da gametogénese (Sg – Espermatogónia; Fw – Parede folicular); C - Gametogénese avançada; D - Maduro; E – Desova parcial (Sp – Espermatozoide).

2.2.2.2. Índice de condição

Dos organismos recolhidos, foram selecionados ao acaso dez, de cada espécie e mês, para determinação, respetivamente, dos pesos secos da carne e da concha na estufa a 80°C durante 24 horas. De seguida, a parte edível das amêijoas foi colocada na mufla a 450°C durante 24 horas, determinando-se assim, o peso das cinzas. O peso da matéria orgânica foi determinado através da diferença entre o peso seco da carne menos cinzas. O índice de condição (IC) foi calculado de acordo com Walne & Mann (1975):

$$IC = \frac{\text{Peso seco da carne (g)} - \text{Peso cinzas (g)}}{\text{Peso seco da concha (g)}} * 100$$

2.2.2.3. Composição bioquímica

Dos indivíduos recolhidos, foram selecionados aleatoriamente dez, de cada espécie por mês, para se proceder à análise bioquímica, a parte edível das amêijoas foi congelada e armazenada a -20°C. Para cada indivíduo, determinou-se a proteína, através do método de Lowry modificado por Shakir *et al.* (1994), o teor de glicogénio, pelo homogeneizado seco (80°C durante 24 horas) usando a antrona como reagente (Viles & Silverman, 1949) e os lípidos totais foram extraídos do material homogeneizado fresco em clorofórmio/metanol (Folch *et al.*, 1957), sendo estimados por espectrofotometria após a adição de ácido sulfúrico concentrado (Marsh & Weinstein, 1966). Para todas as análises efetuadas, foram realizadas duas réplicas e os valores encontram-se expressos em % de matéria orgânica. O teor calórico de proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono nos tecidos foi calculado com recurso aos fatores, 17,9 KJ g⁻¹ (Beukema & De Bruin, 1979), 33 KJ g⁻¹ (Beninger e Lucas, 1984) e 17,2 KJ g⁻¹ (Paine, 1971), respetivamente.

2.3. Análise estatística

Com o objetivo de analisar o índice de condição, a composição bioquímica (proteínas, glicogénio e lípidos totais) e o índice gonadal, quando comparadas as espécies (*R. decussatus* e *R. philippinarum*) e os meses (março, abril, maio, junho, julho, agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro) em simultâneo, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com

dois fatores (Zar, 2010). Todos os requisitos inerentes à realização do método (ou seja, normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias) foram devidamente validados. Sempre que aplicável, o teste de comparações múltiplas *Diferença Menos Significativa* (DMS) foi realizado, por forma a comparar simultaneamente as espécies e os meses em estudo (Zar, 2010). Adicionalmente, determinou-se coeficiente de correlação linear de *Pearson*, por forma a determinar o grau de associação entre parâmetros (Zar, 2010) em análise (nomeadamente, TSM, Cl *a*, MOS, IG, IC, proteínas, glicogénio, lipídios totais e energia total). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de 5% (ou seja, sempre que *p-value* < 0,05). Quando aplicável, os resultados são apresentados na forma média ± desvio-padrão (DP). Todos os cálculos foram realizados com IBM SPSS Statistics 23.

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

3. Resultados

3.1. Temperatura da superfície do mar, clorofila *a* e matéria orgânica em suspensão

A evolução da temperatura mensal da superfície do mar (TSM) durante o período de amostragem na Lagoa de Óbidos (Figura 3.1) mostrou que os valores variaram entre os 12°C em dezembro e os 24°C em maio e agosto.

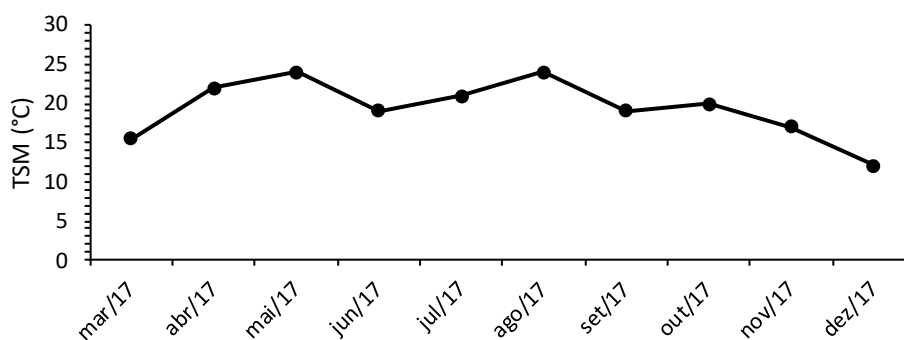


Figura 3.1. Valores mensais da temperatura da superfície do mar (TMS) na Lagoa de Óbidos de março a dezembro de 2017.

A figura 3.2, mostra a evolução da clorofila *a* durante o período de amostragem na Lagoa de Óbidos, apresentando valores mensais entre $0,62 \pm 0,54 \text{mgm}^{-3}$ e $25,39 \pm 0,38 \text{mgm}^{-3}$, sendo que o mês de novembro é o que apresenta menor quantidade de Cl *a* e o mês de junho é o que apresenta maior quantidade de Cl *a*.

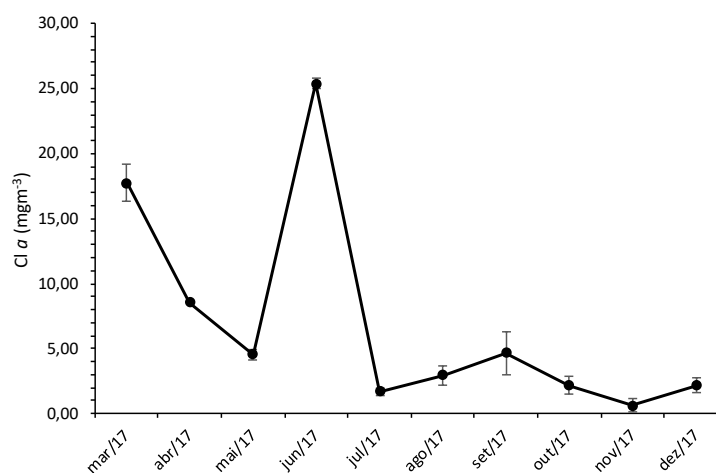


Figura 3.2. Valores mensais de clorofila *a* (Cl *a*) (média±DP, n=2) na Lagoa de Óbidos de março a dezembro de 2017.

A evolução da matéria orgânica em suspensão (MOS) durante o período de amostragem na Lagoa de Óbidos (Figura 3.3) mostra que os valores mensais variam entre os $4,3\pm 0,14\text{mgL}^{-1}$ e os $20,5\pm 0,85\text{mgL}^{-1}$, sendo que o valor mais baixo corresponde ao mês de março e o mais elevado ao mês de agosto.

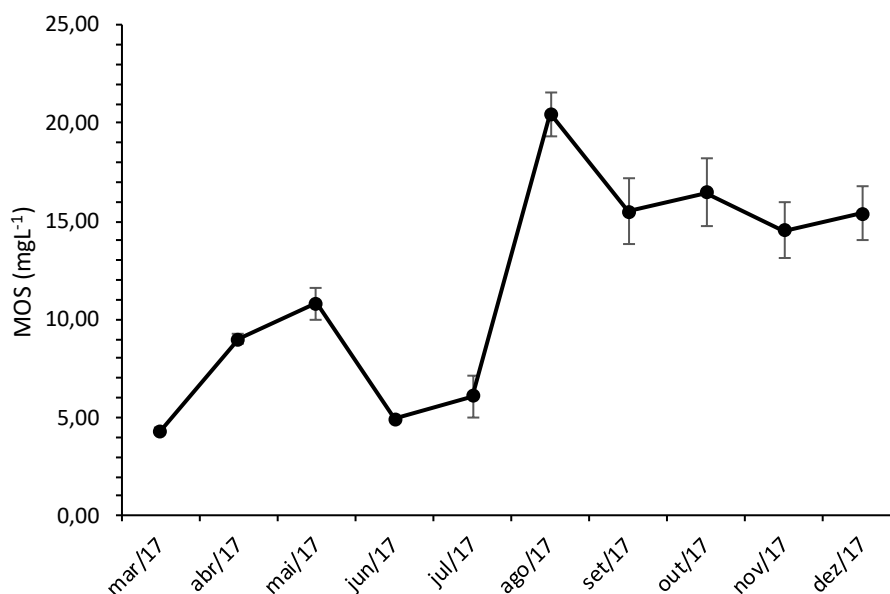


Figura 3.3. Valores mensais de matéria orgânica em suspensão (MOS) (média±DP, n=2) na Lagoa de Óbidos de março de 2017 a dezembro de 2017.

Relativamente à associação linear entre MOS e Cl *a*, esta evidenciou-se negativa e estatisticamente significativa ($r_{\text{Pearson}} = -0,688$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3). Para a temperatura, não se revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0,05$).

3.2. Ciclo gametogénico

No decorrer do estudo, não se observaram indivíduos hermafroditas, sendo os sexos claramente separados, em ambas as espécies. Os indivíduos, machos e fêmeas, das duas espécies estudadas, mostraram sincronia no desenvolvimento o gonadal. Contudo, é de constatar que nas fêmeas de *R. philippinarum*, as percentagens dos estádios mais avançados são superiores às observadas nas fêmeas de *R. decussatus* de forma semelhante durante os dez meses de amostragem, sendo que nos machos essa tendência não se observa (Figura 3.4). No início do estudo (março) apenas dois indivíduos da espécie *R. decussatus* se encontravam no período de repouso sexual (Fase I) e por isso aparece na figura 3.4 A e figura 3.4 B, já que são indeterminados, não sendo correto especificar um dos géneros. No mesmo mês (março), 70%

das fêmeas *R. decussatus* encontravam-se no início da gametogénesse (fase II) e 10% em gametogénesse avançada (fase III) (fêmeas *R. decussatus* IG=2,5) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1), já para *R. philippinarum* 40% das fêmeas encontravam-se no início da gametogénesse (fase II), 50% em gametogénesse avançada (fase III) e 10% maduras (fase IV) (fêmeas *R. philippinarum* IG=3,7) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em março, 60% dos machos *R. decussatus*, encontra-se no início da gametogénesse (fase II) e 20% em gametogénesse avançada (fase III) (machos *R. decussatus* IG=2,6), enquanto para *R. philippinarum* 60% dos machos encontravam-se no início da gametogénesse (fase II) e 40% em gametogénesse avançada (fase III) (machos *R. philippinarum* IG=3,4) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). No mês de abril, observou-se uma evolução na gametogénesse em ambas as espécies, com 60% das fêmeas *R. decussatus* início da gametogénesse (fase II) e 40% em gametogénesse avançada (fase III) (fêmeas *R. decussatus* IG=3,4) e com 10% das fêmeas no início da gametogénesse (fase II), 80% em gametogénesse avançada (fase III) e 10% maduras (fase IV) para *R. philippinarum* (fêmeas *R. philippinarum* IG=4) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). No que se refere aos machos, no mês de abril, 10% dos machos *R. decussatus*, encontra-se no início da gametogénesse (fase II) e 90% em gametogénesse avançada (fase III) (machos *R. decussatus* IG=3,9), enquanto para *R. philippinarum* 20% dos machos encontravam-se no início da gametogénesse (fase II) e 80% em gametogénesse avançada (fase III) (machos *R. philippinarum* IG=3,8) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). No mês de maio, 10 % das fêmeas *R. decussatus* estão no início da gametogénesse (fase II) 40% encontravam-se em gametogénesse avançada (fase III) e 50% maduras (fase IV) (fêmeas *R. decussatus* IG=4,4), e para *R. philippinarum* 60% das fêmeas encontravam-se em gametogénesse avançada (fase III), 30% maduras (fase IV) e 10% em desova parcial (fase V) (fêmeas *R. philippinarum* IG=4,1) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em maio, os machos de *R. decussatus*, 80% encontravam-se em gametogénesse avançada (fase III) e 20% maduros (fase IV) (machos *R. decussatus* IG=4,2), para *R. philippinarum* 10% dos machos encontravam-se no início da gametogénesse (fase II) e 90% em gametogénesse avançada (fase III) (machos *R. philippinarum* IG=3,9) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em junho, as fêmeas *R. decussatus* 20% encontravam-se em gametogénesse avançada (fase III) e 80% maduras (fase IV) (fêmeas *R. decussatus* IG=4,8) e para *R. philippinarum* 90% das fêmeas encontravam-se maduras (fase IV) e 10% em desova parcial (fase V) (fêmeas *R. philippinarum* IG=4,7) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em junho, os machos de *R. decussatus*, 30% estavam em gametogénesse avançada (fase III) e 70% maduros (fase IV) (machos *R. decussatus* IG=4,7), para *R.*

philippinarum 20% dos machos encontravam-se em gametogénese avançada (fase III), 70% maduros (fase IV) e 10% em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=4,5) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). No mês de julho, 70% das fêmeas *R. decussatus* encontravam-se maduras (fase IV) e 30% em desova parcial (fase V) (fêmeas *R. decussatus* IG=4,1) e para *R. philippinarum* 20% das fêmeas encontra-se madura (fase IV), 30% em desova parcial (fase V) e 50% em desova (fase VI) (fêmeas *R. philippinarum* IG=2,1) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em julho, a totalidade de machos de *R. decussatus* (100%) encontravam-se maduros (fase IV) (machos *R. decussatus* IG = 5) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1), para *R. philippinarum* 70% dos machos encontravam-se maduros (fase IV) e 30% em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=4,1) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em agosto, 40% das fêmeas de *R. decussatus* encontravam-se em desova parcial (fase V) e 60% em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=1,4), e para *R. philippinarum* 40% estavam em desova parcial (fase V) e 60% em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=1,4) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em agosto, os machos de *R. decussatus*, 20% encontravam-se maduros (fase IV) e 80% em desova parcial (fase V) (machos *R. decussatus* IG=2,6), para *R. philippinarum* 10% dos machos encontravam-se maduros (fase IV) e 90% em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=2,3) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). À semelhança do que ocorreu em março, nos meses de setembro, outubro, novembro e dezembro, existem indivíduos que se encontravam em repouso sexual (Fase I) e por isso aparece na figura 3.4 A e figura 3.4 B, já que são indeterminados, não sendo correto especificar um dos géneros. No mês de setembro, 50% dos indivíduos de *R. decussatus* encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 50% das fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,5) e para *R. philippinarum* 30% encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 70% das fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,7) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em setembro, os machos de *R. decussatus* encontravam-se 20% maduros (fase IV) e 30% em desova parcial (fase V) (machos *R. decussatus* IG=1,6), para *R. philippinarum* 70% dos machos estavam em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=1,4) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em outubro, 60% dos indivíduos de *R. decussatus* encontravam-se em repouso sexual (fase I) e os restantes 40% eram fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,4) e para *R. philippinarum* 50% encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 50% das fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,5) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em outubro, 40% dos machos de *R. decussatus* encontravam-se em desova parcial (fase V) (machos *R. decussatus* IG=0,8), para *R.*

philippinarum 50% dos machos encontravam-se em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=1) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). No mês de novembro, 80% dos indivíduos de *R. decussatus* encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 20% dos indivíduos eram fêmeas em fase de desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,2) e para *R. philippinarum* 80% encontra-se em repouso sexual (fase I) e 20% eram fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,2) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em novembro, os machos de *R. decussatus*, 20% encontravam-se em desova parcial (fase V) (machos *R. decussatus* IG=0,4), para *R. philippinarum* 20% dos machos encontram-se em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=0,4) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em dezembro, verificou-se a ocorrência de 90% dos indivíduos de *R. decussatus* em repouso sexual (fase I) e 10% eram fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,1), e para *R. philippinarum* 70% encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 30% eram fêmeas em desova (fase VI) (fêmeas *R. decussatus* IG=0,3) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1). Em dezembro, 90% dos indivíduos de *R. decussatus* encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 10% eram fêmeas em desova parcial (fase V) (machos *R. decussatus* IG=0,2), para *R. philippinarum* 70% dos indivíduos encontravam-se em repouso sexual (fase I) e 30% eram machos em desova parcial (fase V) (machos *R. philippinarum* IG=0,6) (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1).

Comparando as duas espécies, *R. philippinarum* apresentou um desenvolvimento gonadal mais avançado do que *R. decussatus*, já que no início do estudo (março) não se encontrou nenhum indivíduo em fase I, que corresponde ao índice gonadal zero, em abril, apresentou uma maior percentagem de indivíduos em gametogênese avançada (fase III), apresentando para as fêmeas a fase IV, em maio verificou-se para *R. philippinarum* que 10% das fêmeas se encontram em fase V (desova parcial), não sendo observada esta fase na *R. decussatus* e em junho, para *R. philippinarum*, foram observados indivíduos (fêmeas e machos) na fase V, que corresponde ao índice gonadal dois, não tendo sido observada esta fase na *R. decussatus*. No mês de julho *R. philippinarum* apresentou 50% das fêmeas em desova (fase VI), sendo que esta fase não se observou em *R. decussatus*, relativamente aos machos verifica-se que enquanto *R. decussatus* apresentou a totalidade dos seus machos maduros, *R. philippinarum* apresentou 30% dos machos em desova parcial (fase V). Em agosto, as fêmeas de ambas as espécies apresentaram a mesma percentagem de indivíduos em iguais fases de desenvolvimento, já nos machos e estando na mesma fase, *R. philippinarum* apresentou maior percentagem de machos em desova parcial. No mês de setembro observou-se, para ambos os sexos, que as percentagens

das fases mais avançadas são superiores em *R. philippinarum*. Em outubro verificou-se que, em ambos os sexos, *R. decussatus* apresentou 60% dos indivíduos em repouso sexual (fase I) e os restantes indivíduos em desova parcial (machos) e desova (fêmeas), já para *R. philippinarum*, observou-se que 50% dos indivíduos se encontravam em repouso sexual, e os restantes 50% em desova parcial (machos) e desova (fêmeas). Para os meses de novembro e dezembro, foi possível observar-se que a maior parte dos indivíduos das duas espécies e sexos, se encontravam maioritariamente em repouso sexual. (Figura 3.4 e Figura 3.5; Tabela 3.1).

Durante os dez meses de amostragem registou-se uma frequência de 30% de fêmeas e machos em fase I, 14% de fêmeas e 7% de machos em fase II, 11% de fêmeas e 22% de machos em fase III, 20% de fêmeas e 23% de machos em fase IV, 7% de fêmeas e 18% de machos em fase V e 18% de fêmeas em fase VI para *R. decussatus*. Para *R. philippinarum* observou-se 23% de fêmeas e machos em fase I, 5% de fêmeas e 9% de machos em fase II, 19% de fêmeas e 23% de machos em fase III, 16% de fêmeas e 15% de machos em fase IV, 9% de fêmeas e 30% de machos em fase V e 28% de fêmeas em fase VI (Figura 3.4).

Para *R. decussatus* verifica-se que a correlação linear entre o índice gonadal e a MOS é negativa e estatisticamente significativa ($r_{\text{Pearson}} = -0,721$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3). Adicionalmente, para *R. philippinarum* existe correlação positiva e estatisticamente significativa entre o índice gonadal e CI a ($r_{\text{Pearson}} = 0,691$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3) e o índice de condição ($r_{\text{Pearson}} = 0,715$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3), existindo uma correlação negativa e estatisticamente significativa entre índice gonadal e MOS ($r_{\text{Pearson}} = -0,776$; $p\text{-value} < 0,01$; Tabela 3.3), lípidos totais ($r_{\text{Pearson}} = -0,794$; $p\text{-value} < 0,01$; Tabela 3.3) e energia total ($r_{\text{Pearson}} = -0,634$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3).

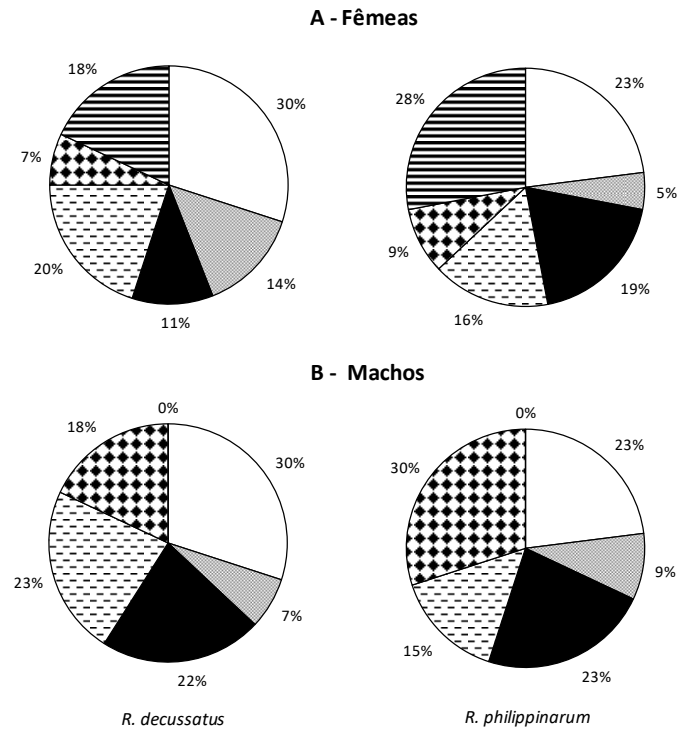
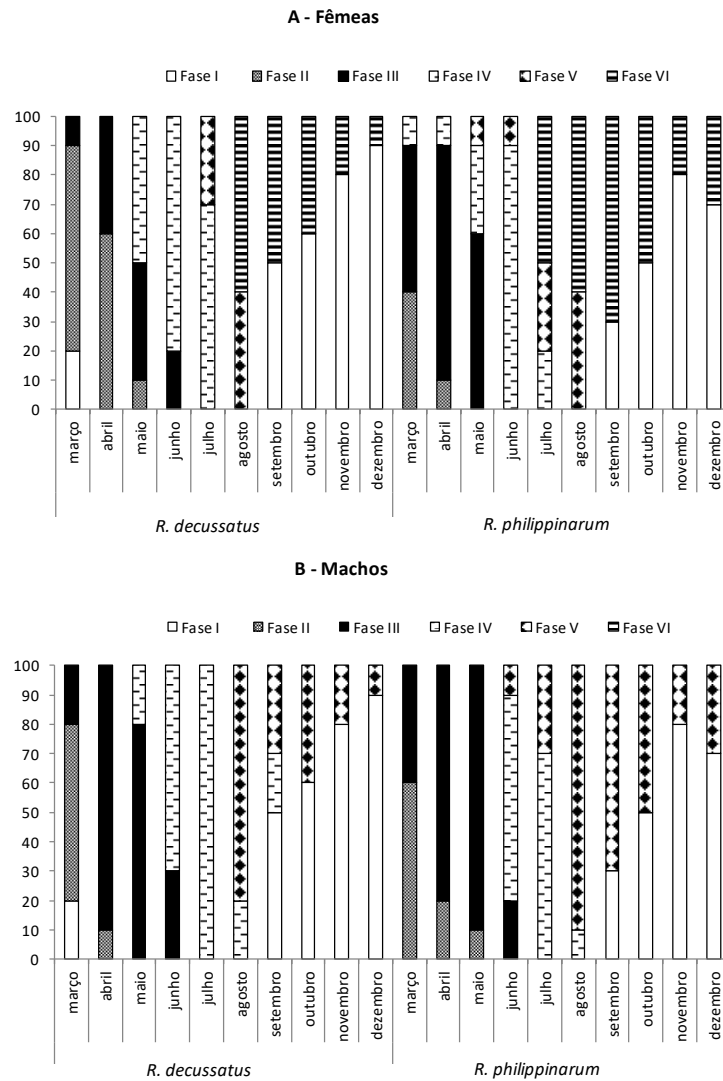


Figura 3.4. Variações mensais (gráfico de barras) e frequências dos dez meses de estudo (gráfico circular) do desenvolvimento gonadal das populações de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017. Fêmeas (A) e machos (B).

O índice gonadal e o desenvolvimento gonadal apresentaram o mesmo padrão em cada uma das espécies em estudo. Apesar do desenvolvimento gonadal em *R. philippinarum* ser mais avançado, no início do estudo (março) e no fim do estudo (dezembro), as duas espécies no mês de junho, agosto, setembro e novembro apresentaram aproximadamente a mesma média de índice gonadal, a maior diferença verificada entre as espécies, foi no mês de julho, onde *R. decussatus* apresentou um maior índice gonadal (Figura 3.5).

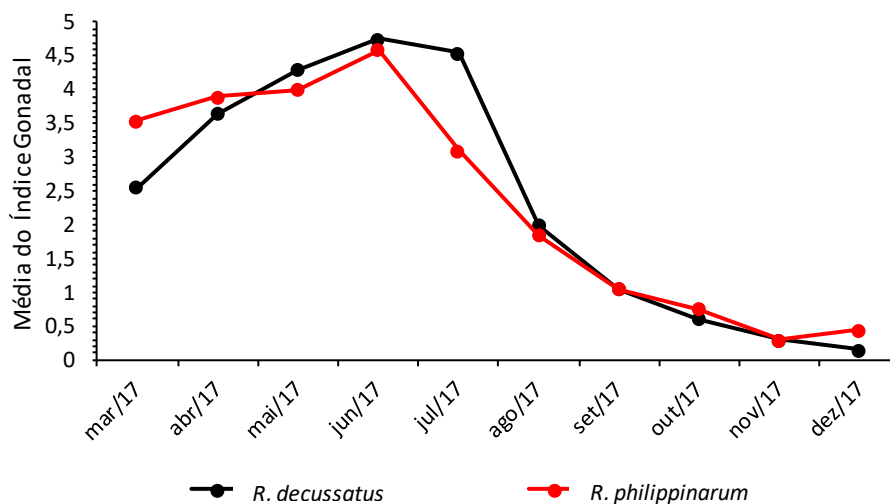


Figura 3.5. Variações mensais do índice gonadal (IG) (média, n=20) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

Tabela 3.1. Variações mensais no índice gonadal (IG) (média, n=10) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum*, fêmeas e machos, da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

IG		março	abril	maio	junho	julho	Agosto	setembro	outubro	novembro	dezembro
<i>R. decussatus</i>	Fêmeas	2,5	3,4	4,4	4,8	4,1	1,4	0,5	0,4	0,2	0,1
	Machos	2,6	3,9	4,2	4,7	5	2,6	1,6	0,8	0,4	0,2
<i>R. philippinarum</i>	Fêmeas	3,7	4	4,1	4,7	2,1	1,4	0,7	0,5	0,2	0,3
	Machos	3,4	3,8	3,9	4,5	4,1	2,3	1,4	1	0,4	0,6

3.3. Índice de Condição

Durante o período de amostragem, os valores do índice de condição para *R. decussatus* variaram entre $5,89 \pm 1,32$ em outubro e $9,19 \pm 0,67$ em agosto, já para *R. philippinarum* os valores variaram entre $4,05 \pm 0,47$ em outubro e $7,24 \pm 3,32$ em maio (Figura 3.6). De salientar, que as duas espécies apresentaram a mesma tendência para o IC, sendo que *R. decussatus* apresentou sempre valores superiores a *R. philippinarum* (Figura 3.6).

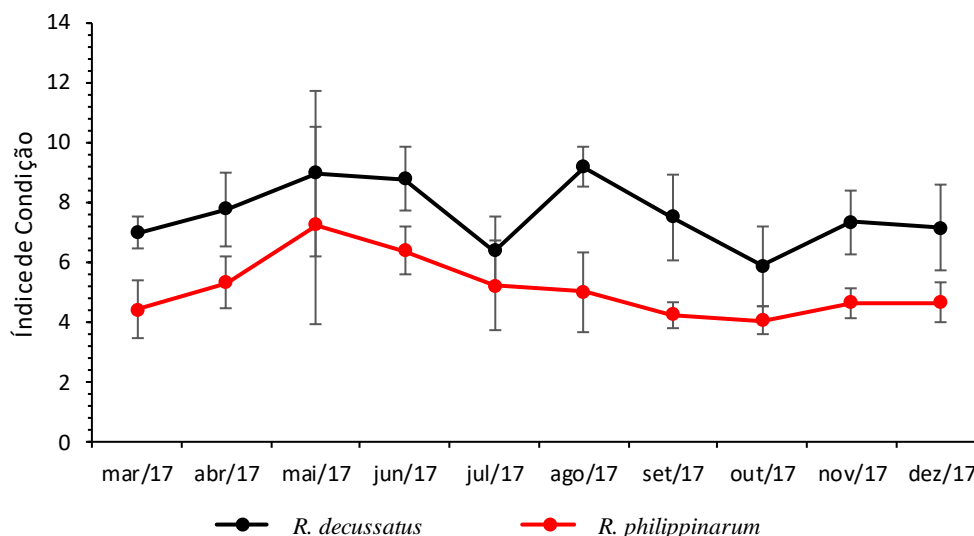


Figura 3.6. Variações mensais do índice de condição (média \pm DP, n=10) das populações de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* da Lagoa de Óbidos, de março a dezembro de 2017.

Os resultados obtidos para o índice de condição evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os meses da amostragem (ANOVA, $F_{(9)} = 9,914$; $p\text{-value} < 0,05$), bem como quando comparadas ambas as espécies (ANOVA, $F_{(1)} = 162,837$; $p\text{-value} < 0,05$).

No que respeita à correlação linear para *R. decussatus*, não existe correlação do índice de condição com nenhum dos outros parâmetros ($p\text{-value} > 0,05$; Tabela 3.3). Relativamente à *R. philippinarum* o índice de condição apresenta uma correlação positiva e estatisticamente significativa com o glicogénio ($r_{\text{Pearson}} = 0,797$; $p\text{-value} < 0,01$; Tabela 3.3) e com o índice gonadal ($r_{\text{Pearson}} = 0,715$; $p\text{-value} < 0,05$; Tabela 3.3). Para as restantes associações estudadas, estas não se revelaram estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0,05$). Para ambas as espécies de bivalves em estudo, no mês em que se observou o maior valor para o índice de condição,

maio, é aquele em que a fase III do desenvolvimento gonadal (gametogénese avançada) apresentou uma maior percentagem, face às restantes fases (Figura 3.4).

3.4. Composição bioquímica

O constituinte do tecido seco predominante das amêijoas, de ambas as espécies, foram as proteínas, seguidas do glicogénio e dos lípidos totais (Tabela 3.2). Em ambas as espécies, o valor mais elevado de proteína registou-se no mês de novembro ($563,98 \pm 179,07 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW, *R. decussatus* e $1012,50 \pm 230,45 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW, *R. philippinarum*), e o menor em junho ($235,96 \pm 77,55 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* e em abril ($237,70 \pm 21,63 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) para *R. philippinarum* (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Valores médios (\pm DP) de proteínas, glicogénio, lípidos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) e energia total (kJ mg^{-1} AFDW) de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* durante o período de amostragem.

Espécie	Mês	Proteínas	Glicogénio	Lípidos Totais	Energia Total
		($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW)	($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW)	($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW)	(kJ mg^{-1} AFDW)
<i>R. decussatus</i>	março	308,82 \pm 104,90	90,36 \pm 33,83	41,32 \pm 15,20	8,45
	abril	237,55 \pm 76,68	71,80 \pm 34,33	44,98 \pm 6,67	6,97
	maio	319,81 \pm 91,74	82,00 \pm 26,58	68,84 \pm 13,81	9,41
	junho	235,96 \pm 77,55	81,38 \pm 48,56	38,91 \pm 24,11	6,91
	julho	447,40 \pm 27,16	58,96 \pm 5,88	45,35 \pm 8,31	10,52
	agosto	456,60 \pm 162,43	65,12 \pm 7,81	51,17 \pm 6,71	10,98
	setembro	250,99 \pm 49,04	56,62 \pm 39,66	40,71 \pm 16,76	6,81
	outubro	382,07 \pm 60,86	44,20 \pm 21,71	58,74 \pm 22,31	9,54
	novembro	563,98 \pm 179,07	125,36 \pm 21,79	60,43 \pm 30,47	14,25
	dezembro	392,97 \pm 91,05	131,98 \pm 22,07	50,50 \pm 10,80	10,97
<i>R. philippinarum</i>	março	590,45 \pm 157,91	44,71 \pm 19,45	40,51 \pm 22,07	12,67
	abril	237,70 \pm 21,63	79,63 \pm 39,48	36,02 \pm 6,96	6,81
	maio	360,09 \pm 84,85	87,31 \pm 43,82	54,35 \pm 13,69	9,74
	junho	269,39 \pm 55,55	102,10 \pm 35,75	25,91 \pm 7,11	7,43

julho	415,38±132,36	55,18±7,27	50,62±10,90	10,05
agosto	519,58±85,08	58,77±4,34	55,46±7,45	12,14
setembro	370,37±168,64	18,08±10,67	51,48±17,45	8,84
outubro	541,38±169,34	31,93±29,27	97,09±42,97	13,44
novembro	1012,50±230,45	75,71±32,29	95,51±36,54	22,58
dezembro	493,18±87,45	60,75±38,19	60,91±18,46	11,88

No que diz respeito ao teor de proteínas, este apresentou diferenças estatisticamente significativas, quando comparados as espécies (ANOVA, $F_{(1)} = 101,124$; $p\text{-value} < 0,05$), os meses de amostragem (ANOVA, $F_{(9)} = 74,263$; $p\text{-value} < 0,05$) e os meses e as espécies em simultâneo, havendo por isso uma interação significativa entre ambos os fatores (ANOVA, $F_{(9)} = 15,498$; $p\text{-value} < 0,05$).

No que respeita a *R. decussatus* a proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW), esta apresenta uma correlação negativa e estatisticamente significativa com a Cl *a* ($r_{\text{Pearson}} = -0,637$; $p\text{-value} < 0,05$) e uma correlação positiva e estatisticamente significativa com a energia total (KJ mg^{-1} AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,972$; $p\text{-value} < 0,01$) (Tabela 3.3). Para a espécie *R. philippinarum* a proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) apresenta uma correlação positiva e estatisticamente significativa com os lípidos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,742$; $p\text{-value} < 0,05$) e com a energia total (KJ mg^{-1} AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,992$; $p\text{-value} < 0,01$) (Tabela 3.3). Não foram detetadas correlações estatisticamente significativas para as restantes associações em análise ($p\text{-value} > 0,05$).

O valor mais elevado de glicogénio para *R. decussatus* registou-se no mês de dezembro ($131,98 \pm 22,07 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) enquanto para *R. philippinarum*, este registou-se no mês de junho ($102,10 \pm 35,75 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW). O menor foi observado em outubro ($44,20 \pm 21,71 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* e em setembro ($18,08 \pm 10,67 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) para *R. philippinarum* (Tabela 3.2).

Para o teor de glicogénio, o padrão observado é similar ao anterior. Assim, os resultados alcançados demonstram a existência de diferenças estatisticamente significativas quando comparados as espécies (ANOVA, $F_{(1)} = 41,843$; $p\text{-value} < 0,05$), os meses de amostragem (ANOVA, $F_{(9)} = 24,165$; $p\text{-value} < 0,05$) e quando comparados os meses de amostragem e as espécie em simultâneo (ANOVA; $F_{(9)} = 10,775$; $p\text{-value} < 0,05$). Ao observar os resultados para cada espécie, verifica-se que os resultados acompanham a tendência anterior.

Em *R. decussatus* o glicogénio ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) apresenta uma correlação negativa e estatisticamente significativa com a TMS ($r_{\text{Pearson}} = -0,677$; $p\text{-value} < 0,05$). Para a espécie *R. philippinarum* o glicogénio ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) apresenta uma correlação positiva e estatisticamente significativa com índice de condição ($r_{\text{Pearson}} = 0,797$; $p\text{-value} < 0,01$) (Tabela 3.3). Não foram detetadas correlações estatisticamente significativas para as restantes associações em análise ($p\text{-value} > 0,05$).

R. decussatus apresentou maior teor de lípidos totais no mês de maio ($68,84 \pm 13,81 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW) enquanto para *R. philippinarum*, este registou-se no mês de outubro ($97,09 \pm 42,97 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW). O menor registo foi observado em junho para ambas as espécies ($38,91 \pm 24,11 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW, *R. decussatus* e $25,91 \pm 7,11 \mu\text{gmg}^{-1}$ AFDW, *R. philippinarum*) (Tabela 3.2).

No que concerne ao teor de lípidos totais, este apresenta diferenças estatisticamente significativas entre ambas as espécies (ANOVA; $F_{(1)} = 10,766$; $p\text{-value} < 0,05$), entre os meses de amostragem (ANOVA; $F_{(9)} = 23,863$; $p\text{-value} < 0,05$), e quando comparados os meses de amostragem e as espécie em simultâneo (ANOVA; $F_{(9)} = 9,073$; $p\text{-value} < 0,05$).

Os lípidos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) apresentam, para *R. philippinarum* uma correlação negativa e estatisticamente significativa com a Cl a ($r_{\text{Pearson}} = -0,691$; $p\text{-value} < 0,05$), correlação negativa e estatisticamente significativa com o índice gonadal ($r_{\text{Pearson}} = -0,794$; $p\text{-value} < 0,01$), correlação positiva e estatisticamente significativa com as proteínas ($r_{\text{Pearson}} = 0,742$; $p\text{-value} < 0,05$) e uma correlação positiva e estatisticamente significativa com a energia total (KJ mg^{-1} AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,790$; $p\text{-value} < 0,01$) (Tabela 3.3). Relativamente à *R. decussatus*, não foram detetadas correlações estatisticamente significativas. Assim como, para as restantes associações em análise não foram detetadas correlações estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0,05$).

A energia total, para ambas as espécies, é maior no mês de novembro ($14,25 \text{ KJ mg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* e ($22,58 \text{ KJ mg}^{-1}$ AFDW) para *R. philippinarum*, e o menor em setembro ($6,81 \text{ KJ mg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* e em abril ($6,81 \text{ KJ mg}^{-1}$ AFDW) para *R. philippinarum* (Tabela 3.2).

Para os resultados obtidos para a energia total, verificou-se que esta apresenta diferenças estatisticamente significativas entre ambas as espécies (ANOVA; $F_{(1)} = 67,189$; $p\text{-value} < 0,05$), entre os meses de amostragem (ANOVA; $F_{(9)} = 74,675$; $p\text{-value} < 0,05$), e quando comparados os meses de amostragem e as espécie em simultâneo (ANOVA; $F_{(9)} = 12,381$; $p\text{-value} < 0,05$).

A energia total (KJ mg^{-1} AFDW) apresenta, para *R. decussatus* uma correlação positiva e estatisticamente significativa com o teor de proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,972$; $p\text{-value} < 0,01$). Relativamente à *R. philippinarum*, existe uma correlação negativa e estatisticamente

significativa com o índice gonadal ($r_{\text{Pearson}} = -0,634$; $p\text{-value} < 0,05$), uma correlação positiva e estatisticamente significativa com o teor de proteína ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,992$; $p\text{-value} < 0,01$) e uma correlação positiva e estatisticamente significativa com os lípidos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) ($r_{\text{Pearson}} = 0,790$; $p\text{-value} < 0,01$) (Tabela 3.3). Para as restantes associações em análise não foram detetadas correlações estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0,05$).

Tabela 3.3. Resultados da correlação linear de *Pearson* entre os parâmetros estudados de *Ruditapes decussatus* e *Ruditapes philippinarum* durante o período de amostragem (r - coeficiente de correlação linear de *Pearson*; *p-value*; ns – não significativa); * a correlação é significativa no nível 0,05 (bilateral) e ** a correlação é significativa no nível 0,01 (bilateral).

Espécie	TMS	Cl a	MOS	IG	IC	Proteínas	Glicogénio	Lípidos Totais	Energia Total
<i>R. decussatus</i>	TSM	ns	ns	ns	ns	ns	r = -0,677*	ns	ns
	Cl a		r = -0,688*	ns	ns	r = -0,637*	ns	ns	ns
	MOS			r = -0,721*	ns	ns	ns	ns	ns
	IG				ns	ns	ns	ns	ns
	IC					ns	ns	ns	ns
	Proteínas						ns	ns	r = 0,972**
	Glicogénio							ns	ns
	Lípidos Totais								ns

		Energia Total								
Espécie		TSM	Cl a	MOS	IG	IC	Proteínas	Glicogénio	Lípidos Totais	Energia Total
<i>R. philippinarum</i>	TSM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Cl a		r = -0,688*	r = 0,691*	ns	ns	ns	ns	r = 0,691*	ns
	MOS			r = -0,776**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	IG				r = 0,715*	ns	ns	ns	r = -0,794**	r = -0,634*
	IC					ns	r = 0,797**	ns	ns	ns
	Proteínas						ns	r = 0,742*	ns	r = 0,992**
	Glicogénio							ns	ns	ns
	Lípidos Totais									r = 0,790**
	Energia Total									

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO

4. Discussão

O ciclo reprodutivo dos bivalves é influenciado pelas condições do meio ambiente, especialmente pela qualidade e disponibilidade de alimento e temperatura (Chávez-Villalba *et al.*, 2003; Matias *et al.*, 2013). A localização geográfica de uma espécie é referida em diversos estudos como sendo fundamental no controlo da gametogénese e da desova, uma vez que associada a esta encontram-se os fatores como a temperatura, que afeta, indiretamente, a disponibilidade de alimento (Gribben *et al.*, 2004; Meneghetti *et al.*, 2004; Matias *et al.*, 2013). O presente estudo decorreu num período de dez meses (março a dezembro de 2017), sendo possível verificar-se a variação da sazonalidade expectável para regiões de climas temperados relativamente à temperatura da superfície do mar, clorofila *a* e matéria orgânica em suspensão. Assim, a temperatura foi mais elevada nos meses de maio e agosto (24°C), e mais baixo, dezembro (12°C). Relativamente à Cl *a* e à MOS, verifica-se que os valores mais elevados de clorofila *a* correspondem aos meses de março e junho (17,71 e 25,39mgm⁻³, respetivamente), já o valor mais elevado de MOS corresponde ao mês de agosto (20,47mgL⁻¹), entre estes dois fatores existe uma correlação linear negativa, uma vez que quando um aumenta, o outro diminui (Figura 3.2; Figura 3.3). A disponibilidade de alimento depende da Cl *a* e da MOS, o que consequentemente influencia a gametogénese das duas espécies, verificando-se correlação linear negativa, para as duas espécies, entre a MOS e o índice gonadal, o que significa que quando um fator aumenta, o outro diminui. *R. philippinarum*, apresenta ainda uma correlação linear positiva entre a Cl *a* e o índice gonadal (Xie & Burnell, 1994; Joaquim *et al.*, 2008a).

Segundo Machado (2015) o ciclo reprodutivo de *R. decussatus* tem início no mês de maio, onde os indivíduos se encontram maduros, e a fase de desova inicia-se no mês de julho, o que também foi observado por outros autores (Xie & Burnell, 1994; Joaquim *et al.*, 2008a), o que pode ser verificado no presente estudo uma vez que, relativamente ao mês em que os indivíduos se encontram maduros, este corrobora os dados supracitados, assim como ao mês em que os organismos entram em desova. Neste estudo verificou-se que no primeiro mês de estudo (março) os indivíduos apresentaram-se maioritariamente nas fases de início da gametogénese e gametogénese avançada, nos meses de junho e julho os indivíduos encontravam-se nas fases, maduros e em desova parcial, respetivamente, já no final do estudo (novembro e dezembro) os indivíduos apresentavam-se nas fases, desova parcial e desova, e verificou-se a ocorrência de indivíduos em fase I, repouso sexual. Estes resultados vão de encontro a estudos realizados

noutras populações, de *R. decussatus* no mesmo local, Lagoa de Óbidos (Machado, 2015) e seguem padrões semelhantes em locais diferentes, como na Galiza (Espanha), na Ria de Aveiro e Ria Formosa (Portugal) (Ojea *et al.*, 2004; Matias *et al.*, 2013). *R. philippinarum*, apresenta um ciclo reprodutivo semelhante a *R. decussatus*, no entanto apresenta sempre uma maior percentagem de indivíduos em fases mais desenvolvidas no mesmo período de tempo, indo ao encontro do que foi verificado na população do Estuário do Tejo (Moura *et al.*, 2017b).

Segundo Moura *et al.* (2017b), consideram-se indivíduos maduros a partir da fase III, no entanto para o presente estudo a escala utilizada, para as duas espécies, está de acordo com Delgado & Pérez-Camacho (2005) e adaptada por Matias *et al.* (2013), refere que os indivíduos se encontram maduros apenas na fase IV esta fase ocorreu entre abril e maio. Nos meses de abril, maio e junho é quando se observa uma maior percentagem de indivíduos, em ambas as espécies, em gametogénese avançada (fase III) e maduros (fase IV).

O presente estudo, entra em concordância com o trabalho realizado por Moura *et al.* (2017b) para a população de *R. philippinarum* (Estuário do Tejo) e com o trabalho de Machado (2015) para a população *R. decussatus* (Lagoa de Óbidos), uma vez que para ambas as espécies se verificou uma maior percentagem de indivíduos na fase III, seguindo-se da fase IV, nos meses de abril, maio e junho, comparativamente às restantes fases (Figura 3.4). No mês de julho as fêmeas, de ambas as espécies entraram em desova parcial (fase V), no entanto em *R. philippinarum* verificou-se a existência de indivíduos já em desova (fase VI), os machos de *R. philippinarum* também já se encontravam em desova parcial, enquanto que os machos de *R. decussatus* apenas alcançaram esta fase no mês seguinte (agosto) (Figura 3.4). Em agosto, é quando ambas as espécies, e ambos os sexos, se encontravam em desova parcial (fase V) e desova (fase VI), no entanto *R. philippinarum*, quando comparada com *R. decussatus* apresentou, sempre, uma maior percentagem de indivíduos na fase mais desenvolvida. A partir do mês de setembro, verificou-se, para ambas as espécies, a entrada de indivíduos em repouso sexual (fase I), onde não é possível determinar se os indivíduos são fêmeas ou machos, esta percentagem aumentou gradualmente até ao mês de dezembro (Figura 3.4). Contudo, com a exceção do mês de novembro, onde as percentagens das duas espécies se igualam, observa-se que *R. decussatus* apresentou uma percentagem de indivíduos em repouso sexual superior à registada em *R. philippinarum* nos meses de setembro a dezembro (Figura 3.4). Pelo estudo realizado por Moura *et al.* (2017b), abril o mês onde se verifica o fim do repouso sexual no ciclo

gametogénico de *R. philippinarum*, o mesmo não se observa no presente estudo, pelo que em abril, *R. philippinarum*, apresentou indivíduos (fêmeas e machos) no início da gametogénese e em gametogénese avançada (Figura 3.4). No entanto, *R. decussatus*, no mesmo mês (março) ainda apresentou indivíduos em fase I (repouso sexual), o que significa que no mesmo período de tempo (mês de março), *R. philippinarum* encontrava-se num estágio de maturação mais avançado quando comparada com *R. decussatus*.

Relativamente às frequências referentes aos dez meses de amostragem, quando comparadas as duas espécies em estudo entre si, verifica-se que os indivíduos de *R. philippinarum*, apresentaram percentagens superiores das fases mais avançadas de desenvolvimento (V e VI), no entanto verifica-se que para ambos os sexos, a percentagem de indivíduos em fase IV foi superior em *R. decussatus* (Figura 3.4). *R. philippinarum*, comparando as frequências dos dez meses de estudo, para cada uma das fases com as frequências anuais obtidas por Moura *et al.* (2017b), existe uma discrepância, pois as fases mais frequentes neste estudo são a fase de desova parcial e a desova, em machos e fêmeas, respetivamente, e no estudo em comparação é a fase de desova parcial para ambos os sexos.

Matias *et al* (2013) (população de *R. decussatus* na Ria de Aveiro e na Ria Formosa) defende que os meses anteriores ao início do ciclo gametogénico, os valores da Cl *a* e a MOS encontram-se mais elevados, tal como é possível verificar no estudo de Machado (2015) (população *R. decussatus* na Lagoa de Óbidos) o que leva a crer que as amêijoas tiram partido da disponibilidade de alimento para acumularem reservas para o início do ciclo gametogénico, o que, os resultados obtidos neste estudo corroboram os anteriores. No presente estudo, pressupõe-se um período de repouso sexual de, aproximadamente, oito meses (setembro a março). Apesar de, no estudo efetuado, não se amostrarem indivíduos nos meses de janeiro e fevereiro, pela observação de indivíduos em fase I, no mês de março em *R. decussatus*, pode considerar-se que o período de repouso sexual ocorre de setembro, onde já se observa a fase I, em ambas as espécies, a março, contudo para *R. philippinarum* apesar dos indivíduos iniciarem o período de repouso no mês de setembro, no mês de março não foram observados indivíduos em fase I. Assim, a afirmação supracitada no que se refere à Cl *a*, é verificada, pois o mês de março apresentou um valor elevado de Cl *a*, o que coincide com o início das fases II e III dos organismos.

O sincronismo do desenvolvimento gonadal entre as fêmeas e os machos é fundamental para o sucesso reprodutivo das espécies, uma vez que oócitos e esperma são libertados, simultaneamente, na coluna de água durante a desova, o que aumenta as probabilidades de fertilização (Joaquim *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2013). Neste estudo, verifica-se a sincronia entre fêmeas e machos de ambas as espécies, o que também acontece no estudo de Machado (2015) e no estudo de Moura *et al.* (2017b).

Com base na avaliação dos valores de índice gonadal (Tabela 3.1) diferenciados entre fêmeas e machos, bem como a avaliação do gráfico da figura 3.5, observa-se que os valores de IG para *R. decussatus* referentes aos meses de março, abril, outubro e dezembro são inferiores quando comparados com os valores obtidos para os mesmos meses em *R. philippinarum*, uma vez que para os meses referidos, quando comparadas as espécies, *R. decussatus*, apresenta uma percentagem de indivíduos em fases menos desenvolvidas do que *R. philippinarum*, o que corresponde ao início do período de desova dos indivíduos de *R. philippinarum*. Nos meses de maio, junho, julho e agosto, *R. decussatus* apresenta valores superiores quando comparados com *R. philippinarum*, pois os meses referidos, quando comparadas as espécies, *R. decussatus*, apresenta uma percentagem de indivíduos em fases mais desenvolvidas do que *R. philippinarum*, o que corresponde ao início do período de desova dos indivíduos de *R. decussatus* (Tabela 3.1; Figura 3.5). Para os meses de setembro e novembro, verifica-se um índice gonadal coincidente, quando comparadas as duas espécies em estudo, uma vez que, para os meses referidos, quando comparadas as espécies, ambas, apresentam uma percentagem de indivíduos nas mesmas fases de desenvolvimento (Tabela 3.1; Figura 3.5). Quando se realiza a comparação dos dados obtidos para *R. decussatus* com o estudo de Machado (2015) observa-se que os valores de índice gonadal (Lagoa de Óbidos 2015) os valores de uma forma geral não são coincidentes com o presente estudo, para os meses de março, abril e maio, o IG observado foi inferior, enquanto nos meses de junho e julho verificou-se o inverso, nos restantes meses observaram-se pequenas variações, observa-se ainda que no presente estudo os indivíduos entram em desova no mês de agosto, enquanto que no estudo de Machado (2015), estes entram em desova um mês antes. Relativamente à *R. philippinarum*, Moura *et al.* (2017b) não apresenta dados absolutos, mas analisando o gráfico referente à variação mensal da média do índice gonadal (fêmeas e machos) a tendência dos dados em estudo não é a mesma, quando comparados com os dados de Moura *et al.* (2017b). De uma forma geral verifica-se que de março a julho e o mês de dezembro, os dados do gráfico apresentado por Moura *et al.* (2017b),

são inferiores aos registados no presente estudo, já para os meses de agosto a novembro verifica-se o contrário.

Quando comparados os valores do índice gonadal com os estádios de desenvolvimento gonadal, observa-se que apesar da *R. philippinarum* ter frequentemente, quando comparados os resultados do mesmo mês, maiores percentagens de indivíduos em fases de desenvolvimento mais avançadas, os seus valores médios de índice gonadal são ligeiramente inferiores aos obtidos por *R. decussatus*, nomeadamente nos meses de maio, junho, julho e agosto. Estes resultados aparentam demonstrar que as duas espécies se apresentam em estádios de maturação muito semelhantes.

Considera-se que o índice de condição se reflete na atividade reprodutiva, o que é comprovado no presente estudo, para *R. philippinarum*, uma vez que o índice de condição aumenta durante a gametogénese e diminui durante o período de desova, o que é reforçado através da correlação do índice de condição com o índice gonadal, havendo uma correlação positiva (ANOVA, $p\text{-value} < 0,05$) (Tabela 3.3). Apesar de para *R. decussatus* esta correlação não se verificar, através dos resultados obtidos é detetável a mesma informação (Figura 3.6) (índice de condição aumenta durante a gametogénese e diminui durante o período de desova), esta constatação, já foi anteriormente observada para diferentes espécies de bivalves da costa portuguesa (Gaspar & Monteiro, 1998; Gaspar & Monteiro, 1999; Gaspar *et al.*, 1999; Joaquim *et al.*, 2011). O índice de condição apresenta o seu valor mais elevado em agosto para *R. decussatus* e maio para *R. philippinarum* (Figura 3.6). Verifica-se ainda que *R. philippinarum* apresenta um IC, quando comparadas as espécies, mais baixo que *R. decussatus*, o que demonstra que a concha de *R. philippinarum* é mais pesada que a da espécie em comparação, significando também que a parte visceral, em gramas, é inferior à de *R. decussatus*.

Delgado & Pérez-Camacho (2005) e Joaquim *et al* (2011) validam que o índice de condição, o ciclo reprodutivo, o armazenamento e o gasto de energia, nos bivalves estão inteiramente ligados. A temperatura e disponibilidade de alimento, regulam o tempo e a taxa de armazenamento de energia (Joaquim *et al.*, 2011), e o efeito dessas variáveis é complexo e dependente da aquisição e gasto de energia (Pérez-Camacho *et al.*, 2003). O armazenamento de energia e os gastos energéticos traduzem-se em padrões sazonais de composição bioquímica (proteínas, glicogénio e lípidos totais) que variam de acordo com a localização geográfica das populações e das espécies (Albentosa *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2009). A acumulação de

energia, normalmente, ocorre antes da gametogénese durante períodos de abundância de alimento, depois esta energia é usada na síntese gametogénica, quando a necessidade metabólica é elevada (Mathieu & Lubet, 1993), sendo libertada durante a desova (Albentosa *et al.*, 2007). As proteínas são usadas como uma fonte de energia quando ocorrem situações de stress nutricional, desequilíbrio energético e durante a maturação gonadal (Gabbott & Bayne, 1973; Liu *et al.*, 2008). Quando as reservas de lípidos estão totalmente gastas, Albentosa *et al.* (2007) e Joaquim *et al.* (2011), sugerem que as proteínas são usadas como fonte de energia de mantimento. No presente estudo, ambas as espécies, *R. decussatus* e *R. philippinarum*, apresentam uma correlação positiva das proteínas com a energia total (ANOVA, p -value < 0,01) (Tabela 3.3), o que comprova que as proteínas são o tecido seco predominante nos bivalves, como é possível verificar no estudo de Machado (2015) na população *R. decussatus* da Lagoa de Óbidos, onde essa correlação também foi verificada. Os valores médios de proteína alcançados, ao longo dos meses de amostragem (Tabela 3.2), quando comparadas as duas espécies em estudo, observa-se que *R. philippinarum* apresenta valores de teor de proteína mais elevados em todos os meses amostrados, com a exceção do mês de julho, onde se regista o contrario, quando comparada com *R. decussatus* (Tabela 3.2).

Em indivíduos adultos o glicogénio é considerado a reserva principal (Joaquim *et al.*, 2008a; Joaquim *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2013), podendo ser usada em simultâneo como fonte energética para o crescimento e armazenada em células específicas como energia de reserva. *R. philippinarum*, apresentou uma correlação positiva do teor de glicogénio com o IC (ANOVA, p -value < 0,01) (Tabela 3.3). O presente estudo apresenta valores de glicogénio ($44,20 \pm 21,71$ a $131,98 \pm 22,07 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* e ($18,08 \pm 10,67$ a $102,10 \pm 35,75 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) para *R. philippinarum* (Tabela 3.2). Comparando as duas espécies em estudo *R. decussatus* apresenta valores mais elevados de teor de glicogénio que *R. philippinarum*, à exceção dos meses de abril, maio e junho, onde se verifica o contrário (Tabela 3.2) o que sugere um maior armazenamento energético por parte da espécie nativa da Lagoa de Óbidos.

Quando comparados (glicogénio e proteínas), nos dez meses de amostragem, com a exceção dos meses de maio, junho e julho, o teor de glicogénio é elevado quando o teor de proteína é baixo (Tabela 3.2), o que sugere que as amêijoas intercalam, entre proteínas e glicogénio, como fontes de manutenção de energia, analogamente ao que foi registado no estudo de Machado (2015). O gasto de glicogénio, em *R. decussatus*, coincide com a fase III

(gametogénese avançada), sendo esta registada em percentagens maiores nos meses de abril, maio e junho (Figura 3.4), quando há um rápido desenvolvimento gonadal e depois desova, o que coincidiu com os valores mais baixos de glicogénio (Tabela 3.2). Relativamente à *R. philippinarum*, o mesmo não se observa, o que significa que esta usa as proteínas como fonte de energia neste período (Tabela 3.2).

Os lípidios são formados quando ocorre a conversão do glicogénio em lípidos, durante a formação dos gâmetas (Gabbott, 1975), tornando-se nas principais reservas para os oócitos. No presente estudo, *R. philippinarum*, apresentam uma correlação positiva do teor de glicogénio com o teor de proteínas (ANOVA, p -value < 0,05) e com a energia total (ANOVA, p -value < 0,01) (Tabela 3.3). Para os lípidos totais, o presente estudo exhibe valores de lípidos totais com valores mínimos superiores ($38,91 \pm 24,11 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* em comparação com ($25,91 \pm 7,11 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) *R. philippinarum* (Tabela 3.2), enquanto os valores máximos são inferiores ($68,84 \pm 13,81 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) para *R. decussatus* em comparação com ($97,09 \pm 42,97 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) *R. philippinarum* (Tabela 3.2). Para *R. decussatus* são valores que apresentam mínimos mais elevados e máximos mais baixos que os observados por Matias *et al* (2013) em *R. decussatus* (Ria de Aveiro: $35,0 \pm 9,8$ a $118,1 \pm 20,5 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW; Ria Formosa: $27,2 \pm 7,3$ a $112,1 \pm 15,1 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW) e por Machado (2015) para a população de *R. decussatus* (Lagoa de Óbidos: $34,60 \pm 5,32$ a $77,56 \pm 22,60 \mu\text{g mg}^{-1}$ AFDW). Como observado nos dados (Tabela 3.2), a variação dos teores de lípidos totais, em ambas as espécies estudadas, ocorre sem nenhuma tendência aparente, ou seja, a subida dos lípidos totais não implica a direta subida ou descida do outro parâmetro. Esta forma errática pode ser devida à sucessiva produção e libertação de gâmetas, típicas de uma espécie com uma estratégia de reprodução intermédia (entre conservativa e oportunista) conforme Matias *et al.*, (2013) e Machado (2015), como ambas as espécies em estudo apresentam o mesmo tipo de comportamento, consideram-se espécies com uma estratégia reprodutiva intermédia.

Existe a necessidade de se estudar estas duas espécies em simultâneo durante pelo menos dois anos, não só para se tentar perceber se as diferenças encontradas entre este estudo e o de Machado (2015), nomeadamente a nível do desenvolvimento gonadal e índice gonadal, de *R. decussatus*, se devem apenas à coexistência entre as duas espécies estudadas, *R. decussatus* e *R. philippinarum*, ou se a influência de parâmetros não estudados, como a poluição (Moura *et al.*, 2017b), pode estar na base das diferenças encontradas, sendo necessário colmatar a ausência

do mês de janeiro e fevereiro, e reforçar os meses já amostrados, para que os dados sejam o mais coerentes e precisos possível. Os dados referentes aos meses de amostragem (março a dezembro), indicam que apesar de ser uma espécie invasora, *R. philippinarum*, possui um comportamento e uma biologia reprodutiva muito semelhante à espécie nativa, *R. decussatus*. Assim, e respondendo ao objetivo, deste trabalho, durante os dez meses de amostragem, não se verificaram diferenças acentuadas no ciclo reprodutivo das duas espécies estudadas, no entanto verifica-se que *R. philippinarum*, usa mais do que uma fonte de energia em simultâneo em períodos de elevado esforço reprodutivo, quando comparadas as duas espécies. Pode concluir-se ainda que, uma vez que se observou que os ciclos gametogénicos das duas espécies são semelhantes, existe a possibilidade das duas se cruzarem (Hurtado *et al.*, 2011).

Referências

- Albentosa, M.; Fernández-Reiriz, M.J.; Labarata, U.; Pérez-Camacho, A. (2007). Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 146: 241–249.
- Avendaño, M. & Le Pennec, M. (1997). Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean molluscan bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). *Aquaculture Research*. 28: 175–182.
- Baird, R.H. (1958). Measurement of condition in mussels and oysters. *Journal du Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*. 23: 249–257.
- Banha, M.L.M.G. (1984). Aspectos da biologia (crescimento e reprodução) de *Ruditapes decussatus* Lineu, 1789 (Mollusca: Bivalvia) na Ria Formosa. Relatório de Estágio Científico realizado no Instituto Nacional de Investigação das Pescas. Centro de Faro. Faculdade de Ciências. Algarve. 119 pp.
- Barber, B.J. & Blake, N.J. (1981). Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 52: 121–134.
- Bayne, B.L. & Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In: Salenium, A.S.M. & Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca* (Vol 4). Academic Press, New York. 407–515.
- Bayne, B.L. (1976). Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: Wiley, M. (Ed.), *Estuarine Processes* (Vol. 1), Uses, Stresses and Adaptation to the Estuary. Academic Press, New York. 432–448.
- Bayne, B.L.; Bubel, A.; Gabbott, P.A.; Livingstone, D.R.; Lowe, D.M.; Moore, M.N. (1982). Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis*. *Marine Biology Letters*. 3: 89–105.
- Bednárová, A.; Mocák, J.; Gössler, W.; Velik, M.; Kaufmann, J.; Staruch, L. (2013). Effect of animal age and gender on fatty acid and elemental composition in Austrian beef applicable for authentication purposes. *Chemical Papers*. 67(3): 274–283.
- Beninger, P.G. & Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* (L.) (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adam & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79: 19–37.
- Beninger, P.G. & Lucas, A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* (L.) (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adam & Reeve). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 79: 19–37.

- Beukema, J.J. & De Bruin, W. (1979). Calorific values of the soft parts of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 37: 19–30.
- Bodoy, A.; Maître-Allain, T.; Riva, A. (1980). Croissance comparée de la palourde européenne *Ruditapes decussatus* et de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dans un écosystème artificiel méditerranéen. *Vie Marine* 2: 39–51.
- Breber, P. (1985). On-growing of the carpet-shell clam (*Tapes decussatus* L.): two years' experience in Venice Lagoon. *Aquaculture* 44: 51–56.
- Camacho, A.P. (1980) Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767), com especial referència a los factores de la reproducción. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 5: 43–76.
- Cardoso, J.; Peralta, N.; Machado, J.; Van der Veer, H. (2013). Growth and reproductive investment of introduced Pacific oysters *Crassostrea gigas* in southern European waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 118: 24–30.
- Chainho, P. (2014). Portuguese report. Report of the Working Group on Introduction and Transfers of Marine Organisms (WGITMO), 19 and 21 March, 2014, Palanga, Lithuania. ICES CM 2014/ACOM: 32, 259 pp.
- Chávez-Villalba, J.; Cochard, J.C.; Le Pennec, M.; Barret, J.; Enriquez Dias, M.; Caceres Martinez, C. (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. 22(3): 721–731.
- Coe, W.R. (1943). Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *The Quarterly Review of Biology* (Vol. 18). 154–164.
- Colautti, R.I.; Ricciardi, A.; Grigorovich, I.A.; MacIsaac, H.J. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters* 7: 721–733, <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00616.x>
- De Valence, P. & Peyre, R. (1990). Clam culture. In: Barnabé, G. (Ed.), *Aquaculture* (2nd ed., Vol. 1). Ellis Horwood, Chichester, UK. 388–415.
- Delgado, M. & Pérez-Camacho, A. (2002). Hermaphroditism in *Ruditapes decussatus* (L.) (Bivalvia) from the Galician coast (Spain). *Scientia Marina*. 66(2): 183–185.
- Delgado, M. & Pérez-Camacho, A. (2005). Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca Bivalvia) and its relationship with available food. *Scientia Marina*. 69(1): 87–97.
- DGRM. (2015). Estatísticas da Pesca 2014. Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos. Edição de 2015. Lisboa. 146 pp.

Dridi, S.; Romdhane, M.S.; Elcafsi, M. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*. 263: 238–248.

FAO. (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 223 pp.

FAO. (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.

FAO. (2017a). *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). In: FAO, 2005–2015. *Cultured Aquatic Species Information Programme*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_decussatus/en (acedido a 2 de maio de 2017).

FAO. (2017b). *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). In: FAO, 2005–2015. *Cultured Aquatic Species Information Programme*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en (acedido a 16 de junho de 2017).

Fernández Castro, N. & Vido de Mattio, N. (1987). Biochemical composition, Condition index, and energy value of *Ostrea puelchana* (d'Orbigny): relationships with reproductive cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 108: 113–126.

Folch, J.; Less, M.; Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 226: 497–509.

Fonseca, L.C., Gil, O., Micaelo, C., Pereira, P., Gaspar, M., Antunes, P., Quintans, M., Falcão, M., Vale, C., Moura, A., Carvalho, S., Leitão, F., Santos, I., Drago, T., Santos, J., Raimundo, J. (2002). Caracterização ambiental da Lagoa de Óbidos. *Relatório do IPIMAR*, 102 p.

Freitas, C. (1989). Natureza dos sedimentos do fundo da Lagoa de Óbidos. *Geolis III* (1/2): 144–153 (in Portuguese).

Gabbott, P.A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: an hypothesis concerning the relation between glycogen and gametogenesis. In: Barnes, H. (Ed.), *Proceedings of the Ninth European Marine Biology Symposium*. Aberdeen University Press, Aberdeen, Scotland. 191–211.

Gabbott, P.A. & Bayne, B.L. (1973). Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 53: 269–286.

Gabbott, P.A. (1976). Energy metabolism. In: Bayne, B.L. (Ed.), *Marine Mussels: their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge. 293–357.

- Galap, C.; Leboulenger, F.; Grillot, J.P. (1997). Seasonal variations in biochemical constituents during the reproductive cycle of female dog cockle *Glycymeris glycymeris*. *Marine Biology*. 129: 625–634.
- Gaspar, M.B. & Monteiro, C.C. (1998). Reproductive cycles of the razor clam *Ensis siliqua* and the clam *Venus striatula* off Vilamoura, southern Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 78: 1247–1258.
- Gaspar, M.B. & Monteiro, C.C. (1999). Gametogenesis and spawning in the subtidal white clam *Spisula solida*, in relation to temperature. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 79: 753–755.
- Gaspar, M.B.; Ferreira, R.; Monteiro, C.C. (1999). Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L. (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*. 41: 309–316.
- Galvão, M.S.N.; Henriques, M.B.; Pereira, O.M.; Marques, H.A. (2006). Ciclo reprodutivo e infestação parasitária de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Boletim do Instituto de Pesca*. 32: 59–71.
- Giese, A.C. (1969). A new approach to the biochemical composition of the mollusc body. *Oceanography and Marine Biology*. 7: 175–229.
- Goodman, D. (1979). Regulating reproductive effort in a changing environment. *The American Naturalist*. 113: 735–748.
- Gouletquer, P.; Nedhif, M.; Héral, M. (1988). Production de palourdes japonaises *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) en bassin semi-fermé: approche énergétique et relations trophiques. *Aquaculture*. 74: 331–348.
- Grassé, P.P. (1960). *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, BIOLOGIE. Bryozoaires, Brachiopodes, Chétognathes, Pogonophoros, Molusques, (Generalités, Aplacophores, Polyplacophores, Monoplacophores, Bivalves) (Tome V, Fascicule II)*. Editeurs Masson et Cie, Paris.
- Gribben, P.E.; Helson, J.; Jeffs, A.G. (2004). Reproductive cycle of the New Zealand Geoduck, *Panopea zelandica*, in two North Island populations. *Veliger*. 47: 59–71.
- Guelorget, O.; Mayere, C.; Amanieu, M. (1980). Croissance, biomasse et production de *Venerupis decussata* et *Venerupis aurea* dans une lagune méditerranéenne l'étang du Prevot à Palavas (Hérault, France). *Vie Marine*. 2: 25–38.
- Guerra, A.; Lodeiros, C.; Gaspar, M.; da Costa, F. (2011). *Razor clams: Biology, Aquaculture and Fisheries*. Xunta de Galicia, Consellería do Mar. 428 pp.
- Helena, B.; Pardo, R.; Vega, M.; Barrado, E.; Fernández, L. (2000). Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component analysis. *Water Research*. 34: 807–816.

Helm, M. & Bourne, N. (2006). Cultivo de bivalvos en criadero – Un manual practico. FAO N° 471. Roma. 42 pp.

Holland, D.A. & Chew, K.K. (1974). Reproductive cycle of the Manila clam (*Venerupis japonica*) from Hood Canal, Washigton. Proceedings of the National Shellfisheries Association. 64: 53–58.

Hurtado, N. S.; García, C. P.; Morán, P.; Pasantes, J. J. (2011). Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain. *Aquaculture* 311: 123–128.

Iglesias, J.I.P.; Camacho, C.; Navarro, E.; Labarta, U.; Beiras, R.; Hawkins, A.J.S.; Widdows, J. (1996). Microgeographic variability in feeding, absorption and condition of 34 mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): a transplant experiment. *Journal of Shellfish Research*. 15(3): 673–680.

Humphreys, A.C.; Caldow, J.; Grisley, R.W.G.; Dvrynda, P.E.J. (2004) Naturalization of the Manila clam (*Tapes philippinarum*), an alien species, and establishment of a clam fishery within Poole Harbour, Dorset. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84: 1069–1073, <https://doi.org/10.1017/S0025315404010446h>

Jeffrey, S.W. & Lorenzen, C.J. (1980). Determination of chlorophyll in seawater – report of intercalibration tests. UNESCO Technical Paper in Marine Science. No. 35. 20 pp.

Joaquim, S.; Matias, D.; Lopes, B.; Arnold, W.S.; Gaspar, M.B. (2008a). The reproductive cycle of white clam *Spisula solida* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Implications for aquaculture and wild stock management. *Aquaculture*. 281: 43–48.

Joaquim, S.; Matias, D.; Matias, A.M.; Moura, P.; Arnold, W.S.; Chícharo, L.; Gaspar, M.B. (2011). Reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) (Mollusca: Bivalvia) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina*. 75 (2): 217–226.

Joaquim, S.; Matias, D.; Moreno, Ó. (2008b). Cultivo de bivalvos en criadeiro/Cultivo de bivalves em maternidade. Pesca y acuicultura. Recursos pesqueros. Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura y Pesca. 84 pp.

Jones, T.O. & Iwana, G.K. (1991). Polyculture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), with chinook salmon, *Onchorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture*. 92: 313–322.

Jordaens, K.; De Wolf, H.; Willems, T.; Van Dongen, S.; Brito, C.; Frias, A.; Backeljau, T. (2000). Loss of genetic variation in a strongly isolated Azorean population of the edible clam, *Tapes decussates*. *Journal of Shellfish Research*. 19: 29–34.

Laruelle, F.J.; Guillou, J.; Paulet, Y.M. (1994). Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 74(2): 351–366.

- Laruelle, F.; Guillou, J.; Paulet, Y.M. (2009). Reproductive pattern of the clams, *Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum* on intertidal flats in Brittany. *Marine Biological Association of the United Kingdom*. 74: 351-366.
- Le Pennec, M.; Beninger, P.G.; Dorange, G.; Paulet, Y. (1991). Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 71: 451-463.
- Lorenzen, C.J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*. 12: 343-346.
- Lowe, D. M.; Moore, M. N.; Bayne, B. L. (1982). Aspects of gametogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 62: 133-145.
- Lucas, A. (1968). Mise en évidence de l'hémaphrodisme juvénile chez *Venerupis decussata* (L.) (Bivalvia: Veneridae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series D*. 267: 2332-2333.
- Machado, D. (2015). Reproductive cycle of the population of European clam, *Ruditapes decussatus*, from Lagoa de Óbidos, Leiria, Portugal. *Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, Instituto Politécnico de Leiria, Portugal*. P. 1 – 29.
- Malhadas, M.S.; Leitão, P.C.; Silva, A.; Neves, R. (2009). Effect of coastal waves on sea level in Óbidos Lagoon, Portugal. *Continental Shelf Research*. 29: 1240-1250.
- Mann, R. (1978). A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. In: Thorpe, J.H. & Gibbons, J.W. (Eds.), *Energy 35 and Environmental Stress in Aquatic System*. Technical Information Center, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, TN. 484-497.
- Marsh, J.B. & Weinstein, D.B. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7: 574-576.
- Massapina, C.; Joaquim, S.; Matias, D.; Devauchelle, N. (1999). Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve South Portugal. *Aquatic Living Resources*. 12: 327-333.
- Mathieu, M., & Lubet, P. (1993). Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves - a brief review. *Invertebrate Reproduction & Development*. 23: 123-129.
- Matias, D.; Joaquim, S.; Leitão, A.; Massapina, C. (2009). Effect of geographic origin, temperature and timing of broodstock collection on conditioning, spawning success and larval viability of *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758). *Aquaculture International*. 17: 257-271.
- Matias, D.; Joaquim, S.; Matias, A.M.; Moura, P.; Teixeira de Sousa, J.; Sobral, P.; Leitão, A. (2013). The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two

Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*. 406–407: 52–61.

Matias, D.; Joaquim, S.; Ramos, M.; Sobral, P.; Leitão, A. (2011). Biochemical compounds' dynamics during larval development of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758): effects of mono-specific diets and starvation. *Helgoland Marine Research*. 65(3): 369–380.

Meneghetti, F.; Moschino, V.; Da Ros, L. (2004). Gametogenic cycle and variation in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*. 240: 473–488.

Moura, P.; Garaulet, L.L.; Vasconcelos, P.; Chainho, P.; Costa, J.L.; Gaspar, M.B. (2017a). Age and growth of a highly successful invasive species: the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in the Tagus Estuary (Portugal). *Aquatic Invasions* (2017) Volume 12, Issue 2: 133–146.

Moura, P.; Vasconcelos, P.; Pereira, F.; Chainho, P.; Costa, J.L.; Gaspar, M.B. (2017b). Reproductive cycle of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): an intensively harvested invasive species in the Tagus Estuary (Portugal). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, page 1 of 13.

Newell, R.I. & Bayne, B.L. (1980). Seasonal changes in the physiology, reproductive condition and carbohydrate content of the cockle *Cardium (=Cerastoderma) edule* (Bivalve: Cardiidae). *Marine Biology*. 56: 11–19.

Ojea, J.; Pazos, A.J.; Martínez, D.; Novoa, S.; Sánchez, J.L.; Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*. 238: 451–468.

Oliveira, A.; Fortunato, A.B.; Rego, J.R.L. (2006). Effect of morphological changes on the hydrodynamics and flushing properties of the Óbidos Lagoon (Portugal). *Continental Shelf Research*. 26: 917–942.

Pacheco, L.; Vieira, A.; Ravasco, J. (1989). Crescimento e reprodução de *Ruditapes decussatus* na Ria Formosa (Sul de Portugal). *Bentos*. 6: 129–136.

Paine, R.T. (1971). The measurement and application of the calorie to ecological problems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2: 145–164.

Parache, A. (1982). La palourde. *La Pêche Maritime*. 1254: 496–507.

Pazos, A.J.; Silva, A.; Vázquez, V.; Pérez-Parallé, M.L.; Sánchez, J.L.; Abad, M. (2005). Differences in sterol composition of clams (*Ruditapes decussatus*) from three rías in Galicia (NW Spain). *Marine Biology*. 147: 663–670.

Pérez-Camacho, A.; Delgado, M.; Fernández-Reiriz, M. J.; Labarta, U. (2003). Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Ecology Progress Series*. 258: 133–145.

Poppe G.T. & Goto Y. (1991). European seashells (Vol.1) (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastra, Gastropoda). Verglad Christa Hemmen, Wiesbaden. 352 pp.

Quayle, D.B. (1943). Sex, gonad development and seasonal gonad changes in *Paphia staminea* Conrad. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 6: 140–151.

Ramajal, J.; Picard, D.; Costa, J.L.; Carvalho, F.B.; Gaspar, M.B.; Chainho, P. (2016). Amêijoajaponesa, uma nova realidade no estuário do Rio Tejo: pesca e pressão social versus impacto ambiental. In: Cancela da Fonseca L, Garcia AC, Pereira SD, Rodrigues MAC (eds), Entre Rios e Mares: um Património de Ambientes, História e Saberes. Tomo V da Rede BrasPor, Rio de Janeiro, Brasil, 17–30 pp.

Robledo, J.A. F.; Santarem, M.M.; Gonzalez, P.; Figueras, A. (1995). Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. Aquaculture. 133: 311–322.

Sastry, A.N. (1979). Pelecypoda (Excluded Ostreid). In: Giese, A.C & Pearse, J.S. (Eds.), Reproduction of marine invertebrates. (Vol. V). Molluscs. Pelecypods and lesser classes. Academic Press, London. 5: 113-292.

Seed, R. (1976). Ecology. In: Bayne B.L. (Ed.), Marine mussels: Their ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge. 13–65.

Seed, R. (1976). Ecology. In: Bayne B.L. (Ed.), Marine mussels: Their ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge. 13–65.

Serdar, S. & Lök, A. (2009). Gametogenic cycle and biochemical composition of the transplanted carpet shell clam *Tapes decussatus*, Linnaeus 1758 in Sufa (Homa) Lagoon, Izmir, Turkey. Aquaculture. 293: 81–88.

Shafee, M.S. & Daoudi, M. (1991). Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. Aquaculture and Fisheries Management. 22: 203–216.

Shakir, F.K.; Audilet, D.; Drake III, A.J.; Shakir, M.M. (1994). A rapid protein determination by modification of the Lowry Procedure. Analytical Biochemistry. 216: 232–233.

Sorokin, Y.I.; Giovanardi, O. (1995). Trophic characteristics of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850). *ICES Journal of Marine Science* 52: 835–862.

Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2nd edition. Fisheries Research Board of Canada. 167. 310 pp.

ter Braak, C.F.J. & Smilauer P. (1998). CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows: Software for Canonical Community Ordination version 4.5. Microcomputer Power. Ithaca, NY USA.

- Trigui-El-Menif, N.; Le Pennec, M.; Maamouri, F. (1995). Reproduction of the European Clam *Ruditapes decussatus* (mollusc, bivalve) along the Tunian coasts. *Marine Life*. 5(1): 35–42.
- Uzaki, N.; Kai, M.; Aoyama, H.; Suzuki, T. (2003). Changes in mortality rate and glycogen content of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during the development of oxygen-deficient waters. *Fisheries Science*. 69: 936–943.
- Vega, M.; Pardo, R.; Barrado, E.; Debán, L. (1998). Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research*. 32(12): 3581–3592.
- Vilela H. (1950). Vida bentónica de *Tapes decussatus* (L.). *Travaux de la Station de Biologie Maritime de Lisbonne*. 120 pp.
- Viles, F.J. & Silverman, L. (1949). Determination of starch and cellulose with anthrone. *Journal Analytical Chemistry*. 21: 950–953.
- Xie, Q.; Burnell, G.M. (1994). A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (A. Adams & Reeve 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. *Journal of Shellfish Research*. 13(2): 467–472.
- Walne, P.R. & Mann R. (1975). Growth and biochemical composition of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. In: Barnes H. (Ed.), *Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium Oban, Scotland*. 587–607.
- Zandee, D.I.; Kluytmans, J.H.; Zurburg, W.; Pieters, H. (1980). Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research*. 14: 1–29.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River- NJ: Pearson Prentice-Hall.

ESTA PÁGINA FOI PROPOSITADAMENTE DEIXADA EM BRANCO