

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**ESTUDO DA QUALIDADE BIOQUÍMICA DAS
POSTURAS DE PROGENITORES
“SELVAGENS” DE AMÊIJOA-MACHA
Venerupis senegalensis (GMELIN, 1791)**

CÁTIA SOFIA VERA

Mestrado em Aquacultura e Pescas, na área de Aquacultura

Faro

2010

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**ESTUDO DA QUALIDADE BIOQUÍMICA DAS
POSTURAS DE PROGENITORES
“SELVAGENS” DE AMÊIJOA-MACHA
Venerupis senegalensis (GMELIN, 1791)**

CÁTIA SOFIA VERA

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Aquacultura e Pescas, na área de Aquacultura.

Orientadora: Doutora Custódia Fonseca

Co-orientadora: Dra. Sandra Joaquim

Faro

2010

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta tese não posso deixar de expressar os meus agradecimentos a todos quantos directa e indirectamente, contribuíram para a sua realização, particularmente:

Ao Director do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB I.P./ L-IPIMAR), agradeço a possibilidade de ter realizado esta dissertação na Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira.

À Dra. Sandra Joaquim, do INRB I.P./ L-IPIMAR, demonstro o meu especial apreço, pela orientação em todas as fases deste trabalho, toda a disponibilidade demonstrada e ainda a cuidadosa revisão do texto. Os seus conselhos e sugestões foram determinantes.

À Doutora Custódia Fonseca, da Universidade do Algarve, orientadora desta dissertação, o seu apoio e disponibilidade na orientação deste trabalho. Agradeço também, a leitura atenta desta tese e todas as sugestões.

Agradeço a toda a equipa do INRB I.P./ L-IPIMAR a forma como fui recebida e o apoio demonstrado.

Ao meu marido, Bruno Miguel agradeço todo o amor, amizade, carinho, palavras de incentivo e paciência.

Para finalizar agradeço aos meus familiares e amigos o total apoio, incentivo e confiança demonstrada ao longo dos anos.

Obrigada por tudo.

RESUMO

O estudo da qualidade dos ovócitos libertados por progenitores “selvagens” da espécie amêijoia-macha *Venerupis senegalensis* (=pullastra) poderá contribuir tanto para a definição de critérios de qualidade aplicáveis às maternidades deste bivalve, bem como poderá ser encarado como um indicador do potencial de reprodução da espécie e da eficiência de um sistema de produção.

A qualidade dos ovócitos é um dos factores determinantes da viabilidade larvar. A caracterização bioquímica dos ovócitos poderá ajudar a compreender melhor como se processa a acumulação e transferência de reservas para a gónada das fêmeas, em função das condições ambientais a que estão sujeitas.

Neste estudo, os objectivos foram i) determinar a composição bioquímica (proteínas, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos e matéria orgânica) dos ovócitos resultantes da postura de progenitores “selvagens” de *Venerupis senegalensis* e ii) estabelecer critérios indicadores da qualidade desses ovócitos.

As proteínas são o constituinte mais abundante nos ovócitos (18-38 % de peso seco), seguidas pelos lípidos totais (7-17 % de peso seco) e hidratos de carbono (1-3 % de peso seco).

O resultado das correlações entre os parâmetros (temperatura, matéria orgânica, proteínas, índice de condição e índice gonadal) dos progenitores e os ovócitos sugerem que o conteúdo em lípidos, nomeadamente fosfolípidos pode ser utilizado como um critério de qualidade dos ovócitos. Ainda ficou demonstrado que *V. senegalensis* tem um período de postura alargado sem variações significativas de qualidade ovacitária, o que permite a indução da postura em maternidade ao longo do período de maturação e postura.

Em síntese, a definição de índices de qualidade avaliam a qualidade dos ovócitos e conseqüentemente das larvas mas são necessários futuros estudos sobre a viabilidade larvar destes ovócitos, para validar os índices de qualidade encontrados. Esta informação é uma contribuição para o conhecimento do ciclo reprodutivo da *V. senegalensis* e poderá ser aplicada na maternidade destes bivalves, contribuindo para uma sua melhor gestão.

Palavras-chave: bivalves, *Venerupis senegalensis*, amêijoia-macha, composição bioquímica, qualidade dos ovócitos.

ABSTRACT

The study of oocytes quality released by “wild” broodstock of pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (=pullastra) can be used as a quality criteria applied to hatcheries, and also as an indicator of the reproductive efficacy on the growing system.

The oocytes quality is one of the most important factors which determine larval viability. The oocytes biochemical characterization may be help to understand how process for reserves accumulation occurs and how these reserves are transferred to female gonad, attending to environmental conditions.

In this study, the main objectives were i) determine the biochemical composition (proteins, total lipids, neutral lipids, phospholipids, carbohydrates, free reducing sugars, polysaccharides and organic matter) of oocytes resulting from spawning of “wild” broodstock of *Venerupis senegalensis* and ii) establish a quality criteria for oocytes.

Proteins were the most abundant oocytes constituent (18-38 % dry weight), followed by total lipids (7-17 % dry weight) and carbohydrates (1-3 % dry weight).

Since there is a large extended correlation between several studied parameters in broodstock (temperature, organic matter, proteins, condition index, gonadal index), and the lipid content, particularly the phospholipids, in oocytes, this determination can be used as a criteria of the oocytes quality. It was demonstrated that *V. senegalensis* has a broad spawning period without significant variations in oocyte quality, which allows the artificial spawning induction in hatcheries along the period of maturity and spawning.

In conclusion, the definition of quality index which allow to evaluate the oocytes and consequently, larvae quality. However, further studies will be necessary on the larval viability, to validate the quality indexes. This information is a contribution to the knowledge of the reproductive cycle of *V. senegalensis* and can be applied in hatchery contributing to better management.

Keywords: bivalve, *Venerupis senegalensis*, pullet carpet shell, biochemical composition, oocyte quality.

ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Percentagem
µg	Micrograma
µg mg ⁻¹	Micrograma por miligrama
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
A	Absorvância
ANOVA	Método de Análise de Variâncias
ARL	Açúcares redutores livres
C	Concentração
C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	Tartarato dissódico
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Clorofórmio
CuSO ₄	Sulfato de cobre
<i>d.f.</i>	Graus de liberdade
DGPA	Direcção Geral de Pescas e Aquacultura
DRAP	Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas
FL	Fosfolípidos
H	Hipótese do teste estatístico
H ₂ O	Água destilada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HC	Hidratos de carbono
HCl	Ácido clorídrico
I	Luz emergente
IC	Índice de condição
IG	Índice gonadal
INRB I.P./ L-IPIMAR	Instituto Nacional de Recursos Biológicos
I ₀	Luz incidente
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianeto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
kJ µg ⁻¹	Kilojoule por micrograma

kJ g⁻¹	Kilojoule por grama
K-W	Teste Kruskal-Wallis
l	Percurso óptico
LD	Limite de detecção
LN	Lípidos neutros
LQ	Limite de quantificação
LT	Lípidos totais
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MO	Matéria orgânica
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH₄HCO₂	Formato de amónia
nm	Nanómetro
°C	Graus Celsius
<i>p</i>	<i>p value</i>
PL	Polissacarídeos
r	Coeficiente de correlação
r.p.m	Rotações por minuto
s.c.	Sem correlação
T	Temperatura
TCA	Ácido tricloroacético
VE	Valor energético
ε	Absortividade molar

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS E SIMBOLOS	5
ÍNDICE GERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. BIOLOGIA DA ESPÉCIE	16
1.1.1. TAXONOMIA	16
1.1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	16
1.1.3. HABITAT	17
1.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	18
1.2. CICLO DE VIDA	19
1.2.1. REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO	19
1.2.2. CRESCIMENTO	20
1.2.3. NUTRIÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 . CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	22
2.1.1. INDUÇÃO DA POSTURA	22
2.2. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS CONSTITUINTES	23

2.3. REAGENTES E PADRÕES	24
2.4. FRACCIONAMENTO DAS AMOSTRAS	25
2.5. DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES BIOQUÍMICOS	27
2.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
3. RESULTADOS	31
3.1. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS	31
3.2. RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS	42
3.2.1. OVÓCITOS EMITIDOS	42
3.2.2. PROGENITORES E OVÓCITOS EMITIDOS	43
4. DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	53
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXOS	I

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Zona de produção natural na Ria de Aveiro – Gafanha da Encarnação (Sobral *et al.*, 2000 & Wikipédia, 2009). 13
- Figura 2** – Distribuição geográfica da *Venerupis senegalensis*. (Sealifebase, 2010) 17
- Figura 3** – Morfologia da concha *Venerupis senegalensis* (Marine Life Encyclopedia, 2010). 18
- Figura 4** – Esquema de fraccionamento das amostras. 26
- Figura 5** - Variação média (\pm desvio padrão) de proteínas presente nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 33
- Figura 6** - Variação média (\pm desvio padrão) de hidratos de carbono presente nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 34
- Figura 7** - Variação média (\pm desvio padrão) de lípidos totais presente nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 35
- Figura 8** - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa de açúcares redutores livres e polissacarídeos na composição dos hidratos de carbono presentes nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 36
- Figura 9** - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa de lípidos neutros e fosfolípidos na composição dos lípidos totais presentes nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 37

Figura 10 - Variação média (\pm desvio padrão) da matéria orgânica total (μg) dos ovócitos de amêijoa-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 39

Figura 11 - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa em termos de matéria orgânica de proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono presentes nos ovócitos de amêijoa-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 40

Figura 12 - Variação média (\pm desvio padrão) da energia total ($\text{kJ} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) dos ovócitos de amêijoa-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente). 42

Figura 13 – Rectas de regressão de a) lípidos totais dos ovócitos em função da temperatura, b) fosfolípidos dos ovócitos em função de temperatura, c) lípidos totais dos ovócitos em função da matéria orgânica dos progenitores, d) fosfolípidos dos ovócitos em função da matéria orgânica dos progenitores, e) lípidos totais dos ovócitos em função das proteínas dos progenitores, f) fosfolípidos dos ovócitos em função do índice de condição dos progenitores e g) fosfolípidos dos ovócitos em função do índice gonadal dos progenitores. 44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Teores médios ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco \pm desvio padrão) de proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, matéria orgânica total e energia total dos ovócitos de *V. senegalensis* durante o período de amostragem. 32

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves (ostras, mexilhões, amêijoas e vieiras) constituem uma parte importante da produção pesqueira mundial. Durante a década 90, verificou-se um aumento constante de produção mundial de bivalves, passando de 6,3 milhões de toneladas para 14 milhões de toneladas de bivalves desembarcados procedentes da pesca e da aquacultura (Helm & Bourne, 2006). A cultura de moluscos bivalves é uma actividade de grande importância económica e social a nível mundial, nomeadamente em países como Japão, França, Espanha e Portugal (Joaquim, 1997).

Os bivalves constituem um dos maiores recursos da actividade pesqueira e de aquacultura, em Portugal. No entanto, na última década, este manancial tem vindo a diminuir drasticamente, quer por causas naturais quer por causas antropogénicas, colocando em risco a sustentação e a produção destes sectores (Gaspar & Monteiro, 1999).

Em Portugal, os bivalves com maior interesse económico em aquacultura são: amêijoas, ostra, mexilhão, berbigão e longueirão (DGPA, 2009). Por sua vez, no sector pesqueiro são: berbigão, amêijoas e longueirão (DGPA, 2009). A nível nacional em 2008, a produção média anual de bivalves em aquacultura atingiu 3.039 toneladas e no sector pesqueiro atingiu 2.867 toneladas (DGPA, 2009). Uma parte desta produção destina-se ao consumo interno e a outra é exportada para Espanha (IPIMAR, 2000 e Campos & Cachola, 2006). É também importante realçar a existência de um circuito paralelo de comercialização onde o produto é vendido directamente (sem depuração e sem factura) ao consumidor, para a restauração ou para Espanha. Este circuito contribui para que os valores totais de produção estejam subavaliados (Bernardino, 2001).

O objecto de estudo deste trabalho foi a amêijoa-macha *Venerupis senegalensis* (=pullastra), que é comercialmente importante em Portugal, Espanha, França e Itália (Joaquim *et al.*, 2009).

Na Ria de Aveiro, a exploração de moluscos bivalves constitui uma actividade de grande importância sócio-económica com mais de mil profissionais envolvidos. A produção anual de 2007 atingiu 1.100 toneladas correspondendo a 1,6 milhões de euros, contribuindo a moluscicultura com 363 toneladas (DRAP, 2008). Esta actividade tem vindo a crescer ao longo dos anos, sendo dirigida, entre outras, à captura de amêijoa-macha. Esta espécie tem sido alvo de uma intensa exploração do sector pesqueiro

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoia-macha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

devido ao seu valor comercial. Nos últimos anos têm-se assistido a uma apanha ilegal por mergulhadores e a situação é agravada pela intensificação da apanha nos meses de Verão, quando os veraneantes a exercem como actividade lúdica, tendo o esforço de pesca aumentado, significativamente. Contudo, o poder de recuperação dos bancos naturais tem permitido a sua exploração, mas evidenciam indícios de exaustão (Maia *et al.*, 2006). Estes sinais são preocupantes e repercutam-se na quantidade e na qualidade dos recursos explorados. Actualmente, na Ria de Aveiro, a exploração de amêijoia-macha ocupa 9,4 hectares da Gafanha da Encarnação (costa ocidental de Portugal: N 40° 36' 12.53"; W 8° 40' 16.14") (Figura 1). No início de 2009, verificou-se valores anormalmente elevados de mortalidade, nos viveiros. Pensa-se que este facto foi resultante do aumento do nível da água doce na Ria provocado pelas chuvas intensas em dias consecutivos (MADRP, 2009 e Cardoso, *Com. Pes.*).

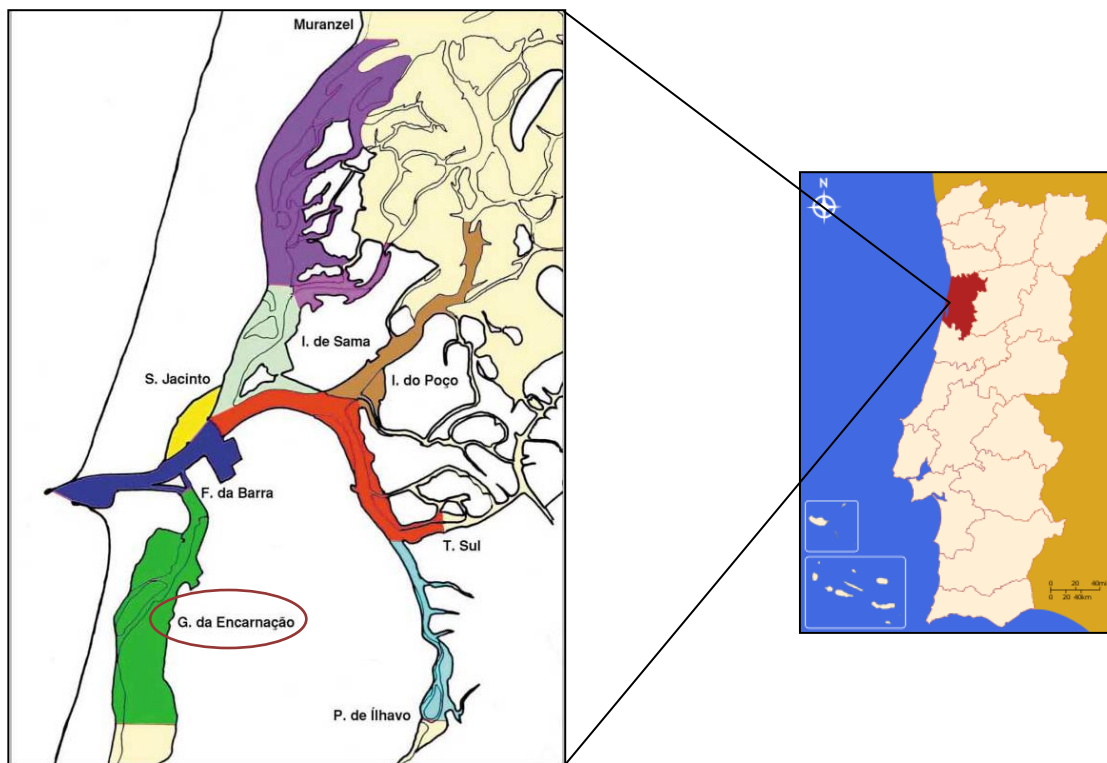


Figura 1 – Zona de produção natural na Ria de Aveiro – Gafanha da Encarnação (Sobral *et al.*, 2000 e Wikipédia, 2009).

A amêijoia-macha foi em tempos, uma espécie abundante na Ria Formosa (sul de Portugal) cuja actividade pesqueira foi economicamente rentável nos anos 80. Contudo, a sua abundância diminuiu drasticamente devido a uma intensa pesca ao ponto de

provocar a rotura dos mananciais (Joaquim *et al.*, 2009), de tal forma, que actualmente não é alvo de exploração.

A elevada exploração e mortalidade deste recurso podem vir a colocá-lo em risco de colapso, com graves consequências económicas, sociais e ambientais. Torna-se assim imperativo a implementação de medidas de gestão específicas (ex. criação de um período de defeso na pesca), que se ajustem à exploração deste bivalve ao estado e à condição dos recursos disponíveis (Maia *et al.*, 2006).

Dada a sua importância sócio-económica, à exploração intensiva e à mortalidade da espécie, é necessária a realização de estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos que controlam a sua qualidade biológica, de modo a desenvolver metodologias de produção em maternidade e permitir um eficiente repovoamento nos locais mais depauperados.

A qualidade dos ovócitos é um dos factores determinantes na viabilidade larvar dos bivalves (Massapina *et al.*, 1999). Os estados iniciais do desenvolvimento larvar apoiam-se nas reservas vitelinas dos ovócitos que constituem uma fonte de energia formada por lípidos, proteínas e hidratos de carbono (Nóvoa *et al.*, 2007). Assim, geralmente, a qualidade dos ovócitos é determinada pelas suas reservas (Angel-Dapa *et al.*, 2010). Por sua vez, a qualidade dos ovócitos e a viabilidade larvar são dependentes das características intrínsecas dos progenitores. Neste caso, a caracterização bioquímica dos ovócitos poderá ajudar a compreender melhor como se processa a acumulação e transferência de reservas para a gónada da fêmea, em função das condições ambientais a que os progenitores estão sujeitos (Joaquim, 1997).

Os lípidos são essenciais como componentes estruturais de membranas celulares (fosfolípidos) e como fonte de energia (especialmente os lípidos neutros) (García-Guerrero *et al.*, 2003) e ainda são conhecidos por desempenharem um papel fundamental na maximização da taxa de eclosão dos ovos, na taxa de crescimento larvar e sobrevivência das larvas, logo são extremamente importantes para a qualidade das larvas (Napolitano *et al.*, 1992 e Angel-Dapa *et al.*, 2010). As larvas, nos seus estados iniciais (até larva D) dependem da quantidade endógena inicial de lípidos fornecidos aos ovócitos pelos progenitores durante a vitelogénese (Massapina *et al.*, 1999). Vários autores têm considerado os lípidos totais como indicadores da qualidade dos ovócitos em espécies como *Mercenaria mercenaria* (Gallager *et al.*, 1986), *Crassostrea virginica*

(Heffernan & Walker, 1989) e *Ruditapes decussatus* (Delgado & Pérez-Camacho, 2003).

Por sua vez, as proteínas não contribuem significativamente para a gametogénese, uma vez que este processo depende, em grande medida, da quantidade de glicogénio armazenado (Joaquim *et al.*, em publicação). Mas, por outro lado, as proteínas são componentes estruturais do tecido embrionário das larvas (García-Guerrero *et al.*, 2003).

Finalmente, os hidratos de carbono (constituídos por açúcares redutores livres e polissacarídeos) não são fontes principais de energia em ovos de organismos marinhos (Holland, 1978 e García-Guerrero *et al.*, 2003). No entanto, os hidratos de carbono são essenciais durante a embriogénese para a síntese de compostos específicos (Holland, 1978 e García-Guerrero *et al.*, 2003).

Em geral, o conteúdo bioquímico dos ovócitos de bivalves visa estabelecer critérios de qualidade de postura mas até agora só tem sido caracterizado os progenitores de *V. senegalensis*. O estudo da composição bioquímica dos ovócitos libertados por progenitores “selvagens” e a sua relação com os progenitores contribuirá para a definição de índices de qualidade (Massapina *et al.*, 1999). Tais índices podem ser aplicados a sistemas de maternidade e de engorda e também podem contribuir para o conhecimento do potencial reprodutivo da amêijoia-macha no meio natural.

Este trabalho visa avaliar a qualidade dos ovócitos de amêijoia-macha em função da sua composição bioquímica, tendo em vista a definição de índices de qualidade baseados em indicadores para a produção da espécie em maternidade. Neste sentido, foram definidos os seguintes objectivos específicos:

i) Determinação da composição bioquímica (lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, matéria orgânica e conteúdo energético) dos ovócitos resultantes de posturas de progenitores “selvagens” de amêijoia-macha, provenientes da Ria de Aveiro.

ii) Estabelecimento de relações entre a condição dos progenitores “selvagens”, as características da postura e a composição bioquímica dos ovócitos.

1.1. BIOLOGIA DA ESPÉCIE

1.1.1. TAXONOMIA

A espécie, em estudo, *Venerupis senegalensis* vulgarmente designada em Portugal por amêijoa-macha, foi inicialmente designada por *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Actualmente a sua sequência filogenética, dentro dos moluscos, é a seguinte (WoRMS, 2010):

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Sub-Classe: Heterodonta

Super-família: Veneroidea

Família: Veneridae

Género: *Venerupis*

Espécie: *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Nomes vulgares:

(P) Amêijoa-macha (Vieira, 1989)

(Es) Almeja babosa (Poutiers, 1987)

(En) Pullet carpet shell (Poutiers, 1987)

(Fr) Palourde bleue (Poutiers, 1987)

1.1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A espécie *V. senegalensis* distribui-se pelo Atlântico Oriental, desde o Norte da Noruega até à costa de Marrocos e ainda na costa mediterrânea (Camacho, 1991; Vília, 1992 e FAO, 2010) (Figura 2).



Figura 2 – Distribuição geográfica da *Venerupis senegalensis*. (Sealifebase, 2010)

Em Portugal, esta espécie predomina em zonas abrigadas da costa, como são os casos da Ria Formosa (Algarve), da Ria de Aveiro (Aveiro) e do estuário do Sado (Diniz, 1998).

1.1.3. HABITAT

A amêijoia-macha é uma espécie nativa da zona litoral entre o nível do intertidal e a região superior do subtidal, situadas em locais com comunicação com o mar, mas não batidas directamente por este (enseadas, rias e lagoas litorais) (Arrobas & Massapina, 1992; Vília, 1992; Lagarto, 2006 e Matias, 2007). Encontra-se enterrada no sedimento entre 5 e 6 cm presas por filamentos do bisso a um objecto sólido, com distribuição na vertical dependendo de vários factores como a consistência do sedimento, a densidade populacional, o estado fisiológico dos indivíduos, bem como o tamanho dos sifões (Matias, 2007).

A espécie escolhe preferencialmente areias finas, mais ou menos vasosas ou ainda vasas compactas, com maior ou menor mistura de elementos de maior granulometria (conchas, gravilha), desde as zonas costeiras (zona de entremáres) até profundidades de cerca de 30 m (Camacho, 1991; Vília, 1992; Schuller, 1998 e Lagarto, 2006).

1.1.4. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Venerupis senegalensis apresenta concha sólida equivalente, de contorno mais ou menos rombóide, alongada, grosseiramente quadrangular (Camacho, 1991) e com um fino desenho concêntrico (Schuller, 1998). A superfície da concha está esculpida por numerosas estrias concêntricas mais profundas (estrias de crescimento) e estrias radiais finas, formada por duas valvas simétricas de coloração externa semelhante, unidas por um filamento cuja inserção se apresenta pouco diferenciada (Camacho, 1991).

As valvas estão unidas por uma estrutura elástica situada na região posterior da concha. E as conchas estão unidas por dois músculos adutores posteriores fortemente inseridos na face interna das valvas (Pinto, 1998).

A coloração externa das valvas varia entre creme, cinzento claro e castanho claro, por vezes com raios e manchas em zigzag de cor castanho-escuro ou púrpura e a face interna é branca polida ou rosada e algumas vezes púrpura perto do bordo posterior. (Camacho, 1991 e Vília, 1992) (Figura 3).

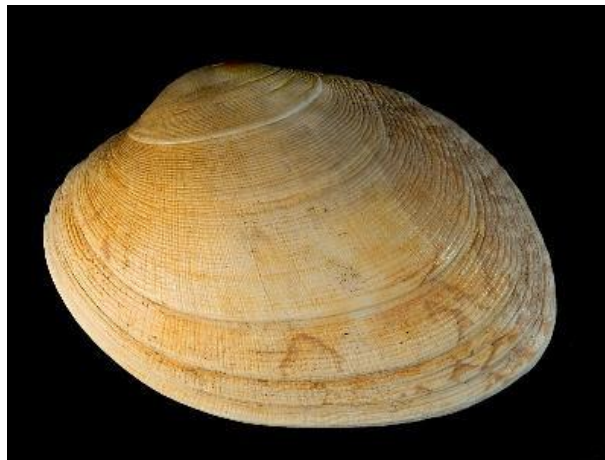


Figura 3 – Morfologia da concha *Venerupis senegalensis* (Marine Life Encyclopedia, 2010).

O corpo encontra-se revestido pelo manto, cuja função é segregar a concha. Os bordos do manto prolongam-se formando os sifões exalante e inalante, sendo este último utilizado no fornecimento do oxigénio e das partículas alimentares (Pinto, 1998). Esta espécie apresenta a particularidade dos dois sifões estarem completamente unidos em toda a sua longitude (Camacho, 1991). Na cavidade do manto situa-se a massa visceral.

As gónadas encontram-se na massa visceral em posição anterior e dorsolateral, e ocupam inicialmente um pequeno espaço e aquando da maturação aumentam significativamente e tendem a invadir o interior do manto (Lagarto, 2006).

1.2. CICLO DE VIDA

1.2.1. REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO

A espécie em estudo é gonocórica (sexos separados), embora possam apresentar traços de hermafroditismo juvenil, que porém, desaparecem antes de atingirem o estado funcional das gónadas (Vília, 1992; Lagarto, 2006; Matias, 2007).

O sistema reprodutor da *V. senegalensis* é constituído por um par de gónadas e pelos respectivos gonoductos. O aspecto e a dimensão das gónadas sofrem alterações muito acentuadas, em função quer da idade quer, principalmente, da fase do ciclo reprodutivo em que os indivíduos se encontram (Vília, 1992).

Segundo Vília (1992), a primeira maturação ocorre ao fim do primeiro ano (26-27 mm de comprimento) de vida. Contudo, Maia *et al.* (2006) relatam a primeira maturação aos 22 mm de comprimento.

O ciclo reprodutivo da amêijoa-macha é o resultado de um equilíbrio entre factores exógenos (salinidade, alimento, temperatura, luz e fases lunares) e factores endógenos (reservas alimentares, ciclo hormonal e genótipo) (Maia *et al.*, 2006). A interacção entre estes factores assegura um sincronismo no desenvolvimento gametogénico e na postura. Vários autores apontam que a relação entre a temperatura e a disponibilidade do alimento são os factores como maior relevância (Maia *et al.*, 2006).

Na Ria de Aveiro, a postura apresenta um período extenso que se prolonga entre a Primavera e o Outono, em emissões parciais (Maia *et al.*, 2006 e Joaquim *et al.*, *em publicação*). Segundo Maia *et al.* (2006), na Ria de Aveiro a espécie *V. senegalensis* inicia a gametogénese em Dezembro, a postura entre Março e Novembro e segue-se um período de repouso sexual até Janeiro. Contudo, Joaquim *et al.* (*em publicação*) relatam o início da gametogénese no fim do Verão/início de Outono, a postura entre o fim do Inverno e o início do Verão e o repouso sexual no fim do Verão. As variações encontradas, entre autores, no início e no final de cada período do ciclo reprodutivo

podem dever-se a alterações nos factores ambientais que influenciam o ciclo reprodutivo da espécie.

A fecundação é externa, sendo os gâmetas expelidos para a coluna de água, através do sifão exalante e o número de ovócitos que uma fêmea pode emitir oscila entre 800 000 e 2 000 000 (Camacho & Cabello, 1973). Se a fecundação tardar em ocorrer por falta de condições ambientais que a favoreçam, os ovócitos degeneram (Lagarto, 2006).

A emissão dos gâmetas e o desenvolvimento larvar são condicionados por factores ambientais, fundamentalmente, a temperatura. Assim, a temperatura mínima de emissão dos gâmetas situa-se entre os 12-15°C (iniciando-se na costa portuguesa nos meses de Março a Maio) (Vília, 1992; Maia *et al.*, 2006 e Joaquim *et al.*, *em publicação*). A fase de desenvolvimento larvar prolonga-se por 16 a 21 dias, encontrando as temperaturas óptimas entre 25 e 26°C. (Camacho, 1980; Vília, 1992 e Lagarto, 2006).

Após a fecundação dá-se o desenvolvimento embrionário. A incubação é a fase do desenvolvimento larvar compreendida entre o ovo e a fase de larva velígera. Em poucas horas, ocorre o aparecimento da larva trocófora, que gradualmente se vai transformando na larva velígera (cerca de 48 horas após a fecundação). Esta larva é caracterizada pelo aparecimento de uma concha transparente, que cobre todas as partes moles, cujo tamanho varia entre 90 e 110 µm (Camacho & Cabello, 1973). No final do período larvar tem início a metamorfose que lhes confere a forma definitiva e permite a fixação no sedimento através do pé. Nesta fase o tamanho varia entre 220 e 230 µm, passando da fase pelágica para a fase bentónica definitiva (Camacho & Cabello, 1973). São então designadas por pós-larva, juvenis ou semente.

1.2.2. CRESCIMENTO

O desenvolvimento bentónico é fundamentalmente condicionado pela temperatura e pela disponibilidade de alimento, contudo outros factores ambientais, como sejam a salinidade, a composição do sedimento ou a concentração do oxigénio dissolvido também podem ter uma influência preponderante (Parache, 1982; Vília, 1992 e Lagarto, 2006).

O crescimento dos lamelibrânquios só termina com a sua morte (Banha, 1984 e Matias, 2007). Os seus índices de crescimento diminuem gradualmente à medida que os

animais envelhecem, sendo o seu tamanho limite determinado pelas condições do meio (essencialmente temperatura e disponibilidade de alimento) (Banha, 1984 e Matias, 2007).

1.2.3. NUTRIÇÃO

As amêijoas, tal como todos os restantes bivalves, alimentam-se por filtração, tanto de materiais em suspensão na interface água-sedimento (regime alimentar suspensívoro) (Parache, 1982 e Vília, 1992), como de materiais provenientes da ressuspensão de depósitos de natureza diversa (regime alimentar depositívoro) (Valence & Peyre, 1989 e Vília, 1992). Os bivalves necessitam de filtrar um enorme volume de água de forma a extraírem a quantidade de alimento necessário ao seu desenvolvimento. Este processo é efectuado por microfagia e pelos movimentos ciliares das brânquias que forçam a entrada da água na cavidade do manto através do sifão inalante. As partículas são capturadas por uma secreção mucosa produzida pelas brânquias e pelo manto e são levadas pelos cílios branquiais para a região cefálica. Nesta região os palpos labiais seleccionam as partículas, eliminando as de maiores dimensões, as excedentes e a matéria inorgânica (areia e outros detritos de natureza variada) sob a forma de pseudo-fezes (aglutinados de muco com a forma de filamentos) por contracção do sifão exalante e enviando para a boca as que vão servir de alimento (Vília, 1992 e Matias, 2007).

O regime alimentar dos bivalves é variado, englobando algas planctónicas, diatómaceas e outras microalgas, bactérias, protistas, ovos, larvas de invertebrados, partículas do sedimento, fibras vegetais e outros detritos de origem diversa (Franc, 1960; Vília, 1992; Lagarto, 2006 e Matias, 2007).

A relação entre a disponibilidade de alimento, acumulação de reservas e actividade reprodutiva nos bivalves varia consoante as condições ambientais. Na amêijoas-macha, as reservas de nutrientes acumulam-se quando o alimento é abundante antes da gametogénese na forma de glicogénio e lípidos, sendo posteriormente usadas para a síntese de gâmetas quando o gasto metabólico é elevado (Joaquim *et al.*, em publicação). A energia derivada do alimento e destinada à gametogénese depende do processo acumulativo de energia durante os períodos de maior alimento (Joaquim, 1997 e Joaquim *et al.*, em publicação).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Atendendo aos objectivos do estudo, a qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoia-macha foi avaliada através da determinação dos seus constituintes bioquímicos: lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, matéria orgânica e respectivos valores energéticos dos ovócitos resultantes da postura dos progenitores.

Neste estudo, os progenitores de *Venerupis senegalensis* são provenientes da Ria de Aveiro (Figura 1). A amostragem foi efectuada entre 21 de Fevereiro de 2006 e 12 de Outubro de 2007, quinzenalmente. As amêijoas foram transportadas para a Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira, em arcas refrigeradas. Sendo posteriormente acondicionadas até se dar início à estimulação térmica (dois dias após a captura).

Paralelamente a este trabalho, foi efectuada a caracterização fisiológica e bioquímica dos progenitores. Estes resultados foram analisados e deram origem a um artigo (Joaquim *et al.*, *em publicação*), o qual, embora não fazendo parte integrante desta tese, foi utilizado de modo a estabelecer relações entre a qualidade dos progenitores e a qualidades dos ovócitos. Os resultados obtidos nesse estudo encontram-se sumarizados na Tabela 1 (Anexo I).

2.1.1. INDUÇÃO DA POSTURA

Foram usadas amêijoas adultas de 35 a 45 mm de comprimento como progenitores.

Por cada fêmea que emitiu foram recolhidos aproximadamente, 50 mil ovócitos em triplicado. As fêmeas, cuja fecundidade não permitia a recolha dos três replicados foram descartadas deste estudo. A recolha dos ovócitos foi efectuada com a ajuda de seringas. Esta solução foi concentrada num filtro (MILLIPORE HA, 0,45 µm) e lavada, posteriormente, com formato de amónia a 0,3% (P/V) de forma a eliminar os sais minerais presentes na água do mar. Seguidamente, as amostras foram guardadas em

água destilada, em tubos de polietileno e conservada a -20°C para a sua posterior liofilização (SAVANT). Posteriormente, procedeu-se à pesagem das amostras numa balança METTLER TOLEDO com precisão até a micrograma.

2.2. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DOS CONSTITUINTES

A espectroscopia de absorção UV-Visível é a técnica utilizada neste estudo para a determinação dos vários constituintes bioquímicos (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) nos ovócitos. A espectroscopia visível e ultravioleta é aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos devido à sua sensibilidade, reprodutibilidade e fácil manuseamento (Gonçalves, 1990).

A luz UV-Visível é suficientemente energética para promover electrões para níveis de energia mais elevados, quando ocorre absorção de radiação em qualquer zona do espectro, a substância absorvente passa de um nível de energia para outro de maior energia (Gonçalves, 1990). Neste estudo utilizou-se um espectrofotómetro de feixe duplo, onde o feixe de radiação é dividido em dois feixes, com intensidades e distribuições espectrais idênticas. Um dos feixes passa através da célula referência contendo o branco e o outro feixe passa através da célula que contém a amostra. A luz incidente I_0 de um dado comprimento de onda incide na solução contendo a substância que a absorve em parte (Gonçalves, 1990). I é a intensidade da luz que não é absorvida pela solução (Gonçalves, 1990). A lei de Lambert-Beer descreve a absorção de luz feita por uma solução de concentração, C , a um dado comprimento de onda (Gonçalves, 1990):

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times C \times l$$

A = Absorvância

ε = Absortividade molar ($\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)

C = Concentração (mol L^{-1})

l = Percurso Óptico (cm)

Para a determinação dos constituintes bioquímicos utilizou-se o espectrofotómetro UV-Vis THERMO ELECTRON GENESYS 6 e cuvetes de quartzo de 10 mm. O método consiste na determinação dos lípidos, proteínas e hidratos de

carbono por leitura espectrométrica no UV-Visível, nos comprimentos de onda 375, 750 e 420 nm, respectivamente.

2.3. REAGENTES E PADRÕES

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade analítica reconhecida: formato de amónia (NH_4HCO_2) (Merck), clorofórmio (CHCl_3) (Panreac), metanol (CH_3OH) (Merck), ácido tricloroacético (TCA) (Panreac), hidróxido de sódio (NaOH) (Sigma), ácido clorídrico (HCl) (Panreac), ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (Sigma), ácido silícico (Riedel de Haën), tartarato dissódico ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$) (Sigma), carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Riedel de Haën), sulfato de cobre (CuSO_4) (Sigma), cianeto de potássio (KCN) (Merck), reagente de Folin - Colciteau (Merck e Sigma) e água destilada (H_2O).

Foram preparados reagentes a partir de vários compostos químicos:

- *Reagente A*: 0,2 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ + 10 g de Na_2CO_3 + 69 mL de NaOH 0,8M e perfazer a 100 mL com H_2O .
- *Reagente B*: 2 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ + 1 g de CuSO_4 + 12,5 mL de NaOH 0,8M e perfazer a 100 ml com H_2O .
- *Reagente I*: 25 mL de NaOH 0,8M + 18 mL do reagente A + 2 mL do reagente B
- *Reagente C*: Reagente Folin – Colciteau : H_2O (1:2)
- *Reagente carbonato/cianeto*: 500 μL de Na_2CO_3 a 16% + 30 μL KCN 5% e perfazer até 10 mL com H_2O .

Foram efectuadas curvas de calibração para cada constituinte bioquímico em estudo (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) usando diferentes concentrações e um branco. Utilizaram-se padrões de tripalmitina (Sigma), seroalbumina bovina (Sigma) e glucose (Sigma), respectivamente. A partir destes padrões preparam-se as soluções de trabalho correspondentes ao intervalo de concentrações aplicado ao constituinte bioquímico.

Para cada constituinte bioquímico, efectuou-se a validação do método analítico através dos parâmetros de validação (Tabela 1, Anexo II): gama de trabalho, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (Guia Relacre, 2000). Por definição, o LD do método corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é provável detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável,

embora não haja quantificação do valor exacto (Guia Relacre, 2000), logo as amostras com concentrações abaixo do LD não foram tidas em conta neste estudo.

2.4. FRACCIÓNAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a determinação dos componentes bioquímicos, o fraccionamento seguido foi o método descrito por Holland & Gabbott (1971).

A partir de 227 e até 2074 μg de material biológico iniciou-se o processo de fraccionamento, ao qual se adicionaram 500 μL de H_2O . A metodologia de recolha dos ovócitos pode não ter sido a mais eficaz, visto não se conseguir obter em todos os replicados a quantidade média de 50 mil ovócitos.

De forma a obter a ruptura e desagregação dos tecidos dos ovócitos, as amostras foram submetidas a um tratamento ultrasonoro a frio mediante um aparelho de ultrasounds VIBRACELL SONICS & MATERIALS. Este processo consistiu na aplicação de impulsos de 20 watts de potência durante 3 intervalos de 10 segundos, evitando o aquecimento e a conseqüente degradação dos tecidos. Todo o processo decorreu mantendo as amostras a uma temperatura de 0 a 4°C. Após homogeneização foram retiradas duas amostras de 200 μL para dois Eppendorf's, as quais sofreram diferentes esquemas de fraccionamento (Figura 4).

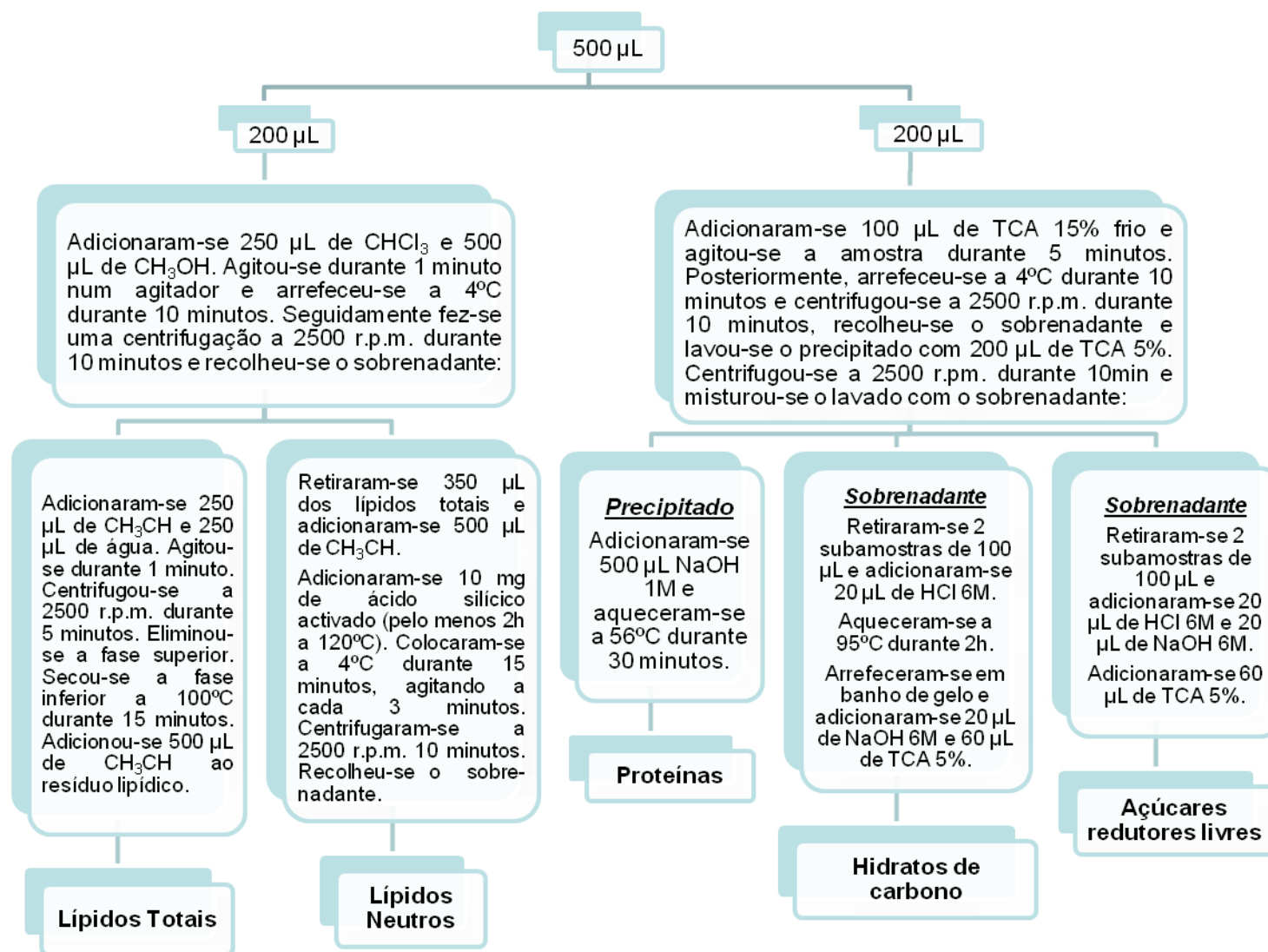


Figura 4 – Esquema de fraccionamento das amostras.

2.5. DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES BIOQUÍMICOS

i) Lípidos totais

Os lípidos totais foram determinados pelo método de Marsh & Weinstein (1966). Foi retirada uma toma de 150 μL dos lípidos fraccionados de cada amostra e foi colocada em tubo de vidro na estufa durante 15 minutos a 100°C para evaporar o solvente (CHCl_3). Adicionou-se 500 μL de H_2SO_4 e agitaram-se os tubos. Aqueceram-se a 200°C durante 30 minutos. Após o arrefecimento foi adicionado 1,5 mL de H_2O e agitaram-se novamente. Quando as amostras arrefeceram foram determinadas as respectivas absorvâncias. As curvas de calibração (Figura 1, Anexo II) foram obtidas a partir do padrão tripalmitina com 5 concentrações diferentes, variando entre 5 e 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e um branco (500 μL de CHCl_3). Para cada concentração de padrão foram feitas 7 réplicas.

ii) Lípidos neutros

Para a determinação dos lípidos neutros foi seguido o método de Marsh & Weinstein (1966) descrito anteriormente com duas alterações: retirou-se uma toma de 200 μL da amostra fraccionada e as amostras foram para a estufa a 100°C durante 20 minutos. O restante método não sofreu alterações.

iii) Fosfolípidos

O conteúdo de fosfolípidos foi determinado com base na diferença entre o teor bioquímico dos lípidos totais e dos lípidos neutros.

iv) Proteínas

As proteínas foram determinadas segundo o método de Lowry *et al.* (1951) modificado por Bensadoun & Weinstein (1976) e Hess *et al.* (1978) usando o soroalbumina como padrão.

Partindo de 2 tomas de 50 μL de proteínas, adicionaram-se 450 μL de reagente I e 300 μL de reagente C a cada amostra. Agitaram-se e foram adicionados mais 300 μL de reagente C. Após nova agitação, as amostras foram a incubar no escuro durante 45 minutos. Posteriormente, determinou-se a absorvância. As curvas de calibração (Figura 2, Anexo II) para as proteínas obtiveram-se a partir do padrão soroalbumina bovina com

6 concentrações diferentes, variando entre 5 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e um branco (50 μL de H_2O). O número de réplicas para cada padrão foi de 7.

v) Hidratos de carbono e Açúcares Redutores Livres

A determinação dos hidratos de carbono e açúcares redutores livres foi efectuada de acordo com o método Holland & Gabbott (1971). Às amostras foram adicionados 500 μL de NaOH 0,625%, 100 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,2% e 200 μL de reagente carbonato/cianeto (descrito na página 24), sendo estas, seguidamente, colocadas a aquecer a 95°C durante 15 minutos. Após o arrefecimento em banho de água, adicionaram-se 500 μL de H_2O . Posteriormente, foi determinada a absorvância. A curva de calibração (Figura 3, Anexo II) obteve-se a partir do padrão glucose com 5 concentrações diferentes, variando entre 1,25 e 15,00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e um branco (200 μL de H_2O). Para cada padrão foram feitas 8 réplicas.

vi) Polissacarídeos

Os polissacarídeos foram determinados com base na diferença entre o teor dos hidratos de carbono e dos açúcares redutores livres.

vii) Matéria orgânica

O conteúdo em matéria orgânica foi determinado com base na soma dos constituintes bioquímicos determinados anteriormente (lípidos totais + proteínas + hidratos de carbono).

viii) Valor energético

Os factores de conversão em energia para os lípidos, hidratos de carbono e proteínas foram 35,24; 17,16 e 18,00 kJ g^{-1} , respectivamente (Beukema & De Bruin, 1979).

Os resultados relativos às proteínas, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, hidratos de carbono, açúcares redutores livres e polissacarídeos encontram-se expressos em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de peso seco. A composição de hidratos de carbono (açúcares redutores livres e polissacarídeos) e de lípidos totais (lípidos neutros e fosfolípidos) foi, também, expressa em percentagem de hidratos de carbono e de lípidos totais, respectivamente.

2.6. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente atendendo aos objectivos do estudo. Os dados expressos em percentagem foram modificados pela transformação arcoseno ($\arcsen \sqrt{y}$) para assumirem uma distribuição normal e homogeneização de variâncias, permitindo a comparação estatística (Maroco, 2007).

A comparação entre e dentro (entre fêmeas) das amostragens das variáveis independentes foi realizada através de testes paramétricos e não-paramétricos. Após garantir as condições dos testes paramétricos: independência das observações, homogeneidade de variâncias populacionais (através do teste de Levene) e normalidade das distribuições da variável (através do teste de Kolmogorov-Smirnov) aplicou-se o Método de Análise de Variâncias (ANOVA) (Maroco, 2007). Quando as condições da estatística paramétrica não são satisfeitas utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis como alternativa a ANOVA (Maroco, 2007).

As comparações múltiplas entre pares foram executadas usando o teste paramétrico de Tukey ou o teste não-paramétrico Dunn's, a fim de detectar as diferenças significativas entre amostras consecutivas.

As hipóteses estabelecidas neste trabalho visaram explicar a variabilidade ou não dos parâmetros. Na hipótese nula não existem diferenças significativas entre os parâmetros em estudo para um nível de significância de 5% ($p > 0,05$).

Com o objectivo de avaliar a relação entre os parâmetros estudados foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman devido à presença de dados não-paramétricos. Deste modo, foram calculados os coeficientes de correlação entre os diferentes parâmetros e determinaram-se os níveis de significância das relações encontradas, através de uma tabela de coeficiente de correlação.

Foram determinados os coeficientes de correlação e os respectivos níveis de significância entre os vários constituintes dos ovócitos e entre os vários constituintes bioquímicos dos ovócitos e os parâmetros dos progenitores de *V. senegalensis* obtidos em Joaquim *et al.* (em publicação).

Sendo um dos objectivos desta tese, encontrar relações significativas entre os vários parâmetros estudados, das relações encontradas com um intervalo de confiança superior a 95% ($p > 0,05$) e que revelaram interesse biológico, foram representadas sobre o modelo estatístico de regressão linear ($y = a + bx$).

Ao contrário da correlação, onde existe simetria, a relação linear é um modelo estatístico que tem como objectivo quantificar a relação algébrica, apresentada pela equação da recta de regressão, de uma quantidade y em função de uma quantidade x . Quando esta relação entre parâmetros não apresenta uma influência importante, a recta de regressão de y em x apresenta-se paralela ao eixo do xx (Schwartz, 1984).

O tratamento estatístico foi efectuado com o auxílio de softwares informáticos: Microsoft Office Excel 2007 e SigmaStat 3.5 (2006).

3. RESULTADOS

3.1. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DOS OVÓCITOS

Na Tabela 1, encontram-se os teores médios ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de peso seco) dos vários constituintes bioquímicos (proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos e matéria orgânica) e energia total dos ovócitos emitidos por *V. senegalensis*, durante o ano de 2006 até Outubro de 2007.

Durante este período, existiram amostragens em que os progenitores não responderam positivamente à estimulação térmica ou emitiram ovócitos em quantidades insuficientes para a análise.

As proteínas foram o constituinte bioquímico mais predominante (18-38 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) seguido pelos lípidos totais (7-17 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco) e hidratos de carbonos (1-3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco).

Tabela 1 – Teores médios ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de peso seco \pm desvio padrão) de proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos, lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, matéria orgânica total e energia total dos ovócitos de *V. senegalensis* durante o período de amostragem.

Ano	Data	Mês	Proteínas ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	HC ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	ARL ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	PS ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	LT ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	LN ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	FL ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ peso seco)	MO (μg)	Energia Total ($\text{KJ } \mu\text{g}^{-1}$)
2006	21-02	Fev	20,77 \pm 5,78	1,38 \pm 0,39	1,19 \pm 0,22	0,26 \pm 0,17	7,15 \pm 3,58	2,92 \pm 1,44	4,76 \pm 3,27	28,94 \pm 6,53	5,74 \pm 2,07
	09-03	Mar	28,62 \pm 8,67	1,63 \pm 0,57	1,41 \pm 0,46	0,35 \pm 0,31	8,27 \pm 5,03	3,88 \pm 2,69	5,72 \pm 4,47	40,27 \pm 12,09	7,70 \pm 3,49
	22-03	Mar					Sem desova				
	06-04	Abr	27,16 \pm 8,61	2,21 \pm 0,56	1,28 \pm 0,65	0,38 \pm 0,32	8,35 \pm 3,10	3,32 \pm 1,39	5,57 \pm 2,97	39,90 \pm 10,64	8,56 \pm 2,50
	21-04	Abr	28,85 \pm 7,22	1,82 \pm 0,89	1,97 \pm 0,89	0,58 \pm 0,60	9,07 \pm 4,87	3,79 \pm 2,77	6,28 \pm 4,39	39,93 \pm 9,91	8,72 \pm 2,50
	05-05	Mai					Sem desova				
	19-05	Mai	28,22 \pm 4,65	2,38 \pm 0,98	1,83 \pm 0,55	0,70 \pm 0,67	10,91 \pm 6,56	3,48 \pm 1,16	6,71 \pm 3,73	40,87 \pm 5,57	8,88 \pm 2,22
	21-06	Jun	32,22 \pm 6,03	2,06 \pm 0,77	1,87 \pm 0,50	0,54 \pm 0,57	10,96 \pm 4,97	4,65 \pm 3,14	7,56 \pm 2,94	43,69 \pm 6,68	9,00 \pm 2,03
	07-07	Jul	38,04 \pm 6,84	2,11 \pm 1,27	2,09 \pm 1,17	0,50 \pm 0,62	12,32 \pm 5,30	5,26 \pm 2,43	6,81 \pm 2,99	48,59 \pm 5,97	10,20 \pm 1,05
	21-07	Jul					Sem desova				
	04-08	Ago	18,07 \pm 10,39	1,50 \pm 0,40	1,16 \pm 0,33	0,50 \pm 0,35	10,28 \pm 4,64	2,61 \pm 0,51	8,95 \pm 5,25	10,28 \pm 7,46	7,63 \pm 0,34
	18-08	Ago					Sem desova				
	01-09	Set					Nº ovócitos insuficiente				
	15-09	Set					Nº ovócitos insuficiente				
	20-10	Out					Nº ovócitos insuficiente				
	10-11	Nov					Sem desova				
24-11	Nov	26,62 \pm 4,4	2,47 \pm 2,12	6,39 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	16,31 \pm 5,52	4,86 \pm 2,08	10,49 \pm 3,85	56,76 \pm 9,24	11,83 \pm 2,94	
11-12	Dez					Sem desova					
2007	05-01	Jan					Nº ovócitos insuficiente				
	19-01	Jan	33,22 \pm 5,84	2,05 \pm 0,61	1,67 \pm 0,41	0,62 \pm 0,45	9,66 \pm 3,07	3,18 \pm 1,24	7,18 \pm 2,35	45,75 \pm 6,76	9,70 \pm 1,76
	01-02	Fev	33,61 \pm 6,90	3,08 \pm 1,37	2,74 \pm 0,67	1,04 \pm 1,07	13,57 \pm 4,48	4,71 \pm 1,98	10,34 \pm 3,00	52,18 \pm 12,13	10,84 \pm 3,22
	16-02	Fev	31,59 \pm 6,86	1,70 \pm 0,49	1,35 \pm 0,48	0,52 \pm 0,44	9,21 \pm 4,84	3,46 \pm 1,56	5,83 \pm 3,95	41,14 \pm 8,01	9,15 \pm 1,89
	02-03	Mar	31,94 \pm 8,91	1,96 \pm 0,73	1,57 \pm 0,47	0,46 \pm 0,42	7,83 \pm 3,17	2,79 \pm 1,30	5,61 \pm 2,63	40,50 \pm 6,76	8,29 \pm 2,36
	16-03	Mar	34,69 \pm 9,75	1,69 \pm 0,56	1,42 \pm 0,42	0,50 \pm 0,37	7,93 \pm 3,91	3,98 \pm 2,47	4,28 \pm 2,93	43,86 \pm 10,92	8,70 \pm 1,43
	13-04	Abr					Sem desova				
	04-05	Mai					Nº ovócitos insuficiente				
	21-05	Mai					Sem desova				
	22-06	Jun	30,68 \pm 5,67	2,22 \pm 0,61	1,69 \pm 0,58	0,64 \pm 0,46	10,78 \pm 4,43	3,73 \pm 0,88	7,73 \pm 3,80	44,46 \pm 6,55	9,60 \pm 2,27
	13-07	Jul	27,99 \pm 8,54	3,14 \pm 1,68	2,91 \pm 0,50	1,11 \pm 0,60	17,06 \pm 8,05	7,26 \pm 3,69	11,54 \pm 5,93	43,98 \pm 10,53	10,40 \pm 2,24
	27-07	Jul					Nº ovócitos insuficiente				
	24-08	Ago					Sem desova				
	07-09	Set					Sem desova				
21-09	Set					Sem desova					
12-10	Out					Sem desova					

Os resultados da variação dos teores médios de proteínas ao longo do período de amostragem, encontram-se representados na Figura 5.

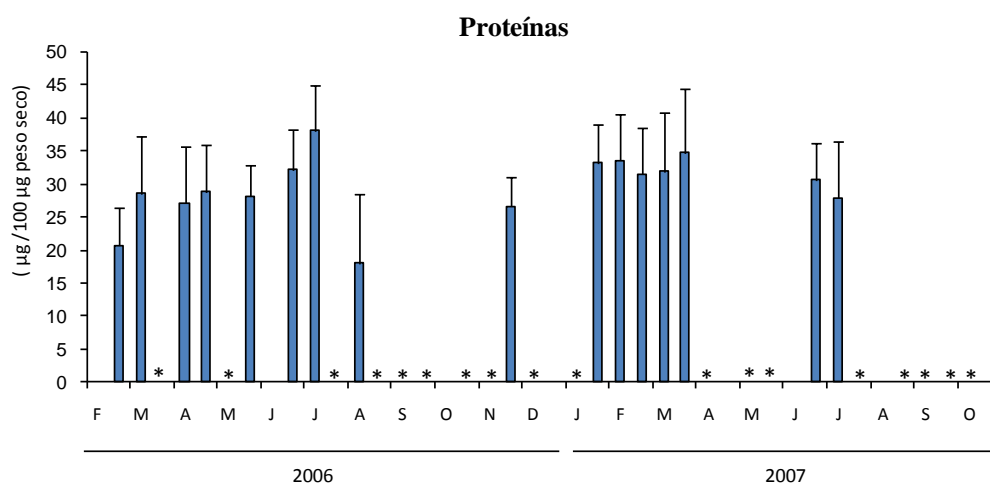


Figura 5 - Variação média (\pm desvio padrão) de proteínas presente nos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

O conteúdo em proteínas nos ovócitos apresentou um aumento entre Fevereiro e Julho de 2006, excepto nas amostragens do início de Abril e em Maio, onde se verificou uma ligeira diminuição. A amostragem de Julho de 2006 correspondeu ao valor máximo ($38,1 \pm 6,9$ $\mu\text{g}/100$ μg peso seco) de proteínas obtido, durante o período de amostragem. Na amostragem seguinte, Agosto de 2006 verificou-se o valor mínimo ($18,1 \pm 10,4$ $\mu\text{g}/100$ μg peso seco). Em Novembro de 2006 ocorreu uma subida do teor de proteínas, em relação ao último mês amostrado (Agosto). Durante o ano de 2007 não se verificaram grandes oscilações no teor em proteínas nos ovócitos de *V. senegalensis*. Este constituinte bioquímico manteve-se relativamente alto, verificando-se valores acima dos 28 $\mu\text{g}/100$ μg peso seco.

Estatisticamente, verificou-se que existiram diferenças significativas entre os anos de amostragem (K-W., $H=24,804$ $d.f.=1$, $p<0,001$), entre períodos de amostragem (Tabela 1, Anexo III) (K-W., $H=100,899$ $d.f.=15$, $p<0,001$) e entre fêmeas da mesma amostragem ($p<0,05$).

Os resultados relativos ao conteúdo de hidratos de carbono ao longo do período de amostragem encontram-se representados na Figura 6.

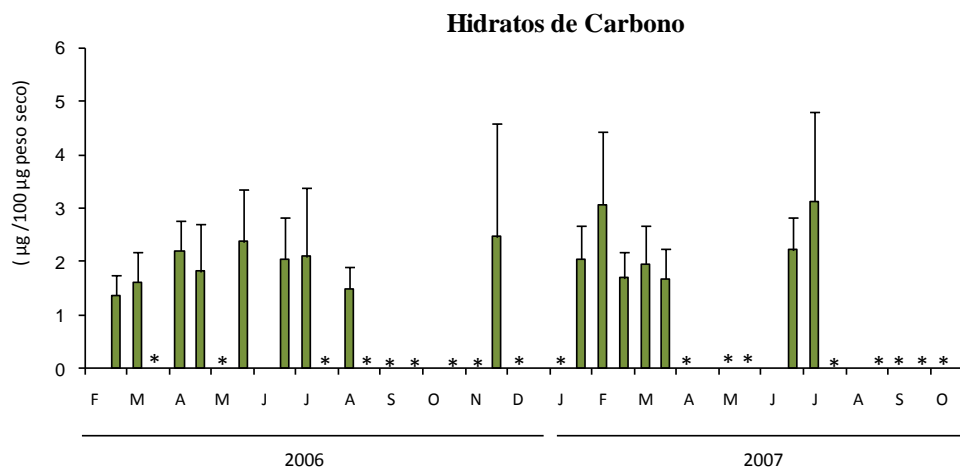


Figura 6 - Variação média (\pm desvio padrão) de hidratos de carbono presente nos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

Durante o período de amostragem, verificaram-se oscilações do teor em hidratos de carbono, registando-se um aumento entre Fevereiro e Maio de 2006, excepto na amostragem efectuada no fim de Abril, onde ocorreu um decréscimo. Tal como para o teor de proteínas, também os hidratos de carbono decresceram acentuadamente em Agosto de 2006 e voltaram a subir em Novembro do mesmo ano. No ano de 2007, ocorreu uma ligeira subida em Janeiro e início de Fevereiro, registando-se posteriormente um decréscimo até final do mês de Março, excepto na amostragem do início de Março, onde houve um ligeiro aumento. Durante a amostragem dos meses de Junho e Julho verificou-se um aumento do conteúdo em hidratos de carbono nos ovócitos de *V. senegalensis*.

O conteúdo mínimo de hidratos de carbono presente nos ovócitos foi atingido em Fevereiro de 2006 ($1,4 \pm 0,4$ µg/100 µg peso seco) e o conteúdo máximo foi atingido em Julho de 2007 ($3,2 \pm 1,7$ µg/100 µg peso seco).

Estatisticamente, verificaram-se diferenças significativas entre os anos de amostragem (K-W., $H=24,897$ $d.f.=1$, $p<0,001$), entre períodos de amostragem (Tabela 2, Anexo III) (K-W., $H=127,274$ $d.f.=15$, $p<0,001$) e entre fêmeas da mesma amostragem ($p<0,05$).

Os resultados da variação do teor de lípidos totais ao longo do período de amostragem encontram-se representados na Figura 7.

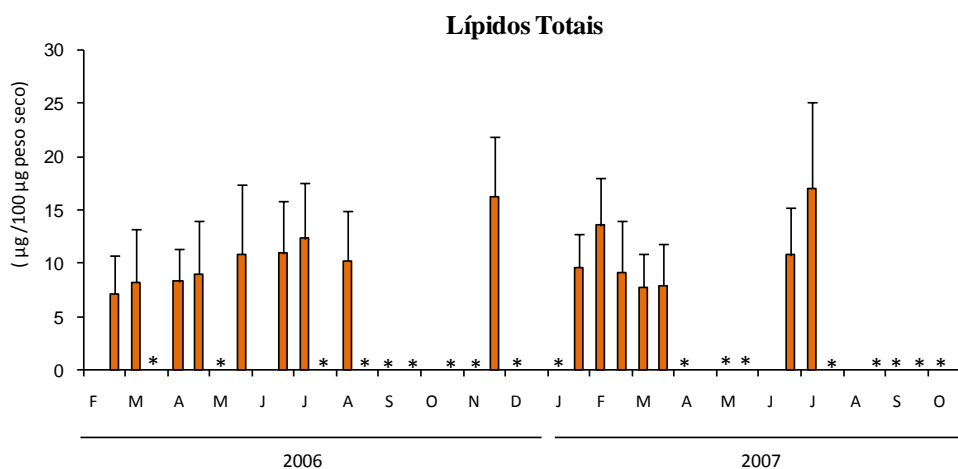


Figura 7 - Variação média (\pm desvio padrão) de lípidos totais presente nos ovócitos de amêijoia-macha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

Através da Figura 7, verifica-se uma subida do conteúdo em lípidos totais desde Fevereiro até Julho de 2006, ocorrendo um decréscimo na amostragem seguinte. Em Novembro de 2006, registou-se o valor mais elevado ($16,4 \pm 5,6 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco). O valor mínimo corresponde a Fevereiro de 2006 ($7,2 \pm 3,6 \mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ peso seco).

Entre Janeiro e Fevereiro de 2007 ocorreu um aumento do teor em lípidos totais, seguindo-se um decréscimo até ao início de Março de 2007. Nas amostragens de Junho e Julho deste ano verificou-se uma recuperação do teor em lípidos totais dos ovócitos. De um modo geral, a variação deste componente bioquímico ao longo do período de amostragem assemelha-se ao verificado para as proteínas e para os hidratos de carbono.

Não se verificou a existência de diferenças significativas entre anos de amostragem (K-W., $H=1,659$ $d.f.=1$, $p=0,198$). No entanto, existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Tabela 3, Anexo III) (K-W., $H=62,790$ $d.f.=15$, $p<0,001$) e entre fêmeas da mesma amostragem ($p<0,05$).

A variação da composição dos hidratos de carbono em açúcares redutores livres e polissacarídeos, ao longo do período de amostragem, encontra-se representada na Figura 8.

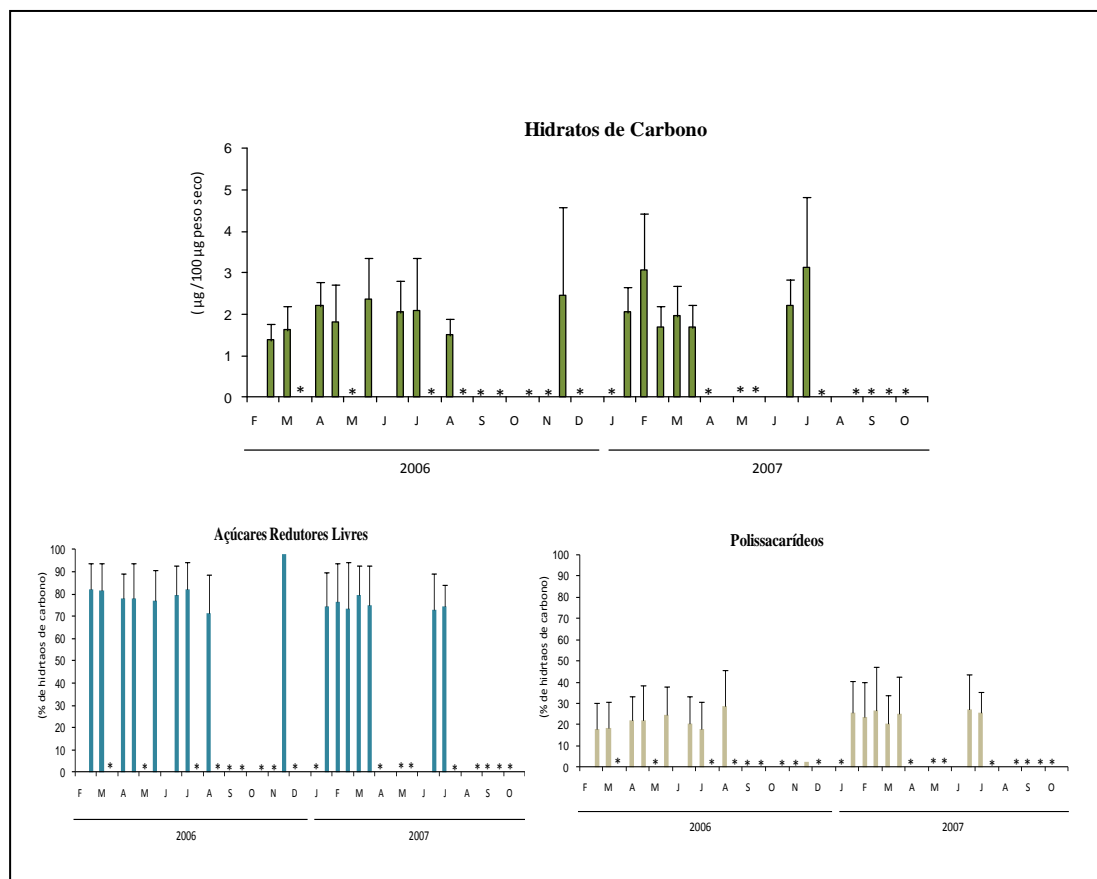


Figura 8 - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa de açúcares redutores livres e polissacarídeos na composição dos hidratos de carbono presentes nos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

Os açúcares redutores livres mantêm-se relativamente estáveis ao longo do período experimental comparativamente com os polissacarídeos. O teor mínimo corresponde a amostragem de Agosto de 2006 ($71,5 \pm 17,1$ % de hidratos de carbono), coincidindo com a diminuição generalizada nos outros constituintes bioquímicos. Em Novembro de 2006 atingiu-se o teor mais elevado ($97,7$ % de hidratos de carbono), sendo importante salientar que este valor corresponde apenas a uma amostra.

No entanto, estatisticamente, foram encontradas diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p=0,023$) e entre fêmeas da mesma amostragem ($p<0,05$). Mas não existiram diferenças significativas entre os períodos de amostragem (ANOVA, $p=0,618$), realçando que a amostragem de Novembro de 2006 não entrou no teste estatístico devido a corresponder a uma única amostra.

Relativamente aos polissacarídeos, verificou-se que este componente dos hidratos de carbono aumentou desde de Fevereiro até Maio de 2006, decresceu nas duas amostragens seguintes e voltou a aumentar em Agosto de 2006, onde se verificou o valor mais elevado ($28,6 \pm 17,1$ % de hidratos de carbono) do período de amostragem. Em Novembro de 2006 foi registado o valor mais baixo (2,4 % de hidratos de carbono) de polissacarídeos. Durante o ano de 2007 verificaram-se pequenas oscilações no teor em polissacarídeos nos ovócitos de *V. senegalensis*, verificando-se, sempre valores acima dos 20 % de hidratos de carbono.

No caso dos polissacarídeos, existiram diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p=0,023$) e entre fêmeas da mesma amostragem ($p<0,05$) mas não se verificaram diferenças significativas entre períodos de amostragem (ANOVA, $p=0,618$).

A variação da composição dos lípidos totais em lípidos neutros e fosfolípidos, ao longo do período de amostragem, encontra-se representada na Figura 9.

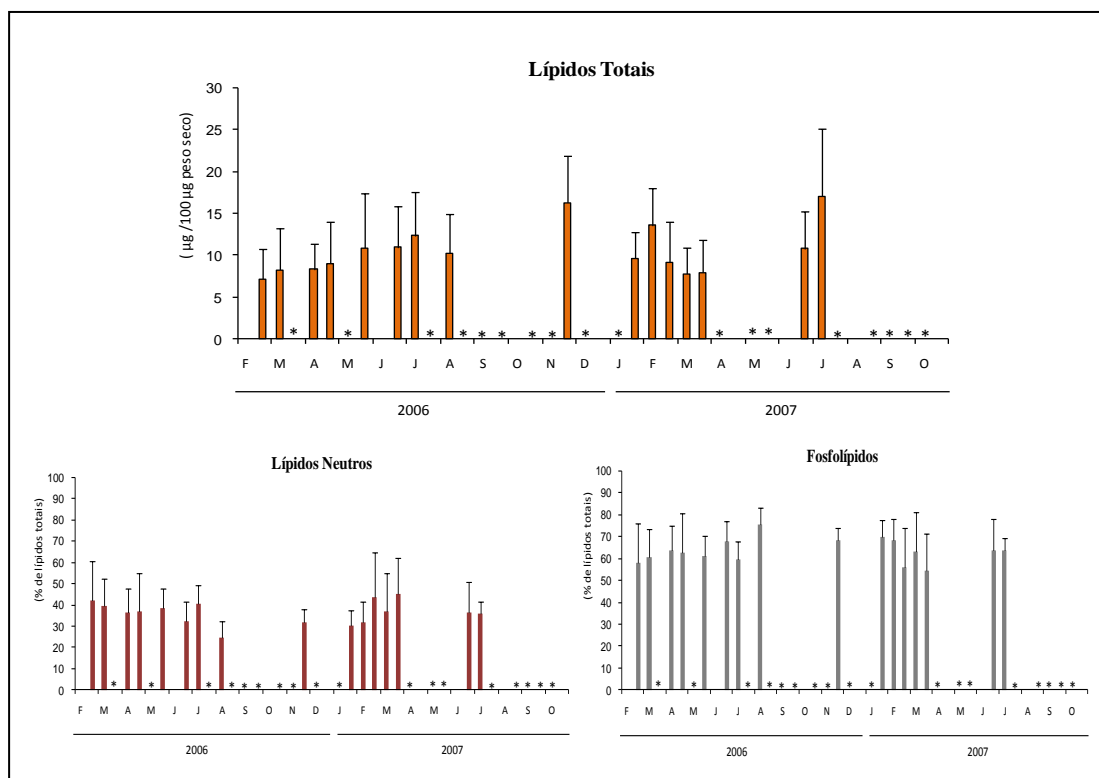


Figura 9 - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa de lípidos neutros e fosfolípidos na composição dos lípidos totais presentes nos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

Por análise da Figura 9, verificou-se que, de um modo geral, os lípidos neutros apresentam um decréscimo entre Fevereiro e Agosto de 2006, excepto no fim de Abril, Maio e Julho onde houve um aumento. Em 2007 verificou-se um aumento até final de Março de 2007, excepto na amostragem do início de Março. Nas últimas amostragens (Junho e Julho de 2007) ocorreu um decréscimo do teor dos lípidos neutros. O teor máximo de lípidos neutros foi atingido no final de Março de 2007 ($45,4 \pm 16,6$ % de lípidos totais) e o teor mínimo em Agosto de 2006 ($24,6 \pm 7,9$ % de lípidos totais), tal como aconteceu nas proteínas e nos açúcares redutores livres.

Não se verificou a existência de diferenças significativas entre anos de amostragem (K-W., $H=2,534$ *d.f.*=1, $p=0,111$) nem entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$). No entanto, existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Anexo III) (K-W., $H=26,761$ *d.f.*=15, $p=0,031$).

Nos fosfolípidos, os valores mais elevados foram obtidos em Agosto de 2006 ($75,5 \pm 7,9$ % dos lípidos totais) e os valores mais baixos no fim de Março de 2007 ($54,7 \pm 16,6$ % dos lípidos totais). No início do período de amostragem verificou-se um aumento do teor de fosfolípidos até Agosto de 2006, excepto em Maio e Julho. De um modo geral, verificou-se um decréscimo dos fosfolípidos a partir do fim de Fevereiro até ao fim do mês de Março de 2007. Entre Junho e Julho de 2007, o teor de fosfolípidos mantiveram-se constantes.

À semelhança do que ocorreu com os lípidos neutros, não foram registadas diferenças significativas entre anos de amostragem (K-W., $H=2,580$ *d.f.*=1, $p=0,108$) nem entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$). No entanto, existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Anexo III) (K-W., $H=26,796$ *d.f.*=15, $p=0,030$).

Os resultados relativos à matéria orgânica, como resultado da soma dos principais constituintes (proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais), ao longo do período de amostragem, encontram-se representados na Figura 10.

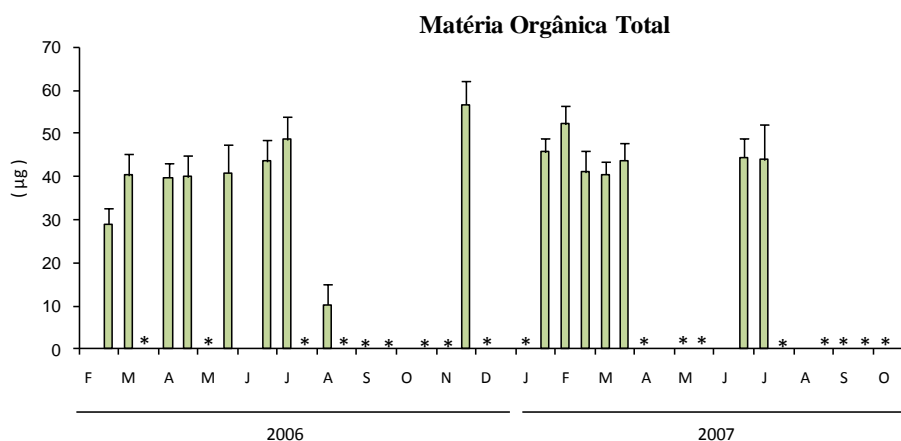


Figura 10 - Variação média (\pm desvio padrão) da matéria orgânica total (μg) dos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

A matéria orgânica dos ovócitos de *V. senegalensis* aumentou desde Fevereiro a Julho de 2006, excepto no início de Abril. Na amostragem seguinte (Agosto de 2006) ocorreu um decréscimo acentuado correspondendo ao mínimo ($10,3 \pm 7,5 \mu\text{g}$) de matéria orgânica encontrado. Em Novembro de 2006 registou-se o valor máximo ($56,8 \pm 9,3 \mu\text{g}$).

Ao longo de 2007 não se verificaram grandes oscilações no teor de matéria orgânica nos ovócitos. Este constituinte bioquímico manteve-se relativamente alto, verificando-se valores acima dos $41 \mu\text{g}$.

De um modo geral, a matéria orgânica dos ovócitos variou de forma idêntica à variação do conteúdo em proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais, ao longo do período de amostragem.

Os resultados da análise ANOVA, mostraram diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p < 0,001$) e entre períodos de amostragem (Tabela 4, Anexo III) (ANOVA, $p < 0,001$). No entanto, não se registaram diferenças significativas entre fêmeas da mesma amostragem ($p > 0,05$).

A Figura 11 representa as percentagens relativas em termos de matéria orgânica dos vários constituintes bioquímicos (proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais) ao longo do período de amostragem.

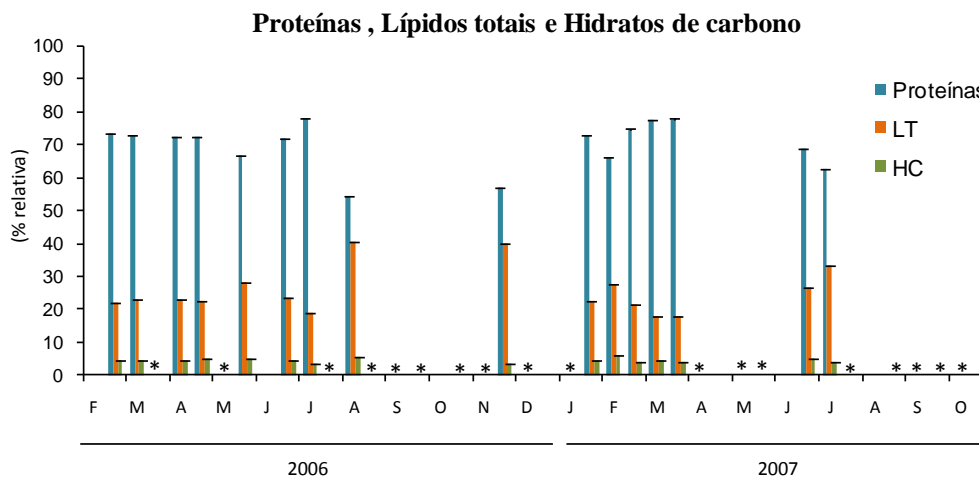


Figura 11 - Variação média (\pm desvio padrão) da percentagem relativa em termos de matéria orgânica de proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono presentes nos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

Através da Figura 11, verificou-se que as proteínas em percentagem relativa, foram relativamente estáveis entre a primeira amostragem (Fevereiro) e Junho de 2006, excepto na amostragem de Maio que registou um ligeiro decréscimo. Em Julho de 2006 ocorreu uma subida da percentagem relativa das proteínas registando-se neste mês a percentagem relativa mais elevada ($77,9 \pm 0,06\%$), seguida de um acentuado decréscimo em Agosto de 2006 onde ocorreu a percentagem mais baixa ($54,3 \pm 0,3\%$). Entre Janeiro e Março de 2007, verificou-se um aumento gradual das proteínas, excepto na amostragem do início de Fevereiro. Durante as amostragens dos meses de Junho e Julho do mesmo ano, verificou-se um decréscimo da percentagem relativa de proteínas nos ovócitos de *V. senegalensis*.

A variação da percentagem relativa do componente bioquímico lípidos totais é relativamente estável entre Fevereiro e Junho de 2006, excepto no mês de Maio onde houve uma ligeira subida. Em Agosto registou-se um aumento significativo deste componente nos ovócitos, relativamente aos outros componentes. No início do ano de 2007 até Março, verificou-se um decréscimo da percentagem relativa de lípidos totais, excepto na amostragem do início de Fevereiro. Durante as amostragens dos meses de

Junho e Julho de 2007, verificou-se um aumento da percentagem relativa de lípidos totais nos ovócitos de *V. senegalensis*. Os lípidos totais apresentam um comportamento inverso relativo ao das proteínas. Os valores máximos percentuais relativos de lípidos totais foram registados em Agosto de 2006 ($40,5 \pm 0,3\%$) e os mínimos no início de Março de 2007 ($17,9 \pm 0,07\%$).

De um modo geral, os hidratos de carbono, em percentagem relativa, não apresentaram variações ao longo do período de amostragem, sendo os maiores valores alcançados no início de Fevereiro de 2007 ($6,07 \pm 0,02\%$) e os mais baixos em Novembro de 2006 ($3,3 \pm 0,003\%$).

Nas proteínas, não se verificou a existência de diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p=0,152$) nem entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$) excepto nas fêmeas da amostragem de fim de Fevereiro de 2007 (ANOVA, $p=0,038$). No entanto, existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Anexo III) (K-W., $H=35,152$ *d.f.*=15, $p=0,002$).

Estatisticamente, os lípidos totais não apresentaram diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p=0,116$) nem entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$). No entanto, existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Anexo III) (K-W., $H=32,822$ *d.f.*=15, $p=0,005$).

Os hidratos de carbono não apresentaram diferenças significativas entre anos de amostragem (ANOVA, $p=0,706$) nem entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$) excepto nas fêmeas da amostragem de início de Março de 2007 (K-W., $H=12,638$ *d.f.*=6, $p=0,048$). Mas existiram diferenças significativas entre períodos de amostragem (Anexo III) (K-W., $H=26,474$ *d.f.*=15, $p=0,033$).

Os resultados relativos à energia total, ao longo do tempo, encontram-se representados na Figura 12.

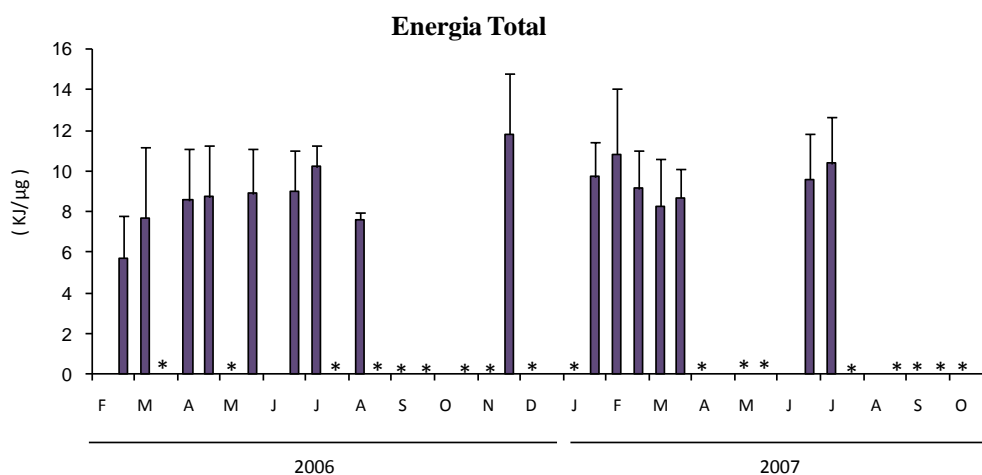


Figura 12 - Variação média (\pm desvio padrão) da energia total ($\text{kJ} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) dos ovócitos de amêijoamacha *V. senegalensis*, ao longo do período de amostragem (* sem postura ou quantidade de ovócitos emitidos insuficiente).

A variação do conteúdo energético total segue a mesma tendência que os principais constituintes bioquímicos determinados; de uma forma geral, aumentou desde a primeira amostragem, correspondente ao valor mais baixo ($5,8 \pm 2,07 \text{ kJ} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) até Julho de 2006, seguindo-se um decréscimo do conteúdo energético. Na amostragem de Novembro de 2006 registou-se um aumento atingindo o valor mais elevado ($11,9 \pm 3,0 \text{ kJ} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) do período de amostragem. As proteínas são o constituinte que mais contribui para a energia total, seguidas pelos lípidos totais.

Estatisticamente, registaram-se diferenças significativas entre anos de amostragem (K-W., $H=11,013 \text{ d.f.}=1, p<0,001$) e entre períodos de amostragem (Tabela 5, Anexo III) (ANOVA, $p<0,001$). No entanto, não se registaram diferenças significativas entre fêmeas da mesma amostragem ($p>0,05$).

3.2. RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS

3.2.1. OVÓCITOS EMITIDOS

Os coeficientes de correlação e os respectivos níveis de significância encontrados para os vários constituintes estudados nos ovócitos estão representados na Tabela 1 (Anexo IV).

Através da análise da Tabela 1 (Anexo IV), verifica-se que todos os constituintes bioquímicos ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de peso seco) se correlacionam positivamente ($p<0,05$), excepto

as proteínas com os polissacarídeos ($p=0,0678$), com os lípidos neutros ($p=0,0535$) e com os fosfolípidos ($p=0,720$), entre os quais não foi encontrada qualquer relação estatisticamente significativa.

3.2.2. PROGENITORES E OVÓCITOS EMITIDOS

Tendo em conta os principais objectivos deste trabalho, as relações encontradas entre os vários parâmetros, que apresentavam um nível de significância superior a 95% e interesse biológico, foram representados sob a forma de $y = ax + b$ (regressão linear). Na Figura 13 e na Tabela 1 (Anexo V) encontram-se representadas as relações encontradas entre a temperatura da água, aquando a captura dos progenitores na Ria de Aveiro, os indicadores de qualidade dos progenitores e os vários constituintes bioquímicos dos ovócitos. É de salientar que apenas foram encontradas relações entre os lípidos totais e fosfolípidos dos ovócitos e os parâmetros dos progenitores.

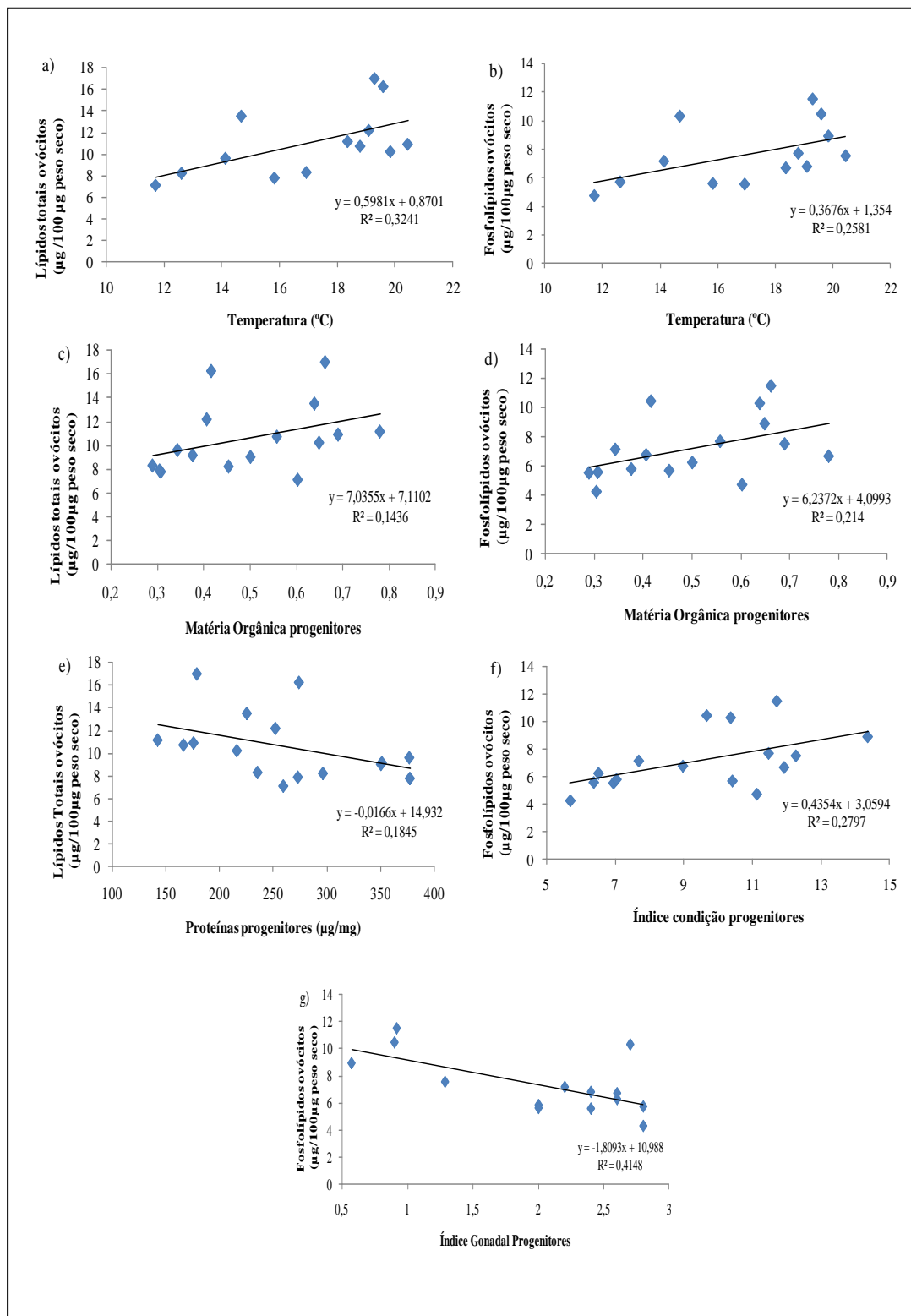


Figura 13 – Rectas de regressão de a) lípidos totais dos ovócitos em função da temperatura, b) fosfolípidos dos ovócitos em função de temperatura, c) lípidos totais dos ovócitos em função da matéria orgânica dos progenitores, d) fosfolípidos dos ovócitos em função da matéria orgânica dos progenitores, e) lípidos totais dos ovócitos em função das proteínas dos progenitores, f) fosfolípidos dos ovócitos em função do índice de condição dos progenitores e g) fosfolípidos dos ovócitos em função do índice gonadal dos progenitores.

Através da análise da Figura 13, verifica-se que os lípidos totais dos ovócitos correlacionam-se positivamente com a temperatura da água registada durante o período de amostragem na Ria de Aveiro (Spearman's $r=0,604$; $p<0,05$) e com a matéria orgânica dos progenitores (Spearman's $r=0,512$; $p<0,05$) e correlacionam-se inversamente com o teor de proteínas dos progenitores (Spearman's $r=-0,526$; $p<0,05$).

Por sua vez, os fosfolípidos dos ovócitos correlacionam-se positivamente com a temperatura da água registada (Spearman's $r=0,610$; $p<0,05$), com a matéria orgânica dos progenitores (Spearman's $r=0,556$; $p<0,05$) e com o índice de condição (Spearman's $r=0,571$; $p<0,05$) mas negativamente com o índice gonadal (Spearman's $r=-0,567$; $p<0,05$).

Na fase de maturação dos ovócitos (Janeiro até Março de 2007) verifica-se uma correlação positiva entre o índice de condição dos progenitores e os fosfolípidos dos ovócitos (Spearman's $r=1$; $p<0,05$) e uma correlação negativa entre as proteínas dos progenitores e os lípidos neutros dos ovócitos (Spearman's $r=-1$; $p<0,05$) (Tabela 1, Anexo VI). E na fase de postura (Março até Agosto de 2006 e Março de 2007) verifica-se que os fosfolípidos dos ovócitos correlacionam-se positivamente com a temperatura da água da Ria de Aveiro (Spearman's $r=0,821$; $p<0,05$), com o índice de condição (Spearman's $r=0,850$; $p<0,05$) e com a matéria orgânica dos progenitores (Spearman's $r=0,783$; $p<0,05$) (Tabela 2, Anexo VI). O índice de condição correlaciona-se positivamente com os lípidos totais dos ovócitos (Spearman's $r=0,650$; $p<0,05$). Por sua vez, as proteínas dos progenitores correlacionam-se negativamente com os lípidos totais dos ovócitos (Spearman's $r=-0,700$; $p<0,05$) (Tabela 2, Anexo VI).

4. DISCUSSÃO

A variabilidade bioquímica e fisiológica entre larvas de bivalves pode sempre ser esperada, e compreender a origem dessa variabilidade é fundamental para reduzi-la em situações de cultivo. A condição dos progenitores e consequentemente a qualidade dos ovócitos são factores importantes para determinar a viabilidade larval (Massapina *et al.*, 1999).

O ciclo reprodutivo dos bivalves é controlado por uma interacção de factores ambientais e endógenos, sendo a temperatura determinante no desenvolvimento reprodutivo e na postura (Joaquim *et al.*, 2008). O ciclo reprodutivo da *V. senegalensis* segue um ciclo anual, compreendendo o período de desenvolvimento dos gâmetas que se intensifica durante o Outono, coincidindo com a diminuição da temperatura, seguido por um período de maturação no Inverno e por último um longo período de postura, que começa no fim do Inverno, desencadeado pelo aumento da temperatura na Primavera e estende-se durante todo o Verão (Joaquim *et al.*, *em publicação*). A fase de repouso ocorre no fim do Verão (Joaquim *et al.*, *em publicação*). Neste estudo, as posturas em laboratório ocorreram entre Fevereiro e Agosto de 2006, em Novembro de 2006, entre Janeiro e Março de 2007 e entre Junho e Julho de 2007, ou seja, incidiram de forma geral sobre as fases de maturação e de postura de *V. senegalensis*.

Vários estudos sobre bivalves evidenciaram que a gametogénese (ovogénese) está associada ao ciclo anual de acumulação e uso das reservas de energia e que esta é influenciada por parâmetros ambientais tais como a temperatura e a disponibilidade de alimento (Utting & Millican, 1997; Massapina *et al.*, 1999; Pérez-Camacho *et al.*, 2003 e Joaquim *et al.*, *em publicação*). Geralmente, a acumulação de energia ocorre quando o alimento é abundante e esta energia é, posteriormente, usada para sintetizar os ovócitos que são libertados durante o processo de postura. Este ciclo traduz-se num padrão sazonal da composição bioquímica que pode variar entre populações e entre espécies (Albentosa *et al.*, 2007 e Joaquim *et al.*, *em publicação*). O teor de proteínas (18-38 % de peso seco), lípidos totais (7-17 % de peso seco) e hidratos de carbono (1-3 % de peso seco) obtido nos ovócitos de *V. senegalensis* foi ligeiramente inferior aos descritos na literatura para ovócitos de outros bivalves tais como *M. edulis*, *M. californianus*, *Astarte sp.*, *Placopecten magellanicus*, *Spisula solidissima*, *Mya truncata*, *Patinopecten yessoensis* e *Crassadoma gigantea* que foram reportados com 37-68%, 9-24% e 1-8%

de peso seco total de proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono, respectivamente (Holland, 1978; Gabbott, 1983; Whyte *et al.*, 1987 e Whyte *et al.*, 1990) e como *Mytilus galloprovincialis* reportado com 45%, 22% e 3% de peso seco total de proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono, respectivamente (Sedano *et al.*, 1995). No entanto, a quantidade relativa em termos de matéria orgânica de proteínas (54-78%), lípidos totais (18-41%) e hidratos de carbono (3-7%) foi ligeiramente superior aos reportados por Lee & Heffernan (1991) e Massapina *et al.* (1999) para *Crassostrea virginica* e *Crassostrea gigas* spp. *angulata*, respectivamente.

As proteínas são o componente bioquímico principal dos ovócitos e o que mais contribui para a matéria orgânica. No entanto, poucos estudos evidenciam a importância do conteúdo proteico nos ovócitos mas a sua elevada quantidade poderá sugerir um papel importante durante o desenvolvimento larvar normal. Neste estudo não foram encontradas relações entre as proteínas dos ovócitos e os parâmetros relativos à qualidade dos progenitores. Contudo, segundo Massapina *et al.* (1999), em *Crassostrea gigas* spp. *angulata* existe uma relação positiva entre as proteínas dos ovócitos e o índice de condição dos progenitores. Nesta espécie, o índice de condição reflecte claramente o ciclo reprodutivo da mesma, mas em *V. senegalensis* a relação entre o índice de condição e o ciclo reprodutivo é dissimulado pela recuperação rápida das reservas energéticas mesmo durante o período de postura (Maio-Setembro) devido à acumulação derivada do alimento abundante durante o Verão (Joaquim *et al.*, *em publicação*).

Massapina *et al.* (1999) ainda referiram uma relação entre o teor de proteínas nos ovócitos e a taxa de eclosão larvar. No caso de *V. senegalensis*, ainda serão necessários mais estudos relativos à qualidade das larvas para determinar a real importância das proteínas como índice de qualidade dos ovócitos e da viabilidade larvar.

O teor de proteínas nos ovócitos apresenta um aumento entre Fevereiro e Julho de 2006 que, segundo Joaquim *et al.* (*em publicação*) corresponde ao período de postura e uma súbita diminuição em Agosto de 2006 no fim do período de postura e início da fase de repouso. Em Janeiro de 2007, o teor das proteínas recupera correspondente à fase de maturação dos ovócitos, mantendo-se o teor elevado ao longo da fase de postura. No fim da postura e início da fase de repouso (Junho de 2007) há novamente um

decréscimo do teor de proteínas como no ano anterior. O aumento do teor de proteínas durante a fase de postura deve-se à função estrutural das proteínas, ou seja, à medida que os ovócitos amadurecem e conseqüentemente aumentam de tamanho, o conteúdo proteico destes aumenta.

Os lípidos totais nos ovócitos são o componente bioquímico que mais contribui para a matéria orgânica a seguir às proteínas e são a principal fonte de energia para o desenvolvimento embrionário, enquanto as larvas não se alimentam exogenamente (Lee & Heffernan, 1991; Joaquim, 1997; Utting & Millican, 1997; García-Guerrero *et al.*, 2003 e Matias *et al.*, 2009). Segundo Utting & Millican (1997), os lípidos totais dos ovócitos influenciam positivamente a taxa de eclosão das larvas de *P. maximus*.

Este componente bioquímico apresenta um aumento entre Fevereiro e Julho de 2006 que corresponde ao período de postura e uma diminuição em Agosto de 2006 no fim do período de postura e início do período de repouso. Em 2007, o teor dos lípidos totais aumenta no período de maturação (Janeiro e início de Fevereiro de 2007), porém há uma súbita diminuição no início do período de postura (meados de Fevereiro de 2007) provavelmente porque nesta fase do desenvolvimento sexual, a condição dos indivíduos ainda não permitia um investimento mais eficaz na maturação dos gâmetas sexuais. Os lípidos totais voltam a recuperar no decorrer da postura.

Apesar de Joaquim *et al.* (*em publicação*) terem encontrado uma relação negativa entre o ciclo de reprodutivo de *V. senegalensis* e a temperatura da água, neste estudo, os lípidos totais dos ovócitos correlacionaram-se positivamente com a temperatura da água e com a matéria orgânica dos progenitores, contrariamente ao encontrado por Whyte *et al.* (1990) para a *Crassadoma gigantea*. Com o aumento da temperatura da água há uma maior disponibilidade de alimento e conseqüentemente uma melhoria fisiológica dos indivíduos (Joaquim *et al.*, *em publicação*). De uma forma geral, a subida da temperatura coincidiu com o estado de maturação máximo dos progenitores e simultaneamente com o início do período de postura (Joaquim *et al.*, *em publicação*), o que sugere que a espécie num estado fisiológico melhorado, também pode investir mais na reprodução, ou seja, na maturação dos ovócitos (Angel-Dapa *et al.*, 2010). Contudo, segundo Joaquim *et al.* (*em publicação*) quando a temperatura se mantém nos valores máximos por um largo período de tempo, a espécie entra em estado de pós-postura e inactividade. Por esta razão, neste período de tempo, a indução da

postura nem sempre foi bem sucedida, sendo os ovócitos com mais lípidos totais conseguidos aquando a subida da temperatura da água na Ria de Aveiro, os que mais contribuíram para a relação positiva entre estes dois parâmetros.

Neste estudo foi encontrada uma relação negativa das proteínas dos progenitores com os lípidos totais dos ovócitos, em especial na época de postura, o que leva a supor que estas não contribuem significativamente para a maturação dos ovócitos. Este resultado vai de encontro com a ideia defendida por Joaquim *et al.* (*em publicação*) para esta espécie e por Mladineo *et al.* (2007) para a espécie *Modiolus barbatus* de que as proteínas dos progenitores, de uma forma geral, são um componente estrutural utilizado para o crescimento somático e para a manutenção do metabolismo dos indivíduos e não para funções relacionadas com o ciclo reprodutivo da espécie, sobretudo na produção/maturação dos gâmetas quando o alimento disponível é abundante.

É largamente descrito na bibliografia (Whyte *et al.*, 1990; Robinson, 1992; Ruiz *et al.*, 1992 e Joaquim, 1997) que indicadores da condição dos bivalves, nomeadamente o índice de condição apresentam uma relação muito estreita com o conteúdo em lípidos dos ovócitos emitidos sendo esta relação apoiada pela ideia de que o índice de condição é um parâmetro associado ao ciclo reprodutivo e consequentemente à conversão de glicogénio em lípidos na formação dos ovócitos na fase de pré-postura.

Contudo, Joaquim *et al.* (*em publicação*) revelam que o índice de condição nesta espécie correlaciona-se negativamente com o ciclo reprodutivo de *V. senegalensis* e que este índice é porém uma consequência da estratégia de armazenamento/utilização de energia. Neste estudo, de um modo geral, não foi encontrada uma relação entre o índice de condição e os lípidos totais dos ovócitos, excepto aquando da análise individualizada das diferentes fases de maturação sexual de *V. senegalensis*. Esta análise revelou uma relação positiva entre estes parâmetros apenas na fase de postura, o que corrobora a hipótese de que esta espécie pode armazenar energia, mesmo durante a época de postura, quando as condições ambientais são favoráveis (Joaquim *et al.*, *em publicação*).

Similarmente ao estudo de Angel-Dapa *et al.* (2010) para *Atrina maura*, também este estudo sugere que os lípidos totais podem ser indicadores de qualidade dos ovócitos.

Os lípidos neutros são componentes dos lípidos totais e têm como principal papel o fornecimento de energia na fase endotrófica das larvas (García-Guerrero *et al.*, 2003). De uma forma geral em 2006, os lípidos neutros diminuem ao longo da fase de postura. No entanto, ao longo de 2007, o teor de lípidos neutros aumentam durante a fase de maturação (Janeiro e Fevereiro) e postura (Março até Julho).

Tal como os lípidos totais, os lípidos neutros dos ovócitos correlacionam-se de forma negativa com as proteínas dos progenitores, na fase de maturação. Como já tinha sido referido, as proteínas dos progenitores são usadas essencialmente para o crescimento somático e manutenção do metabolismo (Mladineo *et al.*, 2007 e Joaquim *et al.*, *em publicação*) dos indivíduos e não têm um contributo significativo para o ciclo reprodutivo.

Contrariamente ao que era esperado, não foi encontrada nenhuma correlação entre os lípidos neutros e o índice gonadal. Dada a sua função de reserva energética seria esperado que os lípidos neutros dos ovócitos aumentassem sempre que estes entrassem em processo de maturação (estado de maturação e postura dos progenitores).

Os fosfolípidos também são constituintes dos lípidos totais e são os componentes estruturais das membranas celulares (Lee & Heffernan, 1991 e García-Guerrero *et al.*, 2003). O teor dos fosfolípidos aumenta entre Fevereiro e Agosto de 2006 (fase de postura) e mantém-se praticamente estável entre Janeiro e Fevereiro de 2007 (fase de maturação) e entre Junho e Julho de 2007 (fim da postura).

De um modo geral, os lípidos totais e o seu componente em fosfolípidos correlacionaram-se de igual forma com os parâmetros dos progenitores, tanto aquando a análise em todo o período de amostragem, como na análise apenas da fase de postura. Contudo, os fosfolípidos dos ovócitos também se correlacionam positivamente com o índice de condição dos progenitores e negativamente com o índice gonadal dos progenitores. Este fenómeno pode ser justificado pela diminuição da formação dos ovócitos à medida que os progenitores vão amadurecendo sexualmente. Quando os progenitores atingem o estado de maturação e o estado de postura, é esperado que o investimento ocorra no sentido de munir os ovócitos de componentes que poderão servir como reserva energética para as larvas, como é o caso dos lípidos neutros, e não no sentido da formação de mais ovócitos como ocorreu na fase de gametogénese, para a qual foram necessários mais fosfolípidos para a formação de membranas. A relação

negativa encontrada por Joaquim *et al.* (*em publicação*) entre o índice de condição e o índice gonadal dos progenitores vem corroborar esta hipótese.

Os hidratos de carbono existem em reduzidas quantidades nos ovócitos o que sugere não terem uma importância significativa no fornecimento de energia para as primeiras fases larvares (Massapina *et al.*, 1999 e García-Guerrero *et al.*, 2003) mas têm um papel importante na embriogénese para a síntese de compostos específicos (Holland, 1978 e García-Guerrero *et al.*, 2003).

Neste estudo não foram encontradas relações dos hidratos de carbono dos ovócitos e seus componentes (açúcares redutores livres e polissacarídeos) com os parâmetros dos progenitores o que pode evidenciar a irrelevância da grandeza do seu papel no ciclo reprodutivo desta espécie.

O teor dos hidratos de carbono aumenta entre Fevereiro e Julho de 2006, durante a fase de postura e diminui em Agosto (fim da fase de postura). Em 2007, o teor de hidratos de carbono recupera durante a fase de maturação e de postura. Os açúcares redutores livres (glucose) são o componente maioritário dos hidratos de carbono e os polissacarídeos (glicogénio) o minoritário. Os açúcares redutores livres são rapidamente metabolizados e os polissacarídeos são os açúcares de reserva.

Os açúcares redutores livres mantêm-se relativamente estáveis durante a fase de postura de 2006 e ao longo da fase de maturação e postura de 2007, no entanto com teores inferiores. Os polissacarídeos, de um modo geral, aumentam entre Fevereiro e Agosto de 2006 durante a fase de postura e ao longo de 2007, durante a fase de maturação e postura praticamente não oscilaram.

Este estudo indica que quantitativamente os constituintes bioquímicos dos ovócitos variam da mesma forma ao longo do período de amostragem mas em termos de percentagem relativa no que diz respeito ao total de matéria orgânica, as proteínas variam de forma inversa aos lípidos totais, sendo esta relação mais evidente ao longo do ano 2006. Similarmente Mladineo *et al.* (2007) também encontraram a mesma relação entre as proteínas e os lípidos totais.

O tratamento estatístico evidencia variabilidade no conteúdo dos diferentes constituintes bioquímicos entre amostragens. Este facto relaciona-se com as diferenças

na qualidade da postura ao longo do tempo, o que pode reflectir o estado nutricional das fêmeas e a sua condição geral, bem como as diferenças genéticas entre os indivíduos (Holland, 1978; Joaquim, 1997 e García-Guerrero *et al.*, 2003). Segundo Joaquim *et al.* (em publicação), *V. senegalensis* tem um período alargado de postura, durante o qual ocorrem ovócitos em diferentes estados de maturação. Este fenómeno pode justificar as diferenças significativas encontradas entre ovócitos provenientes de diferentes fêmeas durante a mesma amostragem.

Ainda ficou demonstrado que, contrariamente a *C. gigas* (Widowati *et al.*, 1992; Joaquim, 1997 e Massapina *et al.*, 1999) que também tem um período de postura alargado, mas cuja qualidade dos ovócitos emitidos diminui significativamente ao longo desse período, *V. senegalensis* não apresenta uma variação tão significativa na qualidade ovocitária. Este facto é evidenciado aquando da avaliação do conteúdo energético dos ovócitos ao longo do período de maturação e postura da espécie, o qual não varia tão significativamente, comparado com outras espécies (Widowati *et al.*, 1992; Joaquim, 1997 e Massapina *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os principais objectivos estabelecidos para este estudo foram i) determinação da composição bioquímica (lípidos totais, lípidos neutros, fosfolípidos, proteínas, hidratos de carbono, açúcares redutores livres, polissacarídeos e matéria orgânica) dos ovócitos resultantes de posturas de progenitores “selvagens” de *V. senegalensis* provenientes da Ria de Aveiro e ii) estabelecimento de relações entre a condição dos progenitores e a composição bioquímica dos ovócitos.

Os ovócitos de *V. senegalensis* apresentaram teores médios de proteínas (18-38 %), lípidos totais (7-17 %) e hidratos de carbono (1-3 %), em peso seco, dentro do reportado na bibliografia existente.

Os resultados deste estudo permitem estabelecer relações importantes entre a caracterização bioquímica dos ovócitos de *V. senegalensis* e a condição reprodutiva dos progenitores. Os lípidos, mais propriamente os fosfolípidos podem ser considerados um índice indicativo da qualidade dos ovócitos, uma vez que se correlacionam significativamente com vários parâmetros de qualidade dos progenitores, tanto durante a fase de maturação, como na fase de postura.

A caracterização bioquímica dos ovócitos resultantes de posturas de progenitores “selvagens” de amêijoa-macha poderá contribuir para estabelecer indicadores da qualidade para serem usados em aquacultura. O conhecimento detalhado dos períodos de gametogénese, postura bem como da sua relação com os ovócitos emitidos é importante sobre o ponto de vista do fornecimento de informações sobre o período ideal para a indução da postura artificial em maternidade. A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu concluir que a indução da postura de *V. senegalensis* em maternidade pode, de um modo geral, ser efectuada ao longo de todo o período de maturação e postura da espécie, uma vez que, a qualidade dos ovócitos não varia tão significativamente como noutras espécies de bivalves. Contudo, é importante salientar a importância de se efectuar futuros estudos incidentes sobre a viabilidade larvar destes ovócitos, para validar os índices de qualidade encontrados.

Em suma, do ponto de vista da gestão dos recursos numa maternidade, os constituintes bioquímicos dos ovócitos estudados, em especial o conteúdo lipídico, servem como critério de qualidade para o desenvolvimento larvar. Numa visão futura, este trabalho contribuirá para a produção de larvas e juvenis de *V. senegalensis* de boa

qualidade que poderão ser utilizados no aumento da população da Ria de Aveiro bem como no repovoamento da Ria Formosa. Do ponto de vista sócio-económico, a produção de amêijoa-macha pode ser encarada como um investimento num produto rentável em aquacultura e como uma possível alternativa à amêijoa-boia *Ruditapes decussatus*, a espécie mais produzida na Ria Formosa.

As correlações obtidas neste estudo poderão vir a contribuir para a definição de índices de qualidade, que servirão como indicadores da qualidade da produção de *V. senegalensis* em maternidades e da eficiência de um sistema de produção.

Considera-se importante referir, que este estudo assume uma relevância significativa devido à existência de poucos estudos relativos à composição bioquímica dos ovócitos em bivalves.

BIBLIOGRAFIA

- Albentosa M, Fernández-Reiriz M, Labarta 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* 146: 241–249.
- Angel-Dapa M, Rodríguez-Jaramillo C, Cáceres-Martínez C & Saucedo P. (2010). Changes in lipid content of oocytes of the penshell *Atrina maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image analysis. *Journal of Shellfish Research* 29 (2): 407-413.
- Arrobas I & Massapina C. (1992). Ensaio sobre a influência do sedimento na fase de pré-engorda de amêijoamacha (*Venerupis pullastra*) na Ria Formosa (Tavira). INIP – CRIPAlgarve. Portugal. 1-6.
- Banha M. (1984). Aspectos da biologia (crescimento e reprodução) de *Ruditapes decussatus* Lineu, 1789 (Mollusca bivalvia) na Ria Formosa – Algarve. Relatório de Estágio de Licenciatura em Biologia, Faculdade de Ciências de Lisboa, Portugal. 119p.
- Bensadoun A & Weinstein D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70: 241-250.
- Bernardino F. (2001). *Amêijoamacha Boa: Caracterização Química e Plano HACCP para produção*. Dissertação de Tese para obtenção do grau de Mestre. Porto, Portugal. 99p.
- Beukema 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.

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Camacho A & Cabello G. (1973). Desarrollo larvario de *Venerupis pullastra*. *Boletín del Instituto Espanhol de Oceanografía* 165: 35p.

Camacho A. (1991). Cultivo de ameixas en praia. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura Xunta de Galicia.14: 4-9.

Camacho, A. (1980). Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767), (Mollusca bivalvia), com especial referència a los factores determinantes de la producción. *Boletín del Instituto Espanhol de Oceanografía* 281 (5): 43-76.

Campos C & Cachola R. (2006). The introduction of the Japanese Carpet Shell in coastal lagoon systems of the Algarve (south Portugal): a food safety concern. *Internet Journal of Food Safety IAFSQ* 8:1-2.

Delgado M & Pérez-Camacho A. (2003). A study of gonadal development in *Ruditapes decussates* (L.) (Mollusca, Bivalvia), using image analysis techniques: influence of food ration and energy balance. *Journal of Shellfish Resources* 22: 435-441.

DGPA. (2009). Recursos da Pesca. Série Estatística 2008. Direcção Geral das Pescas e Aquacultura. Lisboa: 22 A-B. 181p.

Diniz M. (1998). A aquacultura. In: *Manual de aquacultura*. Maria Armanda Henriques (Ed). Porto. 13-15p.

DRAP. (2008). Informação. Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 4p. Acedido em Junho, 2010. Disponível em: http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/bol_informativo_3_0908.pdf.

FAO. (2010). Food and Agriculture Organization Cultured Aquatic Species Information Programme *Venerupis pullastra*. Acedido em Janeiro, 2010. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Venerupis_pullastra/en.

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Franc A. (1960). Classe dês bivalves. In P.P. Grassé (Edit.) Traite de Zoologie. Tome 5, fascicule 2. Masson et C^{ie} Editeurs. 1843-2219.

Gabbott P. (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In, *The mollusca, environmental biochemistry and physiology*, Vol. 2, editado por P.W. Hochachka. Academic Press. New York. 165-217.

Gallager S, Mann R & Saaki G. (1986). Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56: 81-103.

García-Guerrero M, Racotta I & Villarreal H. (2003). Variation in Lipid, Protein and Carbohydrate content during the embryonic development of the crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology* 23 (1): 1-6.

Gaspar M & Monteiro 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.

Gonçalves M. (1990). Métodos Instrumentais de Análise de Soluções, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. 15-73p.

Guia Relacre. (2000). Validação de métodos internos de ensaio em análise química N° 13. Relacre. Fevereiro. ISBN 972-8574-02-9.

Heffernan P & Walker R. (1989). Quantitative image analysis methods for use in histological studies of bivalve reproduction. *Journal of Molluscan Studies* 55: 135-137.

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

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Hess H, Lees J & Derr J. (1978). A linear-Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate solubilized proteins. *Analytical Biochemistry* 85: 259-300.

Holland D. (1978). Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. Pp. 85-123 in D.C. Malins, ed. *Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology*. Academic Press. Seattle.

Holland D & Gabbott P. (1971). A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 51: 659-668.

IPIMAR. (2000). Nova classificação das zonas de produção de bivalves. Divulgação Nº10. Acedido em Janeiro, 2010. Disponível em: <http://ipimar-iniap.ipimar.pt/pdf-docs/folheto10.pdf>.

Joaquim S, Matias D, Lopes B, Arnold W & Gaspar M. (2008). 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, Moura P, Arnold W, Chícharo L & Gaspar M. *em publicação*. Seasonal variations in reproductive activity and biochemical composition of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) from Ria de Aveiro (northwestern coast of Portugal). *Scientia Marina*.

Joaquim S, Pereira J, Leitão A, Matias D, Chaves R, Guedes-Pinto H, Chícharo L & Gaspar M. (2009). Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis*, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program. *Helgoland Marine Research* DOI 10.1007/s10152-009-0182-7

- Cátia Vera** - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)
- Joaquim S. (1997). Contribuição para o estudo da qualidade das posturas de progenitores “selvagens” da ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795). Relatório de estágio de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Universidade do Algarve, Faro Portugal. 54p.
- Lagarto N. (2006). Contribuição para o estudo da qualidade das posturas de progenitores “selvagens” de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Relatório final de estágio do 2º ciclo Biologia Marinha e Biotecnologia. Peniche, Portugal. 57p.
- Lee R & Heffernan P. (1991). Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *Journal of Shellfish Resources* 10: 203 – 206.
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A & Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal Biology Chemistry* 193: 265-275.
- MADRP. (2009). Nota de Imprensa. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas – Gabinete do Ministro. Acedido em Junho, 2010. Disponível em: http://portal.min-agricultura.pt/portal/page/portal/MADRP/PT/servicos/Imprensa/nt_xvii/NT_2009/JAIME_SILVA_REUNE_VIVEIRISTAS.pdf? template.
- Maia F, Sobral M & Gaspar M. (2006). Ciclo reprodutivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Bases científicas para a gestão destes recursos. *Relatório Científico Técnico IPIMAR*, 30: 1-36.
- Mladieno I, Peharda M, Orhanovic S, Bolotin J, Pavela-Vrancic M & Treursic B. (2007). The reproductive cycle, condition index and biochemical composition of the horse-bearded mussel *Modiolus barbatus*. *Helgoland Marine Research* DOI 10.1007/s10152-007-0065-8

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoa-macha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Marine Life Encyclopedia *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1971). Acedido em Junho, 2010. Disponível em: <http://www.habitas.org.uk/marinelifespecies.asp?item=W21850>.

Maroco J. (2007). Análise Estatística - Com utilização do SPSS. Edições Sílabo, Lisboa. 822p.

Marsh J & Weinstein D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal Lipid Resource* 7: 547-576.

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 (5): 327-333.

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 decussates* (Linné, 1758). *Aquaculture International* 17: 257-271.

Matias D. (2007). A cultura da amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*, L., 1758) em viveiros da Ria Formosa: Avaliação do crescimento e qualidade face a diferentes condições de cultura e situações ambientais. Trabalho de síntese apresentado para provas de acesso à categoria de Assistente de Investigação, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas. 96p.

Napolitano G, MacDonald B, Thompson R & Ackman R. (1992). Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Marine Biology* 113: 71-76.

Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D & Rodríguez J. (2007). Calidad ovocitaria de la almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803), relacionada com su contenido en ácidos grasos ω 3 y ω 6. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo. Tomo I. 419-423.

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Parache A. (1982). La palourde. La pêche maritime, 61 Année. 1254: 446-508.

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

Pinto F. (1998). Biologia dos moluscos bivalves. In: *Manual de aquacultura*. Maria Armanda Henriques (Ed). Porto. 19-22p.

Robinson A. (1992). Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* Kumamoto (Thunberg) II, Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *Journal Shellfish Resource* 11: 443-447.

Ruiz C, Abad M, Sedano F, García-Martín L & Sánchez J. (1992). Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 155: 249-262.

Schuller M. (1998). Amêijoas. In: *Manual de aquacultura*. Maria Armanda Henriques (Ed). Porto. 71-75p.

Schwartz D. (1984). Méthodes statistiques à l’usage des médecins et des biologistes. 8 Ed. Flammarion Médecine-sciences. Paris. 318p.

Sealifebase *Venerupis pullastra*. Acedido em Junho, 2010. Disponível em:

<http://www.sealifebase.org/summary/SpeciesSummary.php?id=83878&lang=English>.

Sedano F, Rodríguez J, Ruiz C, García-Martín L & Sánchez J. (1995). Biochemical composition and fertilization in the eggs of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 192: 75-85.

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Sobral M, Vieira F & Sobral V. (2000). Zonas de produção de moluscos bivalves da Ria de Aveiro. *IPIMAR Divulgação* N° 12. Acedido em Junho, 2010. Disponível em: <http://www.inrb.pt/fotos/editor2/folheto12.pdf>.

Utting S & Millican P. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on eggs quality and larval viability. *Aquaculture* 155: 45-54.

Valence P & Peyre R. (1989). La culture de la palourde. In G. Barnabé (coordennateur), *Aquaculture*. Paris. Vol. I: 399-434.

Vília P. (1992). Estudo da influência do tamanho na taxa de predação de juvenis de *Ruditapes decussatus* (Linné, 1785) e *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) por *Carcinus maenas* (Linné, 1785). Universidade do Algarve. Faro, Portugal. 57p.

Whyte J, Bourne N & Ginther N. (1990). Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Biology* 106: 239-244.

Whyte J, Bourne N & Hodgson C. (1987). Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 113: 113-124.

Widowati I, Cochard J, Dorange G & Le Pennec M. 1992. Etude experimentale de la maturation ovocytaire chez *Pecten maximus* et *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Actes de Colloques Société de Malacologie* 13: 47-56.

Wikipédia. (2009). Mapa Local do distrito Aveiro. Acedido em Junho, 2010. Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/64/LocalDistritoAveiro.svg/250px-LocalDistritoAveiro.svg.png>.

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijoamacha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

WoRMS *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1971). World Register of Marine Species.

Acedido em Junho, 2010. Disponível em:

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=146955>.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela 1 – Resultados obtidos segundo Joaquim *et al.* (em publicação) para os progenitores de *V. senegalensis*.

Ano	Mês	T (°C)	IC	MO	IG	Proteínas ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	LT ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	Glicogenio ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
2006	Fev	11,70	11,13	0,60		259,6	67,3	20,8
	Mar	12,60	10,42	0,45	2,80	296,6	91,2	16,4
	Abr	16,93	6,94	0,29	2,40	235,5	125,4	15,7
	Abr		6,50	0,50	2,60	350,8	105,1	18,2
	Maió	18,37	11,93	0,78	2,60	142,2	86,3	12,2
	Jun	20,45	12,27	0,69	1,29	175,7	117,2	53,3
	Jul	19,10	8,97	0,41	2,40	252,2	107,1	37,3
	Ago	19,85	14,37	0,65	0,57	216,2	110,6	18,4
	Nov	19,60	9,67	0,42	0,90	274,2	146,4	66,6
2007	Jan	14,13	7,68	0,34	2,20	377,3	77,2	17,5
	Fev	14,68	10,37	0,64	2,70	225,5	66,3	15,5
	Fev		7,02	0,38	2,00	351,7	115,1	38,2
	Mar	15,83	6,36	0,31	2,00	377,8	75,7	19,8
	Mar		5,67	0,30	2,80	273,2	92,4	10,9
	Jun	18,80	11,48	0,56		166,3	93,3	33,7
	Jul	19,30	11,71	0,66	0,92	178,8	89,7	98,3

ANEXO II

Tabela 1 – Parâmetros de validação do método: gama de trabalho, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para os vários constituintes bioquímicos: proteínas, hidratos de carbono e lípidos totais.

Constituinte Bioquímico	Gama de Trabalho (a)	Linearidade (b)	LD (c)	LQ
Lípidos Totais (1)	5 – 40	Linear	5,19	6,41
Lípidos Totais (2)	5 – 40	Linear	4,17	7,16
Lípidos Totais (3)	5 – 40	Linear	5,67	7,26
Proteínas (1)	5 - 50	Linear	7,18	10,82
Proteínas (2)	5 - 50	Linear	12,13	15,45
Hidratos de Carbono	1,25 - 15	Linear	1,23	3,73

Nota:

(a) A gama de trabalho foi ajustada e não existem diferenças significativas entre as variâncias, assim pode-se assumir que há homogeneidade de variâncias nas concentrações de estudo.

(b) A linearidade foi testada e a função não linear não fornece um ajustamento melhorado, logo a mais adequada é a função linear.

(c) As amostras abaixo do LD não foram consideradas neste estudo.

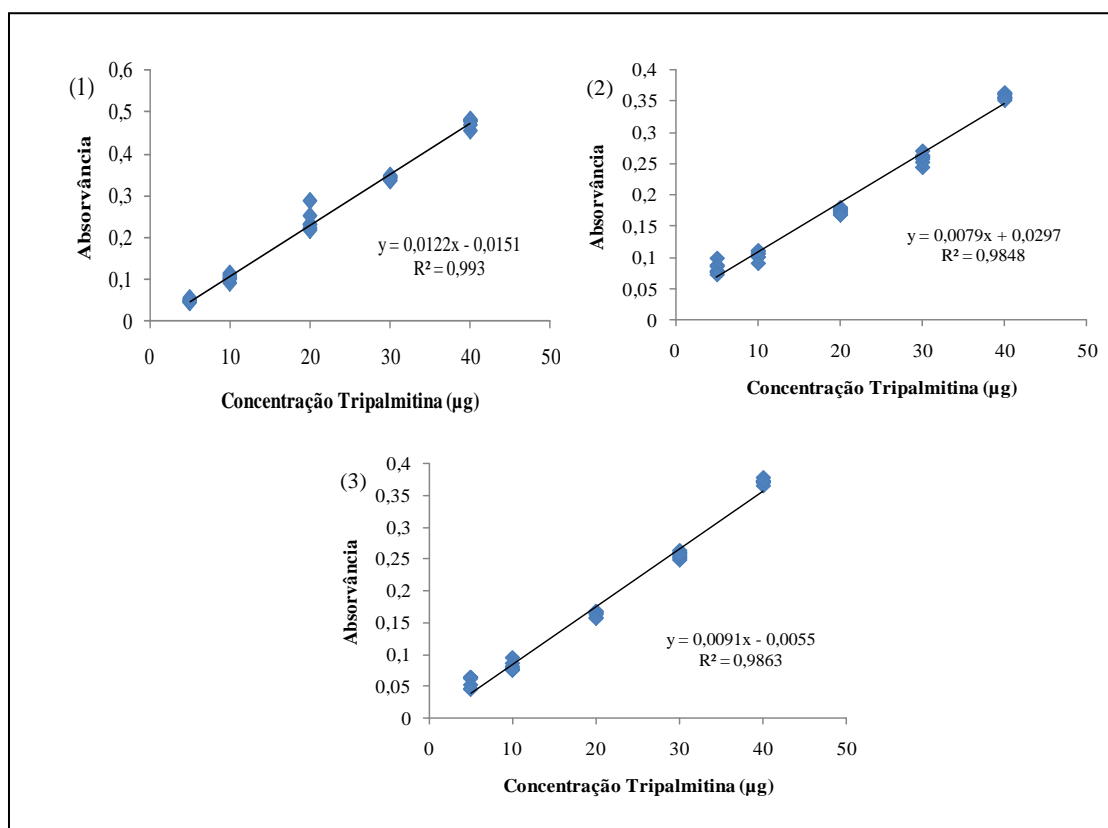


Figura 1 – Curva de calibração dos lípidos totais (1), (2) e (3).

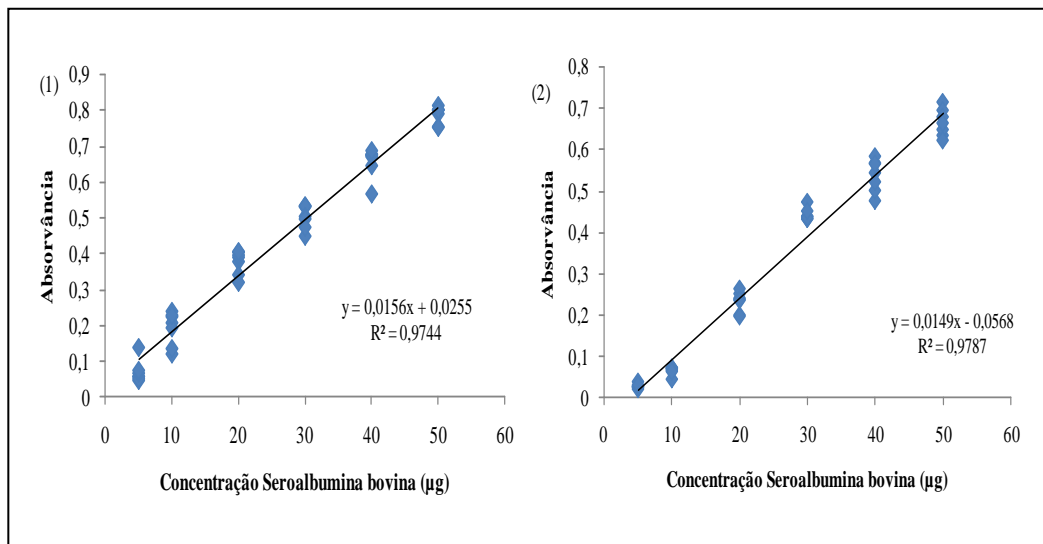


Figura 2 – Curva de calibração das proteínas usando o reagente Folin-Colciteau da marca Merck (1) e usando o reagente Folin-Colciteau da marca Sigma (2).

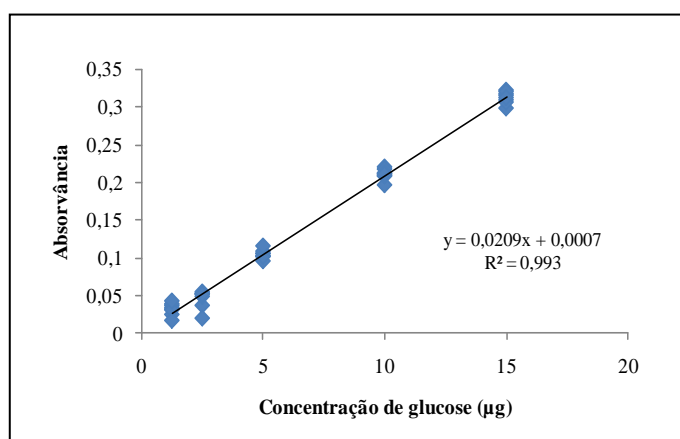


Figura 3 – Curva de calibração dos hidratos de carbono.

ANEXO III

Tabela 1 – Resultados do método Dunn’s para a comparação múltipla entre períodos de amostragem com diferenças estatisticamente significativas nas proteínas (* diferenças estatisticamente significativas encontradas em amostragens consecutivas).

Período de amostragem	Diferença entre grupos	Q	p <0,05
07-07-2006 vs. 21-02-2006	228,022	7,883	Sim
07-07-2006 vs. 04-08-2006*	224,865	3,822	Sim
16-03-2007 vs. 21-02-2006	168,625	6,157	Sim
19-01-2007 vs. 21-02-2006	168,464	6,844	Sim
02-03-2007 vs. 21-02-2006	166,973	5,997	Sim
01-02-2007 vs. 21-02-2006	157,406	5,116	Sim
16-02-2007 vs. 21-02-2006	156,906	5,304	Sim
21-06-2006 vs. 21-02-2006	149,656	5,059	Sim
22-06-2007 vs. 21-02-2006	119,179	3,928	Sim
09-03-2006 vs. 21-02-2006 *	105,201	4,026	Sim

Tabela 2 – Resultados do método Dunn’s para a comparação múltipla entre períodos de amostragem com diferenças estatisticamente significativas nos hidratos de carbono (* diferenças estatisticamente significativas encontradas em amostragens consecutivas).

Período de amostragem	Diferença entre grupos	Q	p <0,05
01-02-2007 vs. 21-02-2006	286,995	8,518	Sim
01-02-2007 vs. 04-08-2006	258,438	4,111	Sim
01-02-2007 vs. 09-03-2006	224,272	6,554	Sim
01-02-2007 vs. 16-02-2007 *	195,250	4,849	Sim
01-02-2007 vs. 16-03-2007	190,457	5,403	Sim
01-02-2007 vs. 21-04-2006	176,321	5,034	Sim
13-07-2007 vs. 21-02-2006	259,054	6,052	Sim
19-05-2006 vs. 21-02-2006	218,595	6,251	Sim
21-06-2006 vs. 21-02-2006	217,800	6,046	Sim
06-04-2006 vs. 21-02-2006	185,376	4,180	Sim
19-01-2007 vs. 21-02-2006	180,473	5,645	Sim
21-06-2006 vs. 21-02-2006	170,755	5,124	Sim
02-03-2007 vs. 21-02-2006	145,207	4,152	Sim
07-07-2006 vs. 21-02-2006	128,934	3,607	Sim

Tabela 3 – Resultados do método Dunn’s para a comparação múltipla entre períodos de amostragem com diferenças estatisticamente significativas nos lípidos totais.

Período de amostragem	Diferença entre grupos	Q	p <0,05
13-07-2007 vs. 21-02-2006	143,326	4,607	Sim
13-07-2007 vs. 16-03-2007	124,500	3,946	Sim
13-07-2007 vs. 09-03-2006	124,458	4,026	Sim
13-07-2007 vs. 02-03-2007	124,350	3,909	Sim
24-11-2006 vs. 21-02-2006	142,159	3,776	Sim
01-02-2007 vs. 21-02-2006	117,962	4,816	Sim
07-07-2006 vs. 21-02-2006	92,976	3,703	Sim

Tabela 4 – Resultados do método Tukey para a comparação múltipla entre períodos de amostragem com diferenças estatisticamente significativas na matéria orgânica total.

Período de amostragem	Diferença de médias	p	q	P	p <0,05
01-02-2007 vs. 21-02-2006	0,230	16	8,991	<0,001	Sim
07-07-2006 vs. 21-02-2006	0,205	16	8,038	<0,001	Sim
13-07-2007 vs. 21-02-2006	0,197	16	5,558	0,008	Sim

Tabela 5 – Resultados do método Tukey para a comparação múltipla entre períodos de amostragem com diferenças estatisticamente significativas na energia total.

Período de amostragem	Diferença de médias	p	q	P	p <0,05
24-11-2006 vs. 21-02-2006	5,978	16	4,903	0,044	Sim
01-02-2007 vs. 21-02-2006	4,991	16	7,885	<0,001	Sim

Para os lípidos neutros e fosfolípidos em termos de lípidos totais e proteínas, lípidos totais e hidratos de carbono em termos de matéria orgânica, a comparação múltipla de pares não têm capacidade de detectar as diferenças entre os períodos de amostragem devido a potência do teste e à maior probabilidade de erro tipo II associada a comparação múltipla de pares (Maroco, 2007).

ANEXO IV

Tabela 1 – Resultados da correlação de Spearman entre os parâmetros estudados para os ovócitos de *V. senegalensis*.

	Hidratos de Carbono	Açúcares Redutores Livres	Polissacarídeos	Lípidos Totais	Lípidos Neutros	Fosfolípidos	Matéria Orgânica	Energia Total
Proteínas	r=0,281 p=0,00498 n=99	r=0,283 p=0,00699 n=90	s.c.	r=0,226 p=0,0246 n=99	s.c.	s.c.	r=0,59 p=0 n=94	r=0,606 p=0 n=95
Hidratos de carbono		r=0,874 p=0 n=102	r=0,597 p=0 n=102	r=0,654 p=0 n=113	r=0,526 p=0 n=110	r=0,515 p=0 n=107	r=0,569 p=0 n=94	r=0,572 p=0 n=96
Açúcares Redutores Livres			r=0,342 p=0 n=102	r=0,738 p=0 n=100	r=0,624 p=0 n=98	r=0,602 p=0 n=96	r=0,557 p=0 n=87	r=0,541 p=0 n=89
Polissacarídeos				r=0,447 p=0 n=100	r=0,349 p=0 n=98	r=0,406 p=0 n=96	r=0,461 p=0 n=87	r=0,498 p=0 n=89
Lípidos Totais					r=0,694 p=0 n=110	r=0,854 p=0 n=107	r=0,568 p=0 n=94	r=0,716 p=0 n=96
Lípidos Neutros						r=0,632 p=0 n=107	r=0,55 p=0 n=93	r=0,596 p=0 n=94
Fosfolípidos							r=0,564 p=0 n=91	r=0,702 p=0 n=92
Matéria Orgânica								r=0,781 p=0 n=94
Energia Total								

ANEXO V

Tabela 1 – Resultados da correlação de Spearman entre os parâmetros estudados para os progenitores e os ovócitos de *V. senegalensis*.

	Progenitores						Ovócitos										
	IC	MO	IG	Proteínas	LT	Glicogenio	Proteínas	HC	ARL	PS	LT	LN	FL	VE	MO		
Progenitores	Temperatura	s.c.	s.c.	r=-0,756 p=0,00565 n=11	s.c.	r=0,703 p=0,00651 n=13	r=0,555 p=0,0464 n=13	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	r=0,604 p=0,0271 n=13	s.c.	r=0,61 p=0,0254 n=13	s.c.	s.c.	
	IC		r=0,876 p=0 n=16	s.c.	r=-0,75 p=0 n=16	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	r=0,571 p=0,0205 n=16	s.c.	s.c.	
	MO			s.c.	r=-0,706 p=0,00193 n=16	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	r=0,512 p=0,0415 n=16	s.c.	r=0,556 p=0,0247 n=16	s.c.	s.c.		
	IG				s.c.	s.c.	r=-0,799 p=0 n=14	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	r=-0,567 p=0,0322 n=14	s.c.	s.c.	
	Proteínas					s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	r=-0,526 p=0,0352 n=16	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	
	LT						s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.
	Glicogenio							s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.
Ovócitos	Proteínas							s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.	
	HC								r=0,782 p=0 n=16	r=0,524 p=0,0364 n=16	r=0,8 p=0 n=16	r=0,588 p=0,0162 n=16	r=0,638 p=0,00756 n=16	r=0,862 p=0 n=16	r=0,668 p=0,00446 n=16		
	ARL									r=0,447 p=0,0799 n=16	r=0,771 p=0 n=16	r=0,809 p=0 n=16	r=0,644 p=0,00685 n=16	r=0,741 p=0 n=16	r=0,762 p=0 n=16		
	PS										r=0,503 p=0,0457 n=16	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.		
	LT											r=0,662 p=0,00499 n=16	r=0,894 p=0 n=16	r=0,785 p=0 n=16	r=0,668 p=0,00446 n=16		
	LN												r=0,45 p=0,0777 n=16	r=0,662 p=0,00499 n=16	r=0,682 p=0,00332 n=16		
	FL													r=0,638 p=0,00756 n=16	r=0,547 p=0,0276 n=16		
	VE														r=0,865 p=0 n=16		

ANEXO VI

Cátia Vera - Estudo da qualidade bioquímica das posturas de progenitores “selvagens” de amêijo-
macha *Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791)

Tabela 1 – Resultados da correlação de Spearman entre os parâmetros estudados para os progenitores e os ovócitos de *V. senegalensis*, durante a fase de maturação dos ovócitos.

		Progenitores		Ovócitos	
		Proteínas	LN	FL	
Progenitores	IC	-	s.c.	r = 1	
	Proteínas		r = -1	p = 0,0167	n = 5
			p = 0,0167	s.c.	
			n = 5		

Tabela 2 – Resultados da correlação de Spearman entre os parâmetros estudados para os progenitores e os ovócitos de *V. senegalensis*, durante a fase de postura dos ovócitos.

		Progenitores			Ovócitos	
		IC	MO	Proteínas	LT	FL
Progenitores	T	-	-	-	s.c.	r = 0,821
	IC		-	-	r = 0,65	r = 0,85
	MO			-	p = 0,0501	p = 0
	Proteínas				n = 9	n = 9
				s.c.	r = 0,783	
					p = 0,00897	n = 9
				r = -0,7	-	
				p = 0,0301		
				n = 9		