

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS

Estudo de alguns aspectos da biologia reprodutiva da espécie
Sepia officinallis (Linnaeus, 1758) na Ria Formosa



Helena Villa de Brito

FARO, 1998



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS

Estudo de alguns aspectos da biologia reprodutiva da espécie
Sepia officinallis (Linnaeus, 1758) na Ria Formosa

Helena Villa de Brito

FARO 1998

17/05/1999	26312
574.5 661.6.5	

Hebeu Villeda Bui b

30.09.98

Dissertação apresentada à Universidade
do Algarve para obtenção do grau de
Mestre em Estudos Marinhos e Costeiros
especialização em Recursos Biológicos
do Mar

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Pedro Andrade, por toda a disponibilização em orientar e apoiar este trabalho e ainda pelo forte incentivo para a sua finalização.

Ao Professor Doutor Karim Erzini pela ajuda prestada no tratamento estatístico dos dados.

Ao João Quintela, por toda a sua amizade e auxílio nas mais diversas etapas deste trabalho especialmente pela ajuda prestada nas amostragens, pela bibliografia cedida e pela disponibilização dos dados morfométricos dos machos da espécie em estudo.

Aos colegas Jorge Palma e Vítor Guerreiro pelo auxílio prestado em diversas etapas deste trabalho.

À Dr^a Teresa Pina por toda a ajuda prestada no decorrer do processo histológico, bem como por toda a sua simpatia e atenção.

À direcção do Colégio Internacional de Vilamoura, por toda a compreensão demonstrada no decorrer deste último ano.

A todos os colegas do Colégio Internacional de Vilamoura, em especial aos professores António Gonçalves, Delmira Lucas, Francisco Lucas, José Canelas, Micaela Gomes, Rosário Quintas e Teresa Grossman por todo o apoio que demonstraram ao longo desta fase final do trabalho.

À minha família, pelo apoio constante, preocupação e carinho demonstrados ao longo de todo o período em que decorreu o Mestrado.

Ao Micael por todo o auxílio, dedicação e paciência.

A todos os que de algum modo contribuíram para este trabalho.

Este curso de mestrado foi financiado pela Junta Nacional de Investigação Científica (JNICT) através do Programa Praxis XXI que concedeu uma bolsa de mestrado (referência PRAXIS XXI/BM/1602/94)

RESUMO

Neste trabalho são apresentados alguns aspectos da biologia reprodutiva da espécie *Sepia officinalis*. Os indivíduos resultaram de capturas efectuadas na Ria Formosa entre Abril de 1995 e Março de 1996. Informações sobre a proporção de sexos, relações peso-comprimento, distribuição de frequências por classes de comprimento e tamanho de maturação são abordadas e discutidas. São descritos os processos de gametogénese, tendo-se confirmado a presença de seis estados histológicos para ambos os sexos. Foi ainda analisado o desenvolvimento oocitário por macroestado de maturação, através da distribuição de frequências e da classificação morfológica dos oócitos, que permitiu confirmar a ocorrência de uma estratégia reprodutiva caracterizada por uma ovulação parcial e um processo de desova do tipo intermitente. Através da análise da evolução mensal dos macroestados de maturação é sugerido um padrão migratório desta espécie relacionado com a reprodução. A variação mensal dos valores do índice gonadossomático e de fecundidade sugerem a existência de uma evolução sexual ao longo do período de amostragem. Os valores individuais de fecundidade, pela aplicação do método volumétrico, a fêmeas no macroestado IV, variaram entre 98 e 385 oócitos. Os valores de fecundidade individual parecem estar correlacionadas com o tamanho dos indivíduos e com o peso do ovário. A relação entre o diâmetro dos oócitos e o peso do ovário revelou-se também positiva.

ABSTRACT

This study presents some aspects on the reproductive biology of the species *Sepia officinalis*. The individuals were collected in Ria Formosa between April 1995 and March 1996. Information on sex-ratio, length-weight relationships, length frequency distributions and maturity length is given and discussed. The gametogenesis process is described, confirming the presence of six histological stages in both sexes. The oocitary development by macroscopic stage maturity, through frequency distributions and oocyte morphology classification, has been analysed. This analysis allowed to recognise a reproductive strategy where a partial ovulation and a intermitent spawning seems to occur. A study on the stage maturity evolution was made monthly, confirming a migration pattern related with reproduction. The gonadossomatic indice and fecundity values were analysed by monthly evolution, which suggests an evolution of the gonad development through the studied period. Individual fecundity was estimated by the volumetric method, in females in maturity stage IV, falling in the range of 98 to 385. The relations tested between fecundity and body size and fecundity and ovary weight appear to be related. The other relationship tested between oocyte diameter and ovary weight appear to be positive.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ESPÉCIE <i>SEPIA OFFICINALIS</i>	6
2.1 Posição taxonómica	6
2.2 Características morfológicas diagnosticantes.....	7
2.3 Distribuição geográfica e batimétrica	8
2.4 Ecologia.....	8
2.5 Maturação, postura e fecundidade	10
2.6 Importância económica	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Amostragem biológica	13
3.1.1 Determinação do sexo	14
3.1.2 Determinação do estado de maturação	15
3.2 Estudo da gametogénese	15
3.3 Determinação da fecundidade	16
3.4 Tratamento dos dados	16
4. RESULTADOS	21
4.1 Distribuição mensal da população amostrada	21
4.2 Proporção de sexos	22
4.3 Relações entre parâmetros morfométricos	22
4.3.1 Peso-comprimento	22
4.3.2 Peso do ovário-CDM e peso do ovário-peso do corpo	24
4.4 Distribuição de classes de comprimento	25
4.4.1 Frequência de indivíduos.....	25
4.4.2 Frequência de indivíduos por macroestado de maturação.....	26
4.4.3 Comprimento de primeira maturação.....	27
4.5 Caracterização mensal.....	28
4.5.1 Macroestados de maturação.....	28
4.5.2 Índice gonadossomático	29
4.6 Descrição da gametogénese	30
4.6.1 Oogénese.....	30
4.6.1 Espermatogénese	37
4.7 Desenvolvimento oocitário por macroestado de maturação	40
4.7.1 Distribuição de frequências dos diâmetros oocitários.....	40
4.7.2 Classificação morfológica dos oócitos	43

4.8 Determinação da fecundidade.....	45
4.8.1 Fecundidade individual.....	45
4.8.2 Fecundidade por classes de CDM.....	45
4.8.3 Fecundidade mensal.....	46
4.8.4 Regressões lineares entre a fecundidade e alguns parâmetros morfométricos.....	47
4.8.5 Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos e alguns parâmetros morfométricos ...	48
4.8.6 Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos hialinos e alguns parâmetros morfométricos.....	48
4.8.7 Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos e a fecundidade	49
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXOS

ANEXO I - Escalas de Maturação

ANEXO II - Parâmetros de Regressões Lineares

ANEXO III - Teste T^2 de Hotelling

ANEXO IV - Método de Bhattacharya

ANEXO V - Medições dos Diâmetros Oocitários

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vista dorsal de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Figura 2 - Pormenor da massa tentacular de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Figura 3 - Braço hectocotilizado de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Figura 4 - Distribuição geográfica da espécie *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Figura 5 - Pormenor da morfologia interna de uma fêmea de *Sepia officinalis* (face ventral) (adaptado de Martins, 1990)

Figura 6 - Distribuição do número de indivíduos ao longo do período de amostragem

Figura 7 - Relação entre o CDM e o peso do corpo. a) Indeterminados b) Machos c) Fêmeas

Figura 8 - Regressão linear entre o CDM e o peso do ovário(a) e o peso do corpo e o peso do ovário(b)

Figura 9 - Distribuição de frequências dos indivíduos capturados no período de amostragem

Figura 10 - Distribuição de frequências dos indivíduos por macroestado de maturação

Figura 11 - Curvas de maturação obtidas para as fêmeas(a) e machos(b)

Figura 12 - Evolução mensal dos macroestados de maturação ao longo do período amostrado

Figura 13 - Evolução mensal do índice gonadossomático (IGS)

Figura 14 - Oócitos em vários estados de desenvolvimento ($\times 40$): a: IIIa, b: IIIb, c: IV

Figura 15 - Oócito I no estado histológico II ($\times 100$). É visível o núcleo (n) ocupando grande parte do citoplasma (c)

Figura 16 - Diversos oócitos no microestado IIIa ($\times 40$). n: núcleo; c: citoplasma; cr: cromatina

Figura 17- Oócito I no microestado IIIa ($\times 100$). É visível a disposição das células foliculares (cf) a circundar o oócito

Figura 18 - Oócito I no estado histológico IIIb ($\times 400$). É possível observar o início da penetração dos cordões foliculares (cdf) para o interior do citoplasma (c) do oócito

Fig. 19 – Oócito no estado histológico IIIb ($\times 100$). É visível a progressão das célulasfoliculares (cf) para o interior do citoplasma

Figura 20 - Pormenor dos cordões foliculares (cdf) num oócito no estado IIIb ($\times 400$)

Figura 21 - Oócito I no estado IV ($\times 100$). Os cordões foliculares ocupam grande parte do citoplasma do oócito

Figura 22 - Pormenor do enrugamento dos cordões foliculares num oócito no estado IV ($\times 400$). São visíveis as células foliculares(cf)

Figura 23 - Oócitos no estado histológico V ($\times 60$). É visível a regressão das células foliculares (cf) e a formação do córion (co)

Figura 24 - Oócito V ($\times 400$). Observa-se a formação do vitelo (v) e a presença de células foliculares (cf) cilíndricas

Figura 25 - Pormenor do *corion* (co) ($\times 100$)

Figura 26 - Corte transversal dos túbulos seminíferos (ts) no macroestado II ($\times 400$). Observam-se espermatogónias (esp) e espermatócitos I (es1)

Figura 27 - Gónada de um macho no macroestado III ($\times 400$). São visíveis espermatogónias (esp), espermatócitos I (es1) e II (es2) e espermatídeos (est)

Figura 28 - Gónada de um macho no macroestado IV ($\times 100$). Observa-se a presença de espermatozóides (ez) no lúmen (lu) do tubo seminífero

Figura 29 - Gónada de um macho no macroestado IV ($\times 400$). Pormenor dos espermatozóides (ez) no lúmen (lu) do tubo seminífero

Figura 30 - Distribuição de frequências dos diâmetros oocitários em cada macroestado de maturação. Os números indicam as classes modais obtidas pelo método de Bhattacharya

Figura 31 - Percentagem de oócitos, por microestado de maturação, em cada macroestado de maturação.

Figura 32 - Evolução dos diâmetros médios e respectivos desvios padrão nos diversos estados histológicos

Figura 33 - Frequência de ovários por número de oócitos presentes no ovário

Figura 34 - Distribuição mensal dos valores médios de fecundidade

Figura 35 - Regressão linear fecundidade-CDM (a) fecundidade-peso do corpo (b) e fecundidade-peso do ovário (c)

Figura 36 - Regressão linear Diâmetro dos oócitos-peso do ovário

Figura 37 - Regressão linear diâmetro dos oócitos hialinos-peso do ovário

Figura 38 - Regressão linear Diâmetro dos oócitos-fecundidade

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Número de machos (M) e fêmeas (F) amostrado e percentagem de machos em relação ao número de fêmeas (M/F) ao longo do período amostrado

Tabela II - Critérios fisiológicos utilizados para a determinação dos estados de crescimento oocitário (adaptado de Richard, 1971; Dhainaut & Richard, 1976)

Tabela III - Escala microscópica representativa da evolução citológica (microestados) do gâmeta masculino (adaptado de Richard, 1971)

Tabela IV - Valores de fecundidade média obtidos por classe de comprimento

Tabela V - Parâmetros da regressão Peso/CDM (a , b e r^2) em diversos estudos realizados com a espécie *Sepia officinalis*

Tabela VI - Época de reprodução da espécie *Sepia officinalis* consoante a região estudada

Tabela VII - Diâmetros oocitários médios obtidos por microestado de maturação em várias espécies de cefalópodes

Tabela VIII - Valores de fecundidade para diversas espécies de cefalópodes

Tabela IX - Comparação de valores de fecundidade média obtidos por diferentes autores

1. INTRODUÇÃO

Os cefalópodes da sub-classe Coleoidea constituem um grupo de invertebrados marinhos que apresenta um crescimento rápido, reproduzindo-se uma única vez, após o que morrem por exaustão (Mangold, 1987). Por esta razão são considerados como semelpáticos. Nestas espécies não ocorre a regeneração da gónada, e conseqüentemente não se verifica a substituição de estados mais avançados por outros mais atrasados.

Com exceção da espécie *Nautilus spp.*, com um ciclo de vida de 20 anos (Saunders, 1984 *in* Mangold, 1987) e que é considerada como iteropátrica, todas as restantes espécies de cefalópodes podem ser consideradas como semelpáticas. No entanto, existem diferenças significativas no processo de desenvolvimento oocitário, período da reprodução e tipo de desova de espécie para espécie (Boletzky, 1975; Mangold, 1987; Mangold *et al.*, 1993), o que permite estabelecer várias estratégias reprodutivas, referenciadas por Rocha *et al.* (1996).

A espécie *Sepia officinalis* L., vulgarmente designada por choco, é considerada como sendo uma das espécies de cefalópodes mais bem estudadas (Boletzky, 1987), existindo no campo da biologia reprodutiva inúmeros estudos (Mangold-Wirz, 1963; Richard, 1971; Dhainaut & Richard 1976; Arnold & Williams-Arnold, 1977; Boletzky, 1983; Ezzedine-Najai 1984; Boletzky, 1987; Boucaud-Camou *et al.*, 1991; Henry *et al.*, 1994; Koueta *et al.*, 1994).

A estratégia reprodutiva desta espécie é considerada como sendo intermitente terminal (Boletzky, 1983; 1987), ou seja, a postura não é continua e dá-se na fase final da vida das fêmeas. Os ovos são depositados em intervalos de 2 a 3 minutos ao longo de várias horas, podendo uma fêmea desovar todos os seus ovos maduros em alguns dias (Boletzky, 1983; Koueta *et al.*, 1994).

Deste modo, o processo de ovulação é parcial, pois os oócitos ocorrem no ovário em vários estádios de desenvolvimento, o que possibilita a produção contínua de ovos a partir do momento em que a postura se inicia (Rocha *et al.*, 1996).

Os estudos de dinâmica oocitária revelam-se de grande importância nas espécies semelpáticas, uma vez que devido à mortalidade natural e por pesca serem elevadas, sendo apenas compensadas por um recrutamento anual, existe a necessidade de gerir correctamente o manancial reprodutor de modo que não surja uma situação de sobrepesca (Saville, 1987)

A gametogénese, especialmente a oogénese, tem sido estudada por diversos autores entre os quais Cowden (1968), Selman & Arnold (1978), Knipe & Beeman (1978) para diversas espécies de Loliginídeos, Burukovski *et al.* (1977) para a espécie *Stenoteuthis pteropus*, Lipinski (1979), para *Illex illecebrosus*, Schuldt (1979) para *I. argentinus*, Takahashi (1978) para *Todarodes pacificus*, Boyle & Knoblock (1983) para *Eledone cirrhosa*, Coelho (1990) também para a espécie *I. illecebrosus*, Sauer & Lipinski (1990) para *Loligo vulgaris reynaudii* e Lopes *et al.* (1997) para *Loligo vulgaris*. Os estudos mais exaustivos foram realizados por Richard (1971) e Dhainaut & Richard (1976) para a espécie *Sepia officinalis*.

O número de estados celulares considerado na oogénese varia entre 3 a 10 (Mangold, 1987), de acordo com o autor e com a espécie em estudo (Buckley, 1976 *in* Mangold, 1987; Moriyasu, 1988; Coelho, 1990; Sauer & Lipinski, 1990; Lipinski & Underhill, 1995). Relativamente à descrição da espermatogénese, efectuada em diversos estudos com os principais grupos de cefalópodes, esta parece ser mais consensual (Badenhorst, 1973; Schuldt, 1979; Coelho, 1990; Sauer & Lipinski, 1990).

O processo de gametogénese é controlado por uma hormona gonadotrópica segregada pelas glândulas ópticas. Em estudos realizados com *Octopus vulgaris*, e extrapolados para os cefalópodes em geral, Wells & Wells (1977) verificaram que os primeiros estados de desenvolvimento da gametogénese, bem como o desencadear

da vitelogênese, dependiam directamente da hormona produzida pelas glândulas ópticas.

Na espécie *Sepia officinalis* Durchon & Richard (1967), Richard (1971), Richard & Dhainaut (1973), Dhainaut & Richard (1976), Koueta & Boucaud-Camou *et al.* (1991), Henry *et al.* (1994) e Koueta *et al.* (1995) referem a importância das glândulas ópticas no controle da maturação sexual, mais especificamente no processo inicial da gametogênese, em que ocorre a mutiplicação das espermatogónias, oogónias e proliferação das células foliculares. Este controle far-se-á através da secreção da hormona gonadotropina, cuja libertação poderá estar relacionada com determinadas condições ambientais (Durchon & Richard, 1967; Richard, 1971; Koueta, 1990; Koueta *et al.*, 1994). Estes trabalhos assumem particular importância, na medida em que permitem interpretar o ciclo sexual das fêmeas desta espécie.

Deste modo, verifica-se que a forte luminosidade e os dias longos, do Verão, bloqueiam a maturação das fêmeas jovens, mas a elevada temperatura e uma alimentação óptima, característica das zonas litorais permite um crescimento rápido. No Outono e Inverno, nas zonas mais profundas, o crescimento é mais lento, mas a ocorrência de dias mais curtos e a menor luminosidade permitem a maturação do ovário que é assim estimulado pelo cérebro sobre as glândulas ópticas que libertam a gonadotropina. A migração que ocorrerá na estação seguinte para zonas litorais permite assim a reprodução (Henry *et al.*, 1994).

Relativamente à fecundidade, esta é, de uma forma geral, estimada pela contagem do número de oócitos maduros existentes no ovário de fêmeas maduras (Boletzky, 1983, 1987) ou mais raramente pelo número de ovos depositados pela fêmea (Voss, 1983). Este número é extremamente variável nas diversas espécies de cefalópodes, podendo variar entre 25 (*Idiosepius pygmaeus*) e 6000000 ovos (*Disodicus gigas*) (Voss, 1983).

A presença de oócitos de vários tamanhos e estados pode indicar um período de desova prolongado, durante o qual alguns oócitos podem completar o seu

desenvolvimento. Daí ser importante o conhecimento complementar do tipo de desova preconizado pela espécie (Voss, 1983).

Dadas as questões relacionadas com o equilíbrio energético, geralmente as espécies que produzem um grande número de ovos, têm oócitos mais pequenos, pelo que se torna também útil medir o diâmetros dos oócitos.

Alguns dos estudos realizados sobre a fecundidade da espécie *Sepia officinalis* apontam valores que podem variar entre 150 e 500 oócitos (Mangold-Wirz, 1963; Richard, 1971). No entanto, a partir de observações realizadas em laboratório, é possível que uma única fêmea possa emitir um número mais elevado de ovos, se as condições permitirem uma maturação completa ou praticamente completa dos oócitos presentes no seu ovário (Boletzky, 1983).

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados sobre a espécie *Sepia officinalis*, são raros os estudos realizados e publicados sobre a biologia desta espécie nas nossas águas. Coelho & Martins (1989) e Martins (1990) realizaram um estudo sobre esta espécie na região algarvia, dentro e fora da Ria Formosa onde foram focados aspectos da biologia da espécie e da pesca.

O presente estudo decorreu na Ria Formosa, em virtude de neste local ocorrerem as condições ambientais de temperatura e alimento típicas de locais protegidos, o que favorece um crescimento rápido dos indivíduos pertencentes à espécie *Sepia officinalis*. São objectivos deste trabalho:

- Analisar a estrutura populacional, nomeadamente, a distribuição mensal dos indivíduos, a proporção de sexos, a distribuição de frequências de indivíduos e estados de maturação por classes de comprimento.
- Descrever a gametogénese, comparando os vários estados histológicos (microestados) com os anteriormente descritos para esta espécie por diversos autores.

- Aprofundar os conhecimentos da dinâmica oocitária, através da medição dos oócitos presentes nos vários microestados de maturação por macroestado de maturação de modo a tentar compreender o tipo de estratégia reprodutiva desta espécie.
- Aplicar o método volumétrico para a determinação da fecundidade, através da contagem dos oócitos maduros presentes nos ovários das fêmeas maduras (macroestados IV).

2. CARACTERIZAÇÃO GERAL DA ESPÉCIE *Sepia officinalis*

2.1. Posição taxonómica

Segundo Roper *et al.* (1984) a posição taxonómica da espécie *Sepia officinalis* é a seguinte:

Filo Mollusca

Classe Cephalopoda Cuvier, 1798

Sub-classe Coleoidea Bather, 1888

Ordem Decapoda

Sub-ordem Sepioidea Naef, 1916

Família Sepiidae Keferstein, 1866

Género *Sepia*

Espécie *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 (Figura 1)

Nome comum: Choco (Portugal),
Cuttlefish (UK, USA),
Seiche (França)

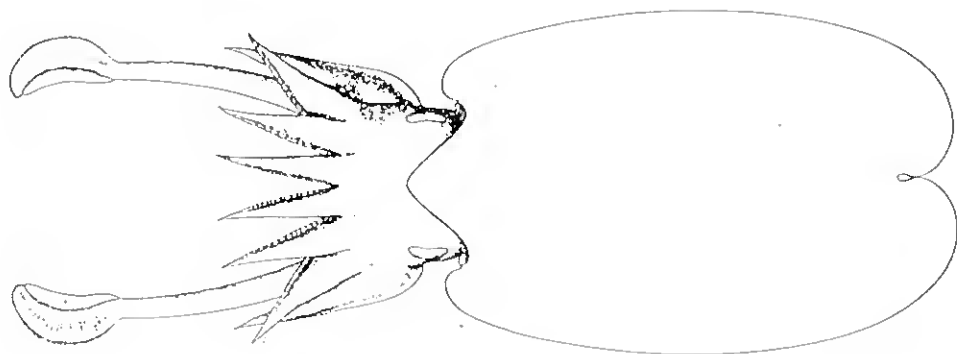


Fig. 1 – Vista dorsal de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

2.2. Características Morfológicas Diagnosticantes

Os indivíduos desta espécie apresentam um corpo robusto achatado dorso-ventralmente, suportado por uma concha interna calcárea e porosa designada por sêpion ou siba. O manto reveste a concha, apresentando um perfil oval rodeado por barbatanas estreitas, cujos bordos posteriores estão livres.

A cabeça, apresenta oito braços sésseis curtos e dois braços tentaculares, que podem estar recolhidos em duas bolsas situadas entre dois braços, e que são providos de cinco a seis fiadas longitudinais de ventosas, entre as quais cinco ou seis são de maiores dimensões na zona central (Figura 2).

Nos machos adultos o quarto braço esquerdo ventral apresenta-se hectocotilizado na parte basal, por modificações das ventosas existentes na parte terminal do braço em papilas que vão progressivamente diminuindo de tamanho até ao ápice (Figura 3).

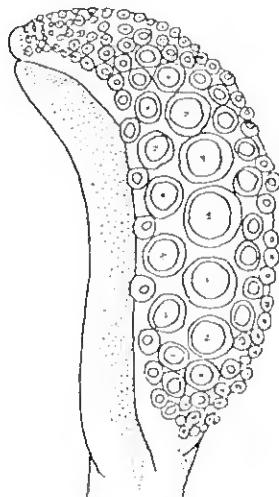


Fig. 2 – Pormenor da massa tentacular de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

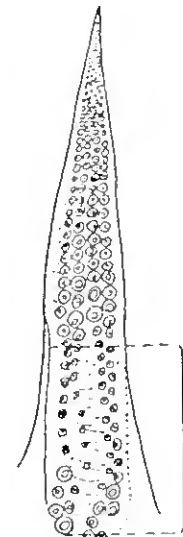


Fig. 3 – Braço hectocotilizado de *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Esta espécie distingue-se das outras do mesmo género pela disposição das ventosas na massa tentacular, pela forma do sêpion e pela extensão da porção transformada do hectocótilo (Roper *et al.*, 1984).

2.3. Distribuição Geográfica e Batimétrica

A sua área de distribuição abrange o Báltico, o Mar do Norte e Canal da Mancha, estendendo-se até ao Mediterrâneo (Roper *et al.*, 1984; Boletzky, 1987; Guerra, 1987). Mais a sul, na costa Africana é substituída por *Sepia officinalis hierredda*, considerada por alguns autores como uma subespécie (Guerra, 1987). O género *Sepia* encontra-se ausente da costa americana (Voss, 1974 *in* Boletzky, 1987; Roper *et al.*, 1984; Guerra, 1987) (Figura 4).

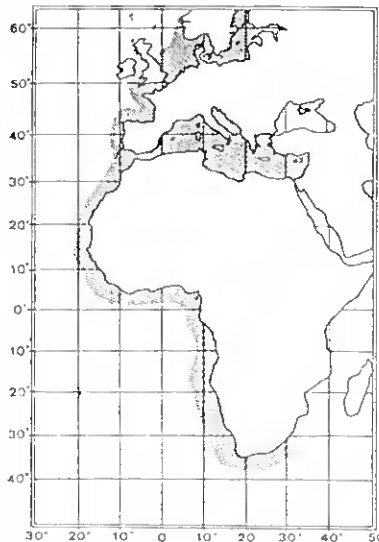


Fig. 4 – Distribuição geográfica da espécie *Sepia officinalis* (adaptado de Roper *et al.*, 1984)

Actualmente conhecem-se mais de cento e dez espécies pertencentes ao género *Sepia*, habitando nas águas da Europa (Roper *et al.*, 1984). Na mesma área geográfica de distribuição da espécie *Sepia officinalis* ocorrem outras duas espécies do mesmo género: *Sepia elegans* e *Sepia orbignyana* (Guerra, 1987).

Em Portugal, a espécie *Sepia officinalis* é mais abundante na Costa Ocidental, a sul do Tejo, e na Costa Algarvia.

2.4. Ecologia

Sepia officinalis é considerada como uma espécie eurihalina (Guerra & Castro, 1988) que vive preferencialmente em fundos arenosos e lodosos

compreendidos, desde o litoral até 150-200m (Boletzky, 1983; Roper *et al.*, 1984; Guerra, 1987; Guerra & Castro, 1988), sendo considerada como uma espécie nectobentónica (Boletzky, 1983; Nixon, 1985; Coelho, 1985; Arkhipkin, 1988; Boucaud-Camou, 1990).

Os maiores exemplares chegam a atingir os 4Kg de peso e quase 0,5m de comprimento de manto (Guerra, 1987). Vários estudos sugerem que a sua taxa de crescimento depende da temperatura da água, pelo que a baixas temperaturas embora o crescimento seja lento, o ciclo de vida é mais longo do que a altas temperaturas, em que os indivíduos atingem o estado de adulto mais rapidamente (Boletzky, 1979, 1987).

Os machos atingem maiores dimensões do que as fêmeas, mantendo uma elevada taxa de crescimento durante toda a vida, que é normalmente de 1 a 2 anos (Guerra & Castro, 1988).

Esta espécie suporta temperaturas mínimas de 9°C e máximas de 30°C (Richard, 1971) e tolera valores de salinidade entre os 25‰ (Palmegiano & Sequi, 1981, Palmegiano & D'Apote, 1983) e os 38‰ (Boletzky, 1983). Dada a sua capacidade de adaptação a um grande intervalo destes factores ambientais externos, a ocorrência desta espécie verifica-se frequentemente em lagoas costeiras onde se podem verificar amplitudes, térmicas e salinas, consideráveis ao longo do ano (Guerra *et al.*, 1988)

Realiza migrações sazonais, verticais e horizontais, relacionadas com o período de reprodução (Roper *et al.*, 1984), encontrando-se em zonas mais profundas durante o Inverno onde decorre a maturação das gónadas, deslocando-se para os locais perto da costa durante a Primavera e Verão para se reproduzir e realizar a postura. Este padrão de migrações tem sido observado em várias áreas geográficas, compreendendo o mar da Catalunha (Mangold-Wirz, 1963), o canal da Mancha (Richard, 1971), a Ria de Vigo (Guerra & Castro, 1988) e a Ria Formosa (Coelho & Martins, 1989; Martins, 1990).

2.5. Maturação, postura e fecundidade

Os factores externos que mais influenciam a maturação sexual na espécie *Sepia officinalis* são a temperatura (Richard, 1966, 1970, 1971) e o fotoperíodo (Richard, 1967, 1968, 1971). Temperaturas elevadas aceleram a maturação (Richard, 1970). Nos casos em que os indivíduos tenham já atingido um nível de desenvolvimento somático que permite a maturação sexual, é necessário um fotoperíodo inferior a 12h dia/12h noite para que se inicie o processo de desenvolvimento maturativo (Richard, 1967).

A maturação pode ainda ser influenciada pela glândula óptica que sob a influência de estímulos externos (fotoperíodo) segrega hormonas que actuam sobre o ovário ou o testículo e glândulas anexas (Durchon & Richard, 1967; Richard, 1971; Koueta, 1990). Pensa-se que estas hormonas também tenham influência na hectocotilização do braço ventral do macho, e no comportamento reprodutor (Richard *et al.*, 1979 *in* Martins, 1990).

O tamanho de maturação na espécie *Sepia officinalis* é bastante variável, sendo os machos mais precoces do que as fêmeas (Mangold-Wirz, 1963; Richard, 1971; Boletzky, 1983; Guerra & Castro, 1988). Os machos podem atingir a maturação com apenas 6cm, enquanto que as fêmeas atingem esse estado com CDM 8cm (Mangold-Wirz, 1963; Guerra & Castro, 1988).

É possível encontrar machos maduros todo o ano, enquanto que as fêmeas apenas se encontram neste estado durante as estações da Primavera, Verão e parte do Outono, que constituem a época principal da actividade reprodutiva (Guerra, 1987).

A cópula realiza-se na posição "tête à tête", isto é o macho e a fêmea colocam-se frente a frente e unem-se entrelaçando os braços, sendo a transferência dos espermatóforos feita através do braço hectocotilizado do macho para uma bolsa situada sob a boca da fêmea (Boucaud-Camou, 1990).

A época de postura desta espécie que habita no Mediterrâneo abrange geralmente a Primavera e Verão, podendo ocorrer também no Inverno (Mangold-Wirz, 1963; Guerra & Castro 1988). No mar do Norte observa-se que a postura se realiza apenas na Primavera e Verão (Richard, 1971; Mattacola *et al.*, 1984 *in* Guerra & Castro, 1988). Este facto pode ser devido às condições mais amenas do Inverno no Mediterrâneo comparativamente às condições do Atlântico Norte.

A postura dos ovos é feita normalmente junto à costa, em águas pouco profundas, raramente a mais de 30-40m de profundidade (Boletzky, 1983), preferencialmente em águas de temperatura entre os 13-15°C (Roper *et al.*, 1984). Os ovos encontram-se envolvidos por uma capa gelatinosa com tinta preta, possuindo uma dimensão de cerca de 8 a 10mm, cujo período de incubação varia entre 30 a 90 dias consoante a temperatura (Roper *et al.*, 1984; Boletzky, 1987).

O período da desova começa após a copulação, ficando o macho em contacto com a fêmea, afastando outros machos que possam aproximar-se (Boletzky, 1983).

Após a desova ocorre uma morte massiva das fêmeas (Roper *et al.*, 1984), possivelmente devido à grande quantidade de energia canalizada para a reprodução (Fields, 1965; Arnold & Williams-Arnold, 1977).

2.6. Importância económica

Além da sua importância como recurso pesqueiro, a espécie *Sepia officinalis* apresenta-se como uma espécie de grande potencial no domínio da aquacultura, não só em termos de cultivo, mas também como fonte de alimento para outras espécies.

Este potencial resulta de algumas características que estes organismos apresentam, e que se traduzem em elevadas taxas de crescimento, hábito bentónico e alimentação pouco selectiva (Coelho, 1986), sendo ainda de fácil cultivo e reprodução em cativeiro (Richard, 1975; Forsythe *et al.*, 1991).

A importância desta espécie é ainda relevante não só como modelo clássico da experimentação biomédica, bem como recurso para a alimentação humana com elevado valor económico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem biológica

O material biológico que serviu de base ao presente estudo foi proveniente de capturas efectuadas na Ria Formosa entre Abril de 1995 e Março de 1996. A pesca foi efectuada por embarcações utilizando a arte de pesca artesanal “arrasto de vara” (tamanho da malha -1 cm; largura da abertura da boca -7m) ao longo do Canal de Faro-Olhão, tendo-se capturado 1613 exemplares pertencentes à espécie *Sepia officinalis*.

Na realização deste trabalho todos os exemplares capturados foram utilizados para uma breve análise da estrutura populacional, tendo-se depois seleccionado alguns indivíduos para o estudo de alguns aspectos da biologia reprodutiva:

- Gametogénese: 35 fêmeas e 8 machos representativos dos vários estados de maturação.
- Dinâmica de maturação: 613 fêmeas
- Fecundidade: 76 fêmeas no estado IV de maturação

No decorrer do tratamento biológico da amostra, um procedimento básico para todos os indivíduos foi a determinação:

- do comprimento dorsal do manto (CDM) em milímetros, medido na face dorsal, desde a extremidade posterior sagital até à extremidade anterior do manto;
- do peso individual (P) numa balança de precisão a 0,01g;
- do sexo;
- do estado de maturação;
- do peso do ovário (Pov) numa balança de precisão a 0,01g.

3.1.1. Determinação do sexo

A identificação sexual dos exemplares presentes na amostra foi efectuada, numa primeira abordagem, com base nas características da morfologia externa, que consistem no sêpion das fêmeas ser ligeiramente mais largo do que o dos machos e principalmente através da presença do 4º braço ventral esquerdo hectocotilizado nos machos desta espécie.

No entanto, nem sempre é possível identificar este dimorfismo sexual, pelo que se procedeu à observação dos órgãos reprodutores internos. Nos indivíduos juvenis ou imaturos a diferenciação sexual é difícil, só sendo possível mediante a observação microscópica pelo que, nestes casos, o sexo foi considerado indeterminado. Nos indivíduos adultos ou em maturação, as fêmeas são facilmente distinguíveis dos machos pela presença das glândulas nidamentares (gnp) de cor branco marfim e nidamentares acessórias (gna) de cor alaranjada (Figura 5).

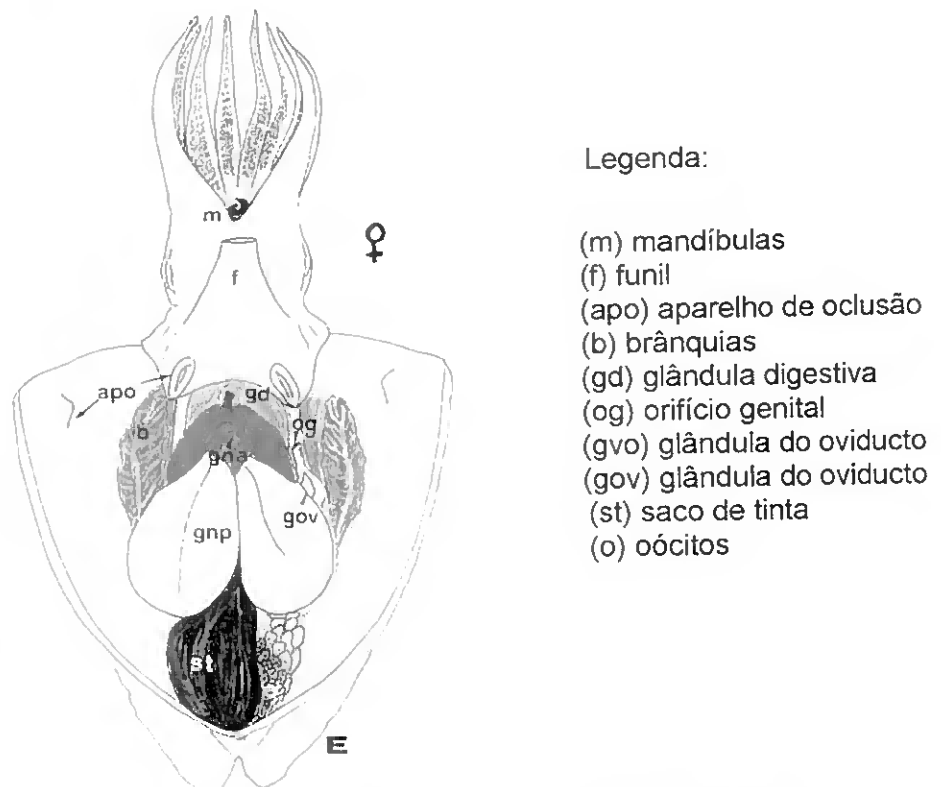


Fig. 5 - Pomenor da morfologia interna de uma fêmea de *Sepia officinalis* (face ventral) (adaptado de Martins, 1990).

3.1.2. Determinação do estado de maturação

A determinação do estado de maturação nas fêmeas e machos presentes neste estudo, foi efectuada utilizando para o efeito uma escala macroscópica adaptada de Mangold-Wirz (1963), Richard (1971) e Alonso-Allende & Guerra (1984) para *Sepia officinalis* descrita em Martins (1990), e que considera a existência de 4 estados de maturação (macroestados).

Esta escala baseia-se fundamentalmente na cor e tamanho da glândula nidamentar e no diâmetro oocitário dos oócitos presentes no ovário e na glândula do oviducto. Para os machos considera o tamanho do tracto genital e testículo, bem como a presença ou ausência de espermátóforos na bolsa de Needham (Tabela I - Anexo I).

3.2. Estudo da gametogénese

Para o estudo da gametogénese foram seleccionadas gónadas, representativas de determinado estado de maturação, e fixadas no líquido de San Felice que é uma mistura de ácido crómico (160ml de solução aquosa a 1%), de formol a 4% (80ml) e de ácido acético (10ml), preparado no momento de ser utilizado. Após um período de 24h, as gónadas foram lavadas em água corrente, com o objectivo de remover o fixador, e conservadas em álcool a 70%.

Seguidamente procedeu-se à desidratação, impregnação e inclusão das peças em "paraplast".

Depois de enrijecidas, as peças foram cortadas num micrótomo manual (Leitz 1512), em secções de 6 a 8 μ m de espessura. Algumas das lâminas foram inicialmente coradas com hematoxilina-eosina, tendo-se depois optado pela coloração do azul de toluidino, utilizado com sucesso por Boucaud-Camou *et al.* (1991) e por Koueta *et al.* (1993). Todas as lâminas foram posteriormente montadas em DPX.

Em seguida efectuou-se a análise histológica tendo-se identificado e fotografado as diferentes fases da gametogénese.

Para aprofundar o conhecimento da dinâmica oocitária em cada macroestado de maturação procedeu-se à medição dos eixos máximos de 400 a 500 oócitos, por macroestado de maturação, com um analisador de imagem (Image Pro Plus, versão 3.0). Este equipamento pode ser utilizado em simultâneo com um microscópio óptico ou com uma lupa binocular, dependendo do diâmetro dos oócitos que se pretendem medir.

3.3. Determinação da fecundidade

A fecundidade foi determinada pela contagem de oócitos maduros presentes no ovário de cada fêmea em estado de maturação IV. Cada gónada foi previamente pesada e dela retiradas e pesadas três sub-amostras, nas quais se efectuou uma separação dos oócitos tendo-se procedido à contagem dos oócitos em vitelogénese e hialinos. Com base na média do número de oócitos nas três sub-amostras efectuou-se a extrapolação para a totalidade da amostra, obtendo-se assim a fecundidade potencial individual.

Em adição a este processo, foram medidos 10 oócitos em cada uma das três subamostras, de modo a determinar o diâmetro médio dos oócitos maduros presentes nos ovários das fêmeas desta espécie.

Foi ainda contabilizado o número total e o diâmetro dos oócitos hialinos presentes em toda a gónada, com vista a estabelecer possíveis relações entre estes dados e outros parâmetros.

3.4. Tratamento dos dados

Inicialmente foi efectuada uma caracterização da população de acordo com a sua distribuição mensal ao longo do período amostrado.

A proporção dos sexos foi obtida para cada amostra e foi utilizado o teste Chi-quadrado (χ^2) ($p < 0,05$) para se determinar a significância estatística do "sex-ratio" relativamente à proporção sexual de 1:1.

As relações peso-comprimento foram calculadas separadamente para os indivíduos de sexo indeterminado, machos e fêmeas, tendo-se utilizado os valores dos pesos e CDM individuais. A estes valores foi ajustada uma curva do tipo exponencial, traduzida pela seguinte expressão:

$$P = a \text{ CDM}^b,$$

em que P é o peso individual, CDM é o comprimento dorsal do manto e a e b são as constantes da regressão peso-comprimento, obtidas pela seguinte equação linear

$$\text{Ln } P = q + b \text{ Ln } \text{CDM} \text{ recta de regressão,}$$

em que $q = (\text{Ln } a)$ é a ordenada na origem e b é o declive

Deste modo obtêm-se as equações da recta de regressão e respectivos coeficientes de correlação.

Por forma a avaliar a significância dos coeficientes de correlação foi consultada uma tabela dos respectivos valores significativos, aos níveis de significância de 0,05 e 0,01, associados a graus de liberdade que vão de 1 a 90 (Levin, 1987).

As relações entre o CDM-peso do corpo e CDM-peso do ovário foram estabelecidas utilizando os valores logaritmizados dos pesos e CDM individuais, para todas as fêmeas amostradas. A estes valores foi ajustada uma recta de regressão, obtendo-se assim as respectivas equações da recta de regressão e coeficientes de correlação. As pesagens das gónadas dos indivíduos do sexo masculino não foram efectuadas no decorrer das amostragens, pelo que não foi realizada qualquer análise utilizando este parâmetro morfométrico.

Com o objectivo de obter a distribuição de frequências de indivíduos por sexo e estado de maturação foram estabelecidas classes de CDM de 10mm.

Para o cálculo do comprimento de maturação foi considerado o tamanho a partir do qual 50% dos indivíduos se encontra maturo ($L_{50\%}$). Para a sua determinação foram calculadas as frequências relativas dos indivíduos maturos (Macroestado IV) por classes de comprimento de 10mm. Aos valores obtidos foi ajustada uma curva logística. Os valores de $L_{50\%}$ foram obtidos através do programa SAS System.

Por forma a testar a possível existência de diferenças significativas entre os parâmetros da curva de maturação obtida para os machos e fêmeas foi utilizado o teste T^2 de Hotelling (Bernard, 1981). Este teste baseou-se nos vectores dos parâmetros b e L_{50} e nas suas matrizes de variância-covariância. Parte-se da hipótese nula (H_0) de que os parâmetros $P_1(\sigma)$ são iguais a $P_2(\varphi)$ ($P_1=P_2$). No final do teste se T^2 for inferior a T^2_o ($T^2 < T^2_o$) então a hipótese nula não é rejeitada.

No caso em que T^2 é significativo ($T^2 > T^2_o$), este teste permite determinar qual dos parâmetros contribui para as diferenças, estatisticamente significativas, através do intervalo de confiança obtido entre as diferenças entre os parâmetros (DIF) (Morrison, 1976 *in* Bernard, 1981). Deste modo, quando o intervalo de confiança não inclui o zero, o parâmetro é significativo.

Os valores relativos à dinâmica mensal da maturação foram calculados em função da percentagem do número total de indivíduos amostrados em cada mês, tendo-se elaborado um gráfico por macroestado de maturação.

O índice gonadossomático, expresso em percentagem, foi determinado para as fêmeas, com base na seguinte expressão:

$$\text{IGS} = (\text{Peso do ovário}/\text{Peso total}) \times 100$$

Os valores obtidos de IGS foram posteriormente agrupados por amostra, de modo a obter a evolução mensal deste índice.

Os resultados das medições dos diâmetros oocitários foram agrupados em classes de 100 μ m, tendo-se elaborado um gráfico do tipo histograma, por macroestado de maturação.

Seguidamente por forma a identificar as componentes modais presentes em cada distribuição foi efectuada uma análise através do método Bhattacharya utilizando a rotina "Modal progression analysis" do programa FISAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools – versão 1.0).

Através deste procedimento são obtidos, para cada amostra, histogramas representativos da frequência dos diâmetros oocitários por macroestado de maturação. O ajuste das classes modais é feito tendo em conta, não só o melhor coeficiente de correlação (r^2), bem como o melhor ajuste das curvas modais aos histogramas. É ainda de salientar que o coeficiente de separação dos comprimentos modais deve ser igual ou superior a 2 para que a separação seja significativa.

Os diâmetros oocitários de cada estado histológico foram comparados através do teste *t-student* para duas amostras independentes, pressupondo que as populações oocitárias têm variâncias diferentes em estados histológicos distintos.

Relativamente aos resultados obtidos de fecundidade, estes foram inicialmente agrupados em classes de número de 10 oócitos, por forma a obter uma distribuição de frequências do número de fêmeas por fecundidade.

Seguidamente foram calculados os valores médios de fecundidade por classe de comprimento.

Os resultados foram posteriormente agrupados por amostra, tendo-se determinado a fecundidade média mensal e a variação dos valores de fecundidade ao longo do período amostrado.

As relações obtidas entre o número e diâmetro dos oócitos e outros parâmetros morfométricos, bem como entre o diâmetro dos oócitos e o seu número foram estabelecidas utilizando os valores individuais das fêmeas amostradas para a determinação da fecundidade.

De realçar que em algumas das relações analisadas um dos parâmetros utilizado é o diâmetro dos oócitos, enquanto que noutras é o diâmetro dos oócitos hialinos. A diferença entre estes parâmetros reside no facto de no primeiro caso se englobarem os oócitos em vitelogénese e hialinos contabilizados na determinação da fecundidade. No segundo caso analisam-se apenas os oócitos hialinos presentes no ovário, que podem ou não ter contribuído para os valores de fecundidade.

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição mensal da população amostrada

A Figura 6 apresenta a distribuição dos indivíduos ao longo do período de amostragem. Foram capturados de um total de 1613 indivíduos, 137 indivíduos de sexo indeterminado, 663 fêmeas e 813 machos.

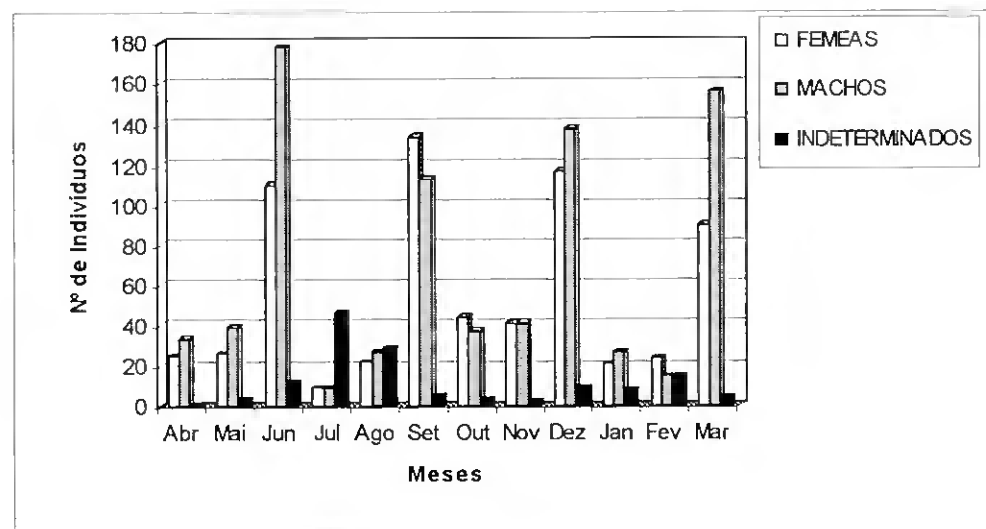


Fig. 6 – Distribuição do número de indivíduos ao longo do período de amostragem

O maior número de exemplares de sexo indeterminado foi capturado nos meses de Julho e Agosto de 1995, com 46 e 29 indivíduos, respectivamente. Os machos ocorreram ao longo de todo o ano, tendo-se registado as maiores capturas nos meses de Junho de 1995 (178 indivíduos) e Março de 1996 (156 exemplares). As fêmeas ocorreram também ao longo de todo o ano tendo sido capturadas em maior número nos meses de Setembro e Dezembro de 1995 (134 e 117 indivíduos, respectivamente).

4.2. Proporção de sexos

Durante o período de amostragem e de um modo geral, a percentagem de machos foi ligeiramente superior à das fêmeas, sendo as fêmeas predominantes apenas nos meses de Setembro e Outubro de 1995 e Fevereiro de 1996. Nos meses de Julho e Novembro de 1995 o número de machos capturados foi exactamente o mesmo do número de fêmeas capturadas. A percentagem de machos, ao longo dos meses amostrados, variou entre 0.63 em Fevereiro de 1996 e 1.73 em Março do mesmo ano (Tabela I).

Tabela I – Número de machos (M) e fêmeas (F) amostrado e percentagem de machos em relação ao número de fêmeas (M/F) ao longo do período amostrado

	94							95				
Meses	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar
M	33	39	178	9	27	113	37	41	138	27	15	156
F	25	26	110	9	22	134	44	41	117	21	24	90
M/F	1,32	1,5	1,62	1	1,23	0,84	0,84	1	1,18	1,29	0,63	1,73

A variação observada nesta proporção de sexos, em todas as amostras, não diferiu significativamente ($p>0,05$) da proporção de 1:1, pelo que se pode considerar que o número de machos e de fêmeas é igual.

4.3. Relações entre parâmetros morfométricos

4.3.1. Peso-comprimento

A relação entre o CDM(mm) e o peso do corpo(g) para os indivíduos de sexo indeterminado, machos e fêmeas revelou-se linear, existindo correlação positiva com coeficientes de correlação (r^2) iguais a 0.988, 0.992 e 0.995, respectivamente (Figura 7).

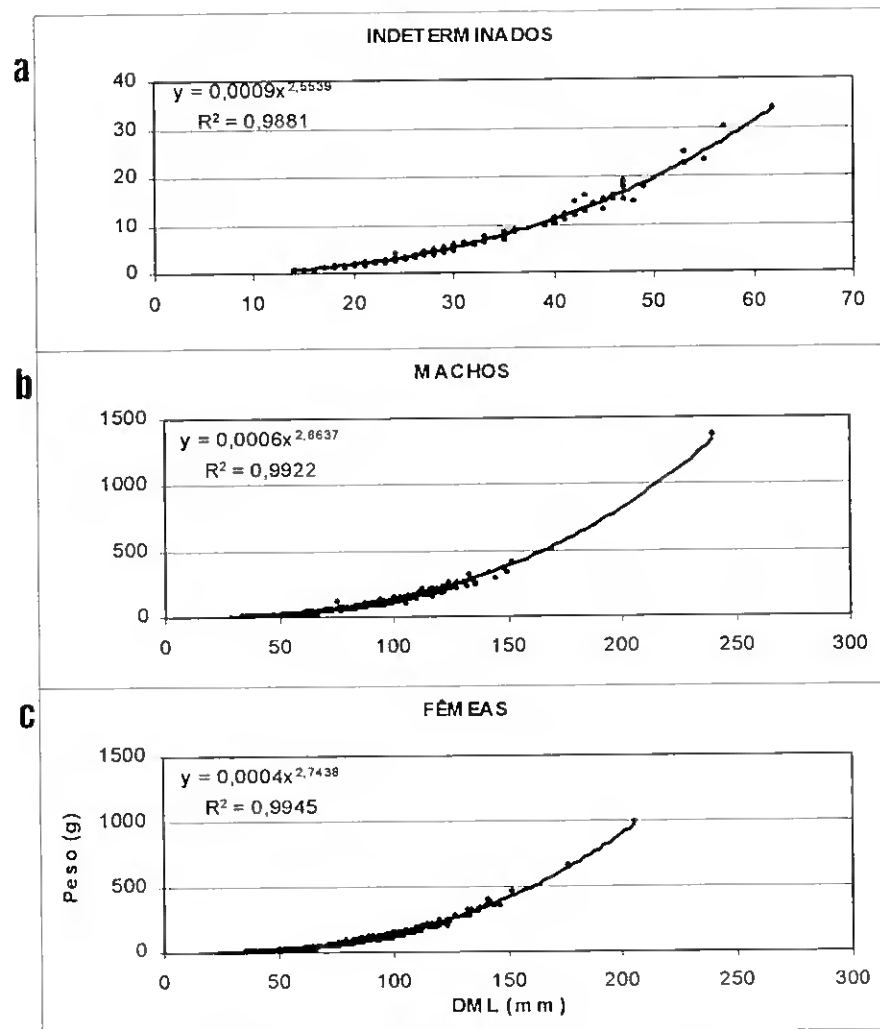


Fig. 7 – Relação entre o CDM e o peso do corpo
a) Indeterminados b) Machos c) Fêmeas

A partir dos parâmetros resultantes da regressão linear (Tabela I – Anexo II), obtiveram-se as seguintes relações:

Indeterminados $P = 0,0009CDM^{2,5539}$

Machos $P = 0,0006CDM^{2,6637}$

Fêmeas $P = 0,0004CDM^{2,7438}$

Em todas as relações obtidas o coeficiente de correlação foi sempre significativo ($p < 0.01$).

4.3.2. Peso do ovário-CDM e peso do ovário-peso do corpo

As relações entre o CDM e o peso do ovário e o peso do corpo e o peso do ovário são ambas significativas ($p < 0,001$) e apresentam coeficientes de correlação muito aproximados (0,7882 e 0,7986) (Figura 8). Os restantes parâmetros obtidos através das respectivas regressões lineares encontram-se resumidos nas Tabela II e III do Anexo II.

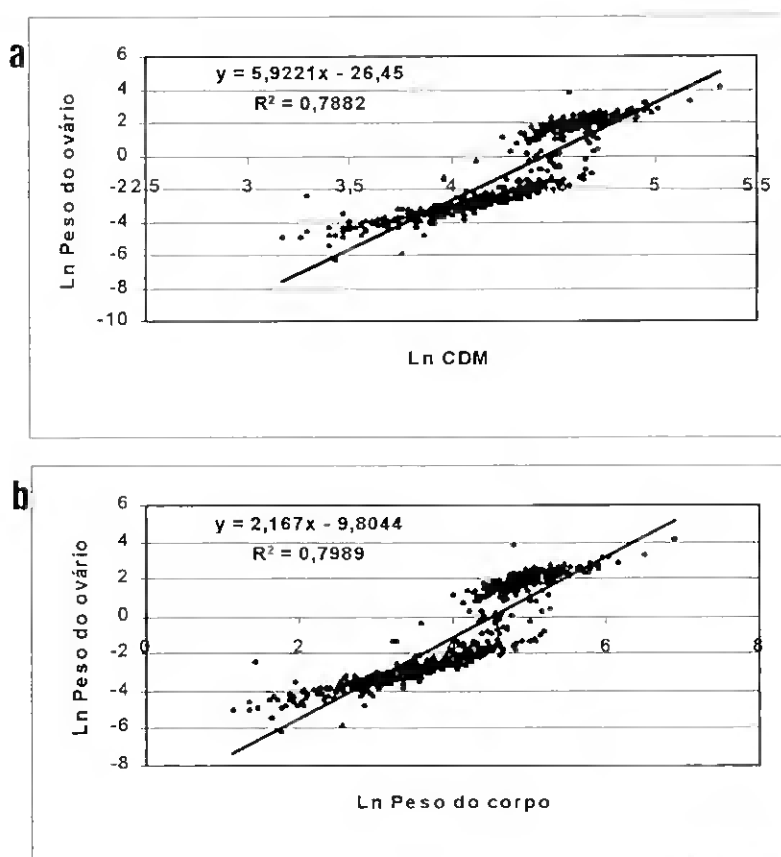


Fig. 8 – Regressão linear entre o CDM e o peso do ovário(a) e o peso do corpo e o peso do ovário(b)

4.4. Distribuição de classes de comprimento

4.4.1. Frequência de indivíduos

A Figura 9 apresenta a distribuição, por classe de comprimento, do número de indivíduos no período de amostragem (Abril de 1995 a Março de 1996). Foram capturados indivíduos, cujo CDM variou entre 10 e 240mm, medindo as fêmeas entre 20 e 200mm e os machos entre 20 e 240mm.

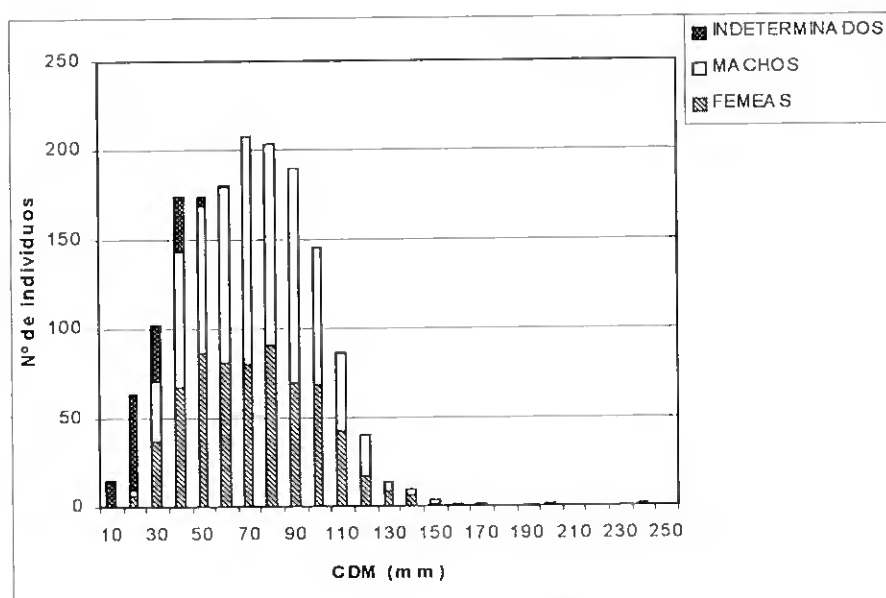


Fig. 9 – Distribuição de frequências dos indivíduos capturados no período de amostragem

A classe modal dos indivíduos imaturos correspondeu a 20mm, tendo-se verificado a presença de 54 indivíduos nesta classe. Quanto aos machos a classe em que se verificou maior número de indivíduos foi a de 90mm (120 exemplares), tendo-se verificado também um elevado número de indivíduos (superior a 90) nas classes de comprimento de 60 a 80mm. Relativamente às fêmeas a sua maior ocorrência (superior a 80 indivíduos) verificou-se nas classes de 50 a 80mm, sendo a classe modal correspondente a 80mm (91 indivíduos).

4.4.2. Frequência de indivíduos por macroestado de maturação

Na Figura 10 encontra-se representada a distribuição por classe de comprimento dos indivíduos por macroestado de maturação.

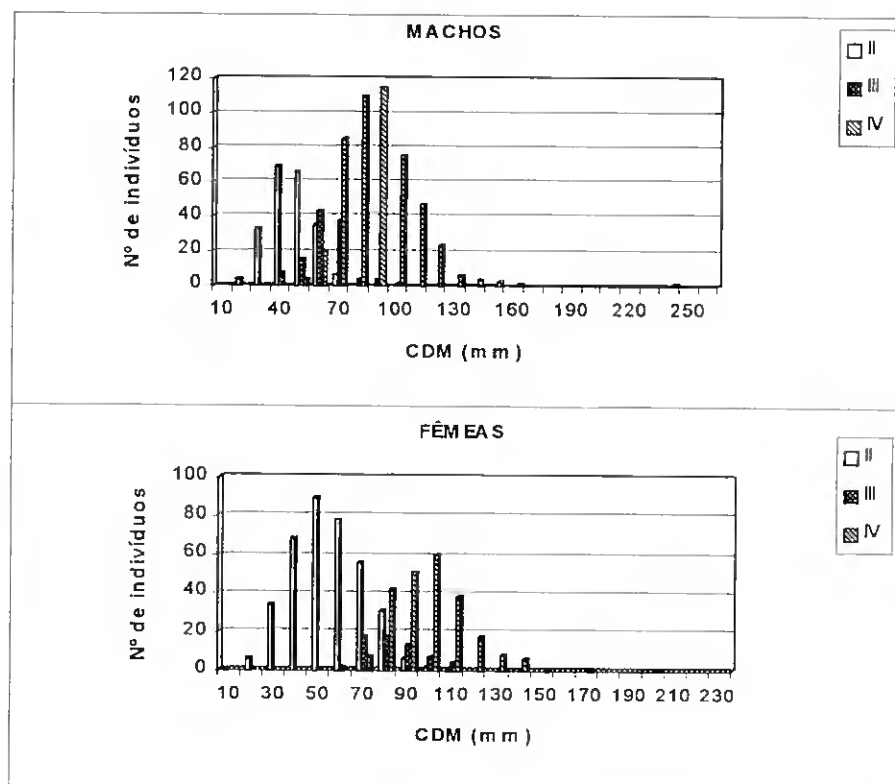


Fig. 10 – Distribuição de frequências dos indivíduos por macroestado de maturação

Pela análise da distribuição de frequências por macroestado de maturação dos machos é possível verificar que os machos no macroestado II se distribuem desde a classe 20 até à classe 70mm, ocorrendo em maior número nas classes 40 e 50mm (69 e 65 indivíduos, respectivamente). Os machos no macroestado III ocorreram desde a classe 40 e 100mm, ocorrendo em maior quantidade nas classes 60 e 70mm (respectivamente, 43 e 37 exemplares). Os machos no macroestado IV estão presentes em maior número nas classes de comprimento de 80 e 90mm, com 110 e 115 indivíduos, respectivamente, distribuindo-se desde a classe 50 até à classe 160mm. A partir desta classe só foi encontrado 1 indivíduo na classe 240mm.

Relativamente às fêmeas que se encontravam no macroestado de maturação II a sua distribuição fez-se desde a classe 20mm até à de 100mm, encontrando-se o maior número de indivíduos nas classes 50 e 60mm (89 e 78, respectivamente). No macroestado III, as fêmeas distribuem-se desde a classe 60mm até à 110mm, ocorrendo em maior quantidade na classe 70 e 80mm (17 e 18 indivíduos). No macroestado IV, a sua distribuição verificou-se desde a classe 70mm e 150, tendo-se encontrado um exemplar nas classes 170 e 200mm; a maioria dos indivíduos pertencia à classe 90 e 100mm (51 e 60 indivíduos, respectivamente).

4.4.3. Comprimento de maturação

Os gráficos relativos à frequência relativa de indivíduos maduros (fêmeas e machos no macroestado IV) por classe de comprimento são apresentados na figura 11.

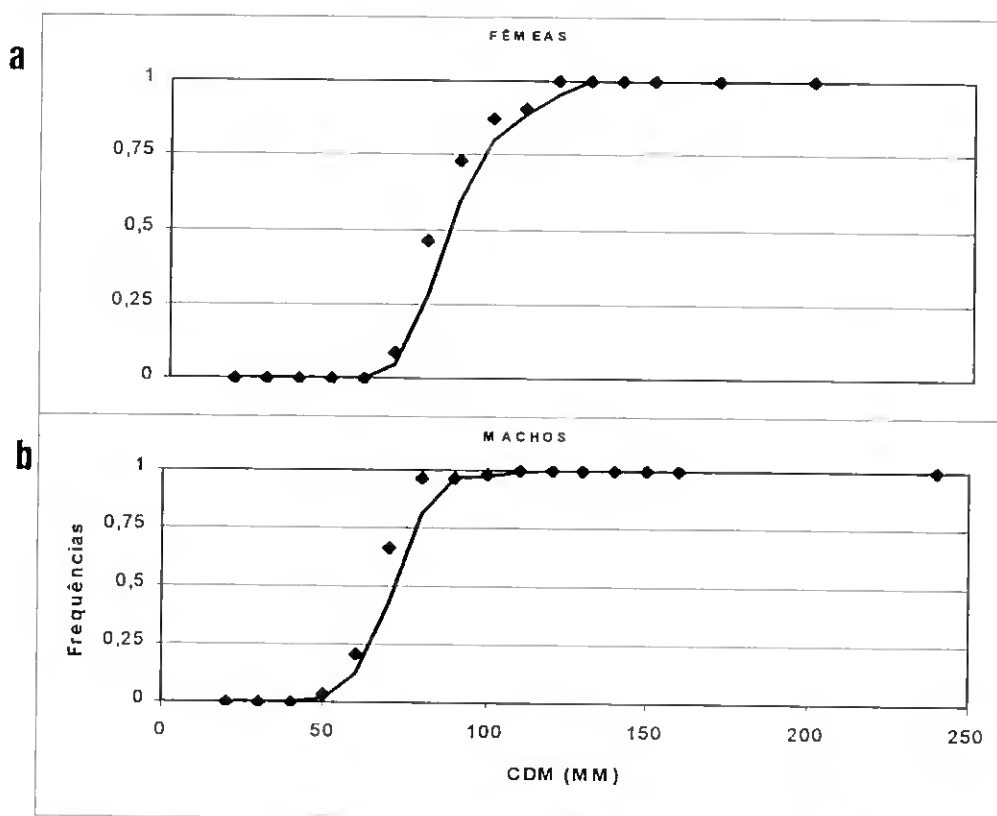


Fig. 11 – Curvas de maturação obtidas para as fêmeas(a) e machos(b)

O valor de CDM 50% é para os machos 66.59mm e para as fêmeas 80.17mm (Tabela I e II – Anexo III).

Através da aplicação do teste T^2 de Hotelling a hipótese nula foi rejeitada ($T^2 > T^2_0$), verificando-se assim a existência de diferenças significativas entre os parâmetros (b e L_{50}) das curvas de maturação dos machos e fêmeas. No caso presente ambos os parâmetros contribuíram significativamente para as diferenças encontradas (Tabela III – Anexo III).

4.5) Caracterização mensal

4.5.1) Macroestados de maturação

A Figura 12 representa a evolução mensal dos macroestados de maturação observados para os indivíduos de ambos os sexos ao longo do período de amostragem.

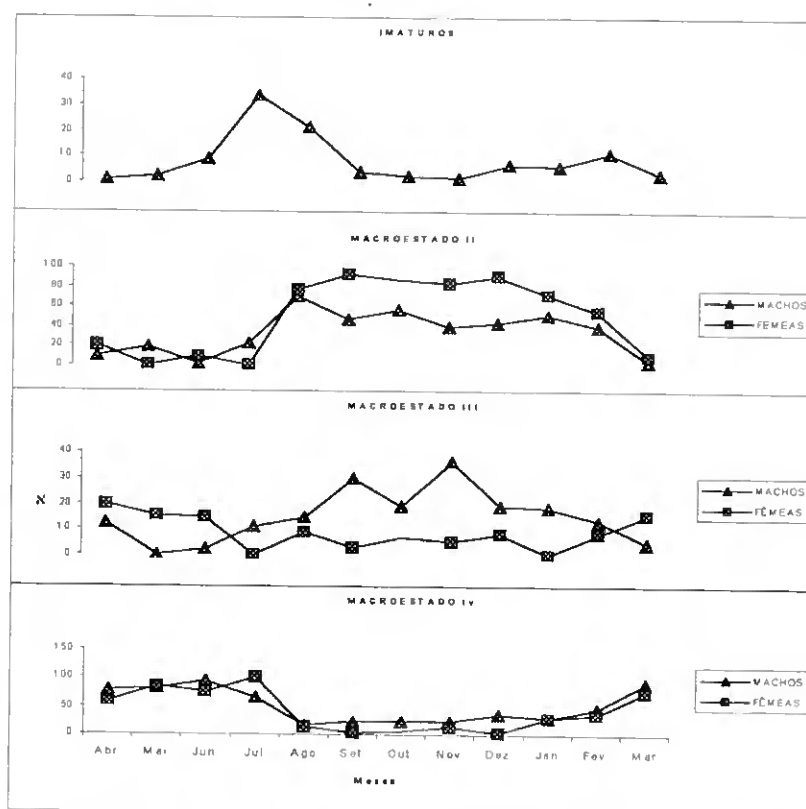


Fig. 12 – Evolução mensal dos macroestados de maturação ao longo do período amostrado

É possível observar um número acentuado de indivíduos imaturos nos meses de Julho e Agosto de 1995. Este aumento de indivíduos imaturos é precedido por um grande número de indivíduos em maturação ou maduros, no mês de Junho de 1995, em que se verifica a ocorrência de machos e fêmeas que se encontram maioritariamente no estado de maturação IV.

Os machos apresentam-se em maturação (macroestados II e III) no Verão, Outono e início do Inverno. Os machos maduros (macroestado IV) ocorrem principalmente nas estações da Primavera, início do Verão e Inverno..

Relativamente às fêmeas, os indivíduos em maturação (macroestado II) ocorrem, tal como os machos, no Verão, Outono e início do Inverno. Os indivíduos no macroestado III ocorrem em maior percentagem no final da Primavera, início de Verão e Inverno. Quanto às fêmeas maduras, a sua distribuição acompanha a dos machos maduros, verificando-se a sua maior percentagem nas estações da Primavera, Verão (grande parte) e Inverno.

4.5.2. Índice gonadossomático

A Figura 13 representa a evolução mensal do índice gonadossomático (IGS) das fêmeas capturadas no período de amostragem.

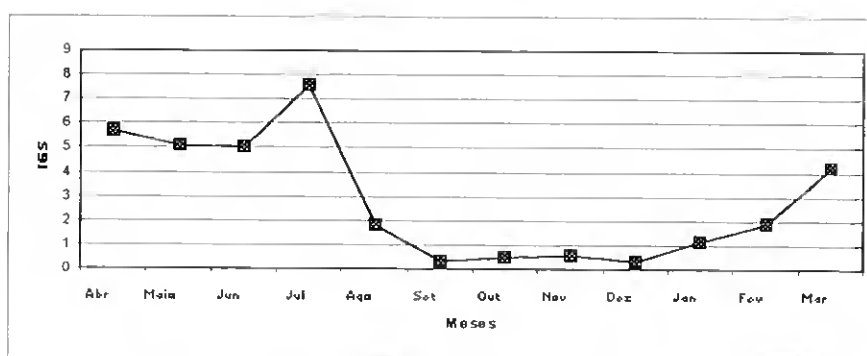


Fig. 13 – Evolução mensal do índice gonadossomático (IGS)

O valor médio mensal do índice gonadossomático, para as fêmeas analisadas, variou entre 0.37 em Dezembro de 1995 e 7.62 em Julho do mesmo ano. Os valores mais elevados verificaram-se nas estações da Primavera e do Verão (até ao mês de Julho). O valor máximo individual de IGS foi obtido em Junho (9.13) para uma fêmea com as seguintes características morfométricas: peso do corpo de 157.3g, CDM de 104mm e peso da gónada (ovário) de 14.362g.

4.6. Descrição da gametogénese

4.6.1. Oogénese

O desenvolvimento oocitário inicia-se com a transformação de um conjunto de células germinais, as oogónias, em células mais complexas, os oócitos (Figura 14). Neste processo ocorre um crescimento celular das células sexuais, durante o qual se dá a acumulação de vitelo.



Fig. 14 – Oócitos em vários estados de desenvolvimento ($\times 40$):
a: IIIa, b: IIIb, c: IV

O processo de oogénese na espécie *Sepia officinalis* inclui, segundo vários autores, seis estados histológicos de desenvolvimento celular diferentes resumidos na tabela II.

Tabela II – Critérios fisiológicos utilizados para a determinação dos estados de crescimento oocitário (adaptado de Richard, 1971; Dhainaut & Richard, 1976)

Gâmeta feminino	Células foliculares	Microestado
Oogónias: mitoses	-	1
Oócito I - fraco crescimento oocitário - Prófase da meiose	-	2
Oócito I - rápido crescimento - Previtelogénese	Dispostas na periferia do oócito	3a
	Dispostas num cordão intra-oocitário	3b
Oócito I - rápido crescimento - Vitelogénese	Actividade secretora	4
Oócito I - rápido crescimento - Final da vitelogénese	Elaboração do córion	5
Oócito II - emissão dos glóbulos polares após a fertilização	-	6

Estado histológico II – Neste estado os oócitos apresentam pequenas dimensões (entre 60 e 120 μ m). O núcleo ocupa grande parte do citoplasma (Figura 15).



Fig. 15 – Oócito I no estado histológico II ($\times 100$). É visível o núcleo(n) ocupando grande parte do citoplasma (c)

Estado histológico IIIa – Neste estado os oócitos apresentam uma forma esférica, cujo diâmetro varia entre 40 a 900 μ m. Estas células apresentam um núcleo central de 75 μ m de diâmetro médio, no qual se observam filamentos de cromatina distribuídos de forma homogênea por todo o nucleoplasma. O núcleo ocupa cerca de 22% da área do citoplasma. É possível constatar em alguns oócitos uma posição menos central do núcleo, mais próxima do futuro pólo animal. As células foliculares, pouco numerosas, dispõem-se na periferia do oócito formando assim uma camada contínua à sua volta (Figuras 16 e 17).

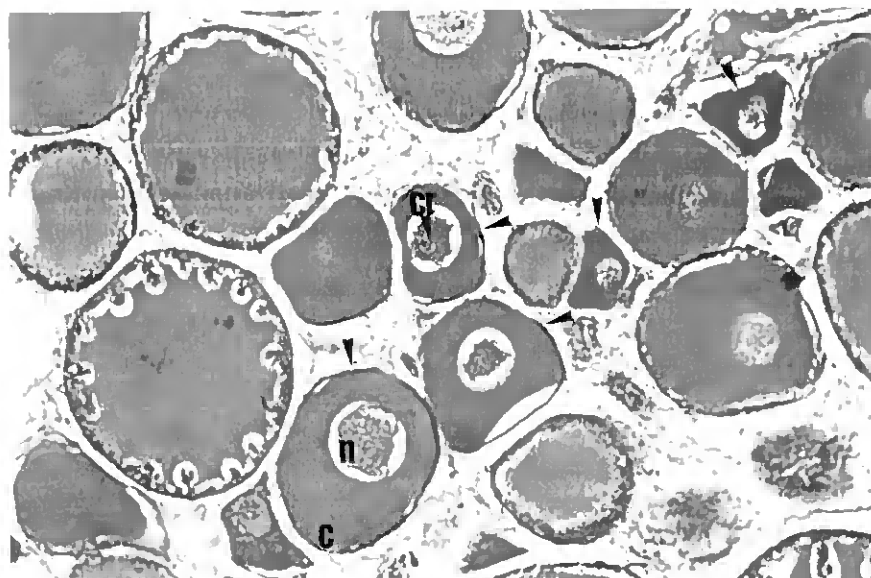


Fig. 16 – Diversos oócitos no microestado IIIa (x40)
n: núcleo; c: citoplasma; cr: cromatina

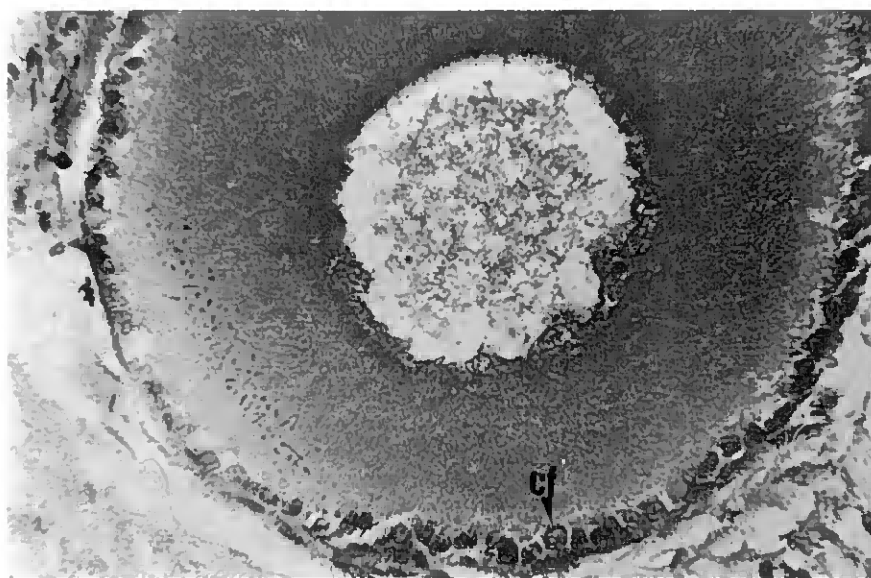


Fig. 17 – Oócito I no microestado IIIa (x100). É visível a disposição das células foliculares (cf) a circundar o oócito

Estado histológico IIIb – Neste estado os oócitos adquirem maiores dimensões (entre 90 e 2400 μ m). O núcleo, cujo diâmetro médio é de 100 μ m encontra-se mais próxima do pólo animal do oócito, ocupando uma menor porção do citoplasma (cerca

de 8%). As células foliculares multiplicam-se activamente e dispõem-se em duas camadas, formando cordões foliculares que penetram para o interior do citoplasma do oócito. A disposição característica dos cordões foliculares confere ao oócito um aspecto estriado (Figuras 18 a 20).

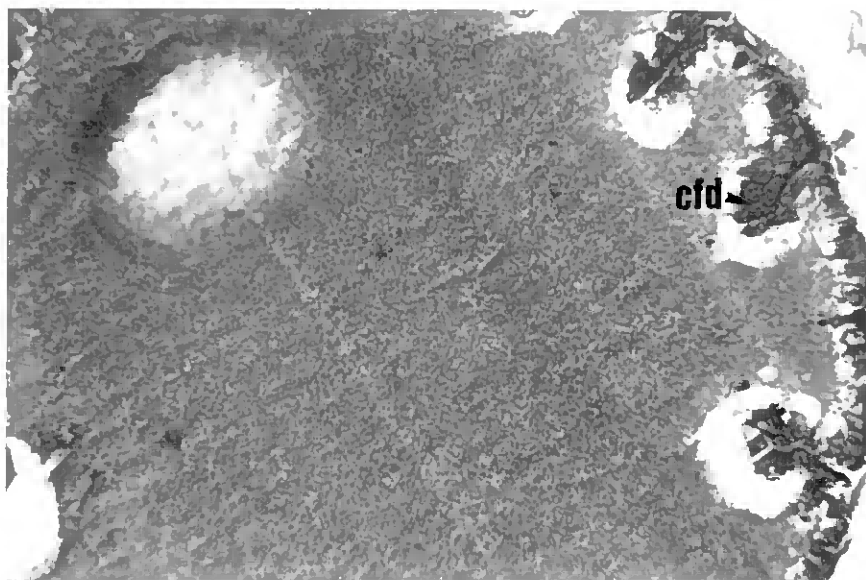


Fig. 18 – Oócito I no estado histológico IIIb ($\times 400$). É possível observar o início da penetração dos cordões foliculares (cfd) para o interior do citoplasma (c) do oócito

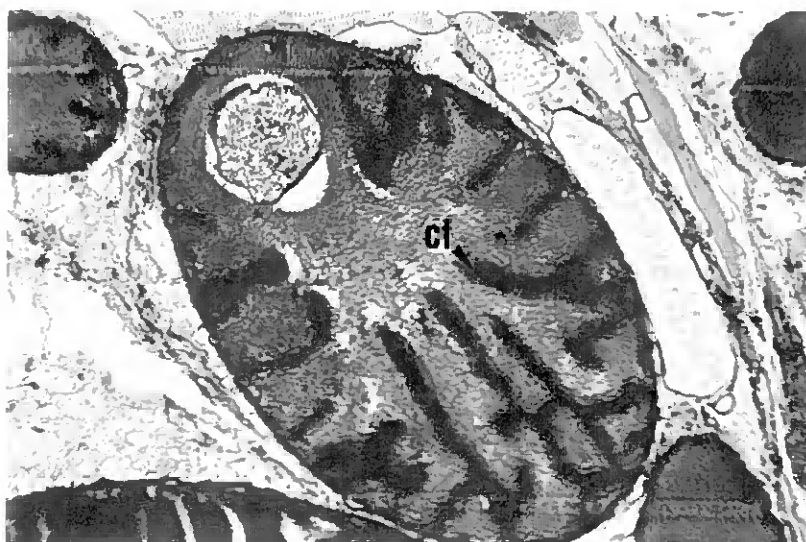


Fig. 19 – Oócito no estado histológico IIIb ($\times 100$). É visível a progressão das células foliculares (cf) para o interior do citoplasma



Fig. 20 – Pormenor dos cordões foliculares (cdf) num oócito no estado IIIb ($\times 400$)

Estado histológico IV – Neste estado continua a verificar-se um crescimento dos oócitos, cujas dimensões variaram entre 300 e 4900 μm . Os cordões foliculares ocupam grande parte do citoplasma onde é possível observar a deposição de vitelo. O núcleo já não é visível. As células foliculares, de forma cilíndrica, apresentam um elevado crescimento do núcleo. (Figura 21 e 22).

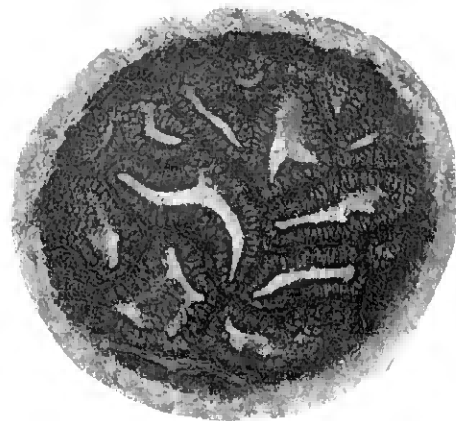


Fig. 21 – Oócito I no estado IV ($\times 100$). Os cordões foliculares ocupam grande parte do citoplasma do oócito

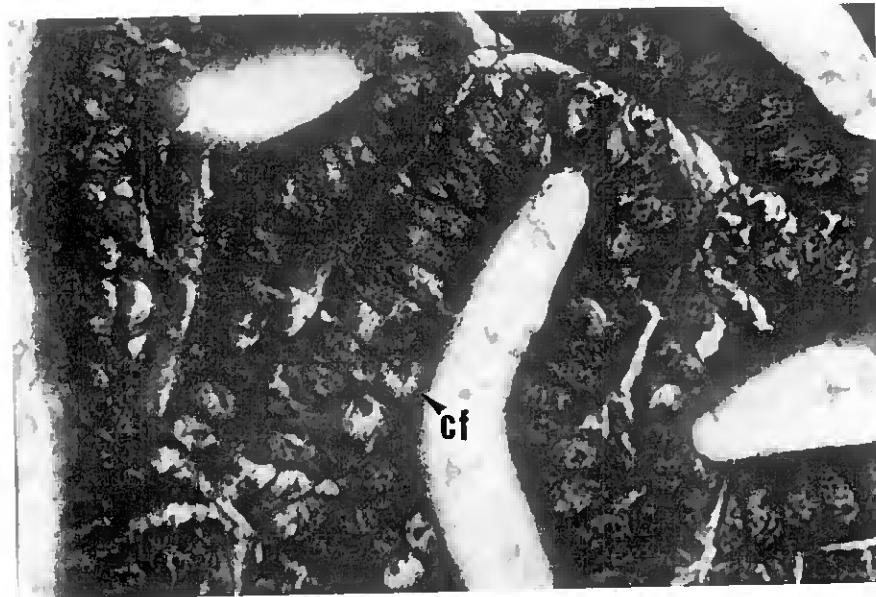


Fig. 22 – Pormenor do enrugamento dos cordões foliculares num oócito no estado IV (x400). São visíveis as células foliculares(cf)

Estado histológico V – Neste estado os oócitos atingem grandes dimensões (entre 1100 e 5100 μ m). Dá-se a regressão das células foliculares devido à expansão do vitelo no citoplasma e inicia-se a formação do córion. (Figura 23 a 25)

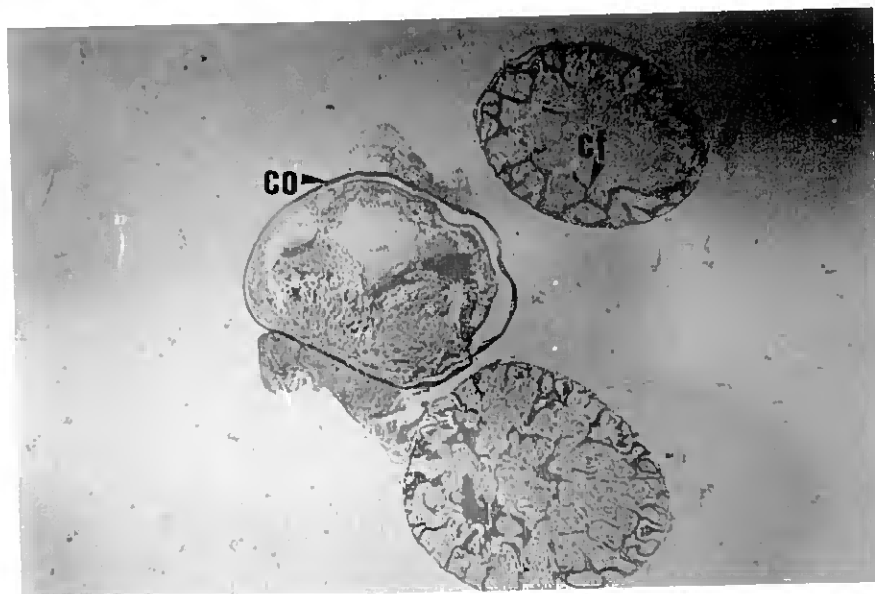


Fig. 23 – Oócitos no estado histológico V (x 60). É visível a regressão das células foliculares (cf) e a formação do córion (co)

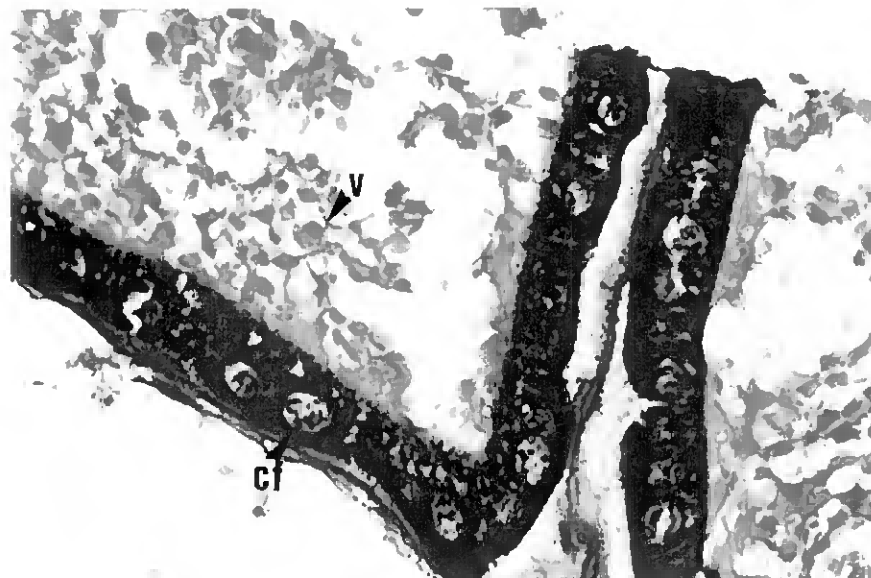


Fig. 24 – Oócito V ($\times 400$). Observa-se a formação do vitelo (v) e a presença de células foliculares (cf) cilíndricas



Fig. 25 – Pormenor do córion (co) ($\times 100$)

4.6.2. Espermatogénese

Segundo Richard (1971) são seis os estados microscópicos de maturação resumidos na Tabela III.

Tabela III – Escala microscópica representativa da evolução citológica (microestados) do gâmeta masculino (adaptado de Richard, 1971)

Gâmeta masculino	Microestado
Espermatogónias: mitoses	1
Espermatogénese:	
Espermatócito I - crescimento e meiose	2
Espermatócito II	3
Espermiogénese:	
Espermatídeo esférico	4
Espermatídeo em alongamento	5
Diferenciação do espermatozóide	6

Devido às reduzidas dimensões dos diferentes estados celulares, a descrição que se segue foi em parte baseada na descrição efectuada por Richard (1971).

Estado histológico I – Característico das gónadas dos indivíduos após a eclosão, sendo possível observar espermatogónias primárias junto à periferia do tubo seminífero. O núcleo destas células é ovóide e de forma irregular. Pode ainda verificar-se a presença de espermatogónias secundárias, em cujos núcleos é possível observar divisões mitóticas.

Estado histológico II – Neste estado encontram-se presentes na gónada os espermatócitos I ou de primeira ordem, que resultam do crescimento das espermatogónias. Os organitos presentes nestas células são praticamente os mesmos, pelo que por vezes é difícil distinguir uma espermatogónia secundária de um espermatócito I em início de desenvolvimento. Os espermatócitos I apresentam um núcleo central de forma esférica, que pode atingir o diâmetro de 8 a 10 μ no final do seu crescimento e onde se podem observar algumas figuras da meiose (Figura 26).

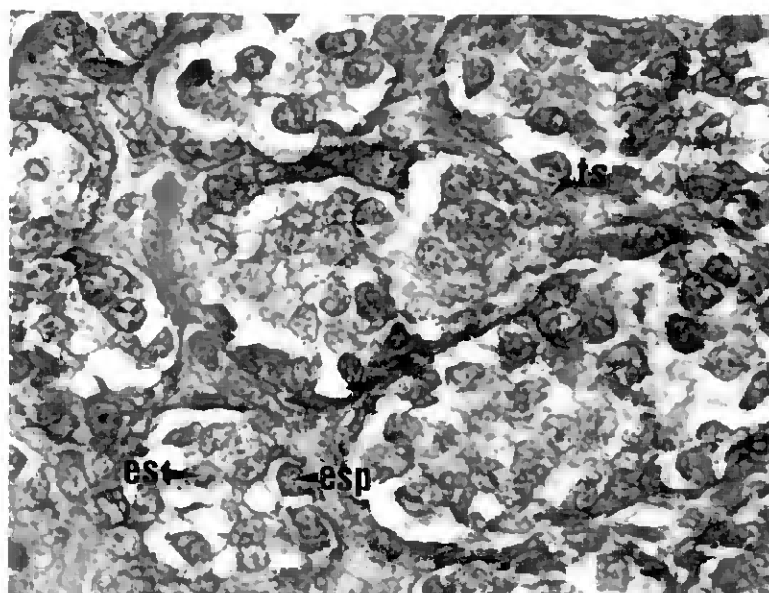


Fig. 26 – Corte transversal dos túbulos seminíferos (ts) no macroestado II ($\times 400$). Observam-se espermatogônias (esp) e espermatócitos I (es1)

Estado histológico III – Após a primeira divisão da meiose formam-se os espermatócitos II ou de segunda ordem, característicos deste microestado. O núcleo destas células tem forma ovóide sendo o seu tamanho metade do dos espermatócitos primários (Figura 27).

Estado histológico IV – Neste estado inicia-se a espermiogénese. Os espermatídeos, resultantes da segunda divisão da meiose, apresentam o núcleo sensivelmente esférico de 4 a 5 μ . Os centrossomas tornam-se visíveis, dando-se a migração dos centríolos para um dos pólos do núcleo. O centríolo distal (mais perto do núcleo) vai estar na origem do flagelo posterior. No citoplasma, as vesículas do complexo de Golgi fundem-se para formar o acrossoma.

Estado histológico V – Dá-se o alongamento do núcleo dos espermatídeos que adquire um diâmetro de 2,5 μ e um comprimento de 6 μ . As mitocôndrias migram para a porção posterior da célula e à medida que se agrupam, sobre o núcleo, o seu aspecto modifica-se e acabam por rodear os microtúbulos originados pelo centríolo posterior (Figura 27).

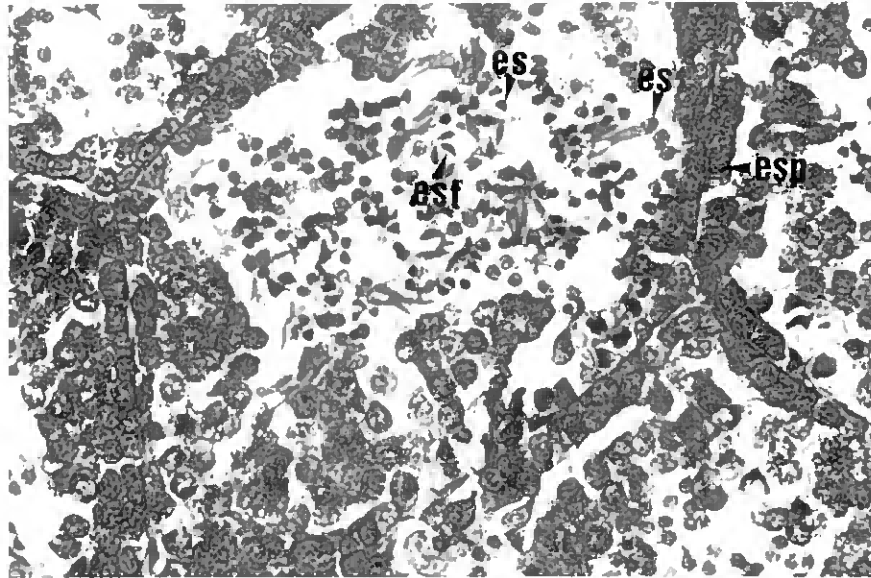


Fig. 27 – Gónada de um macho no macroestado III ($\times 400$). São visíveis espermatogónias (esp), espermatócitos I (es1) e II (es2) e espermatídeos (est)

Estado histológico VI – Ocorre a diferenciação do espermatozóide que é descrito através de microscopia óptica em 4 partes: coifa cefálica cabeça, peça intermédia ou segmento mitocondrial e cauda (Figura 28 e 29).



Fig. 28 – Gónada de um macho no macroestado IV ($\times 100$). Observa-se a presença de espermatozóides (ez) no lúmen (lu) do tubo seminífero

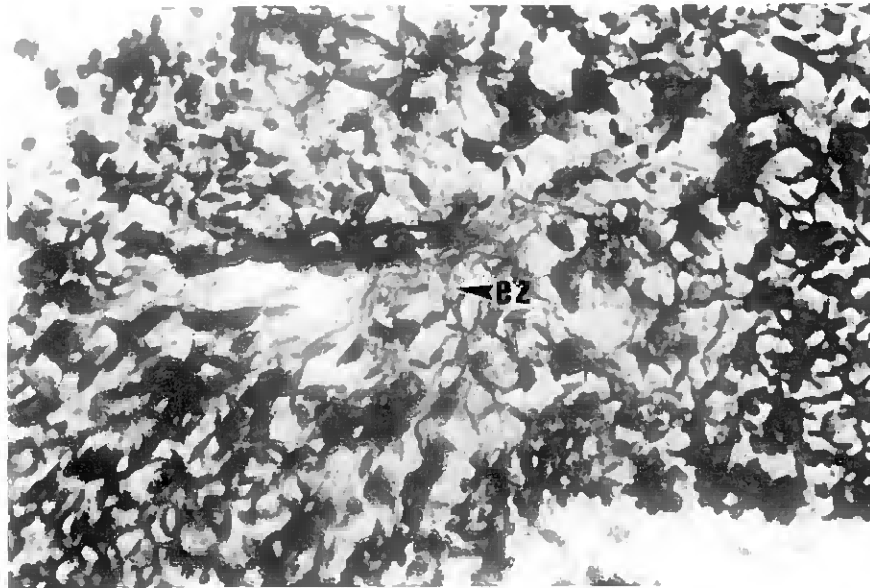


Fig. 29 – Gónada de um macho no macroestado IV ($\times 400$).
Pormenor dos espermatozóides (ez) no lúmen (lu)
do tubo seminífero

4.7. Desenvolvimento oocitário por macroestado de maturação

4.7.1. Distribuição de frequências dos diâmetros oocitários

A Figura 30 representa a distribuição de frequências dos diâmetros oocitários medidos em cada macroestado de maturação, bem como uma interpretação para a evolução das diferentes componentes modais identificadas pelo método de Bhattacharya.

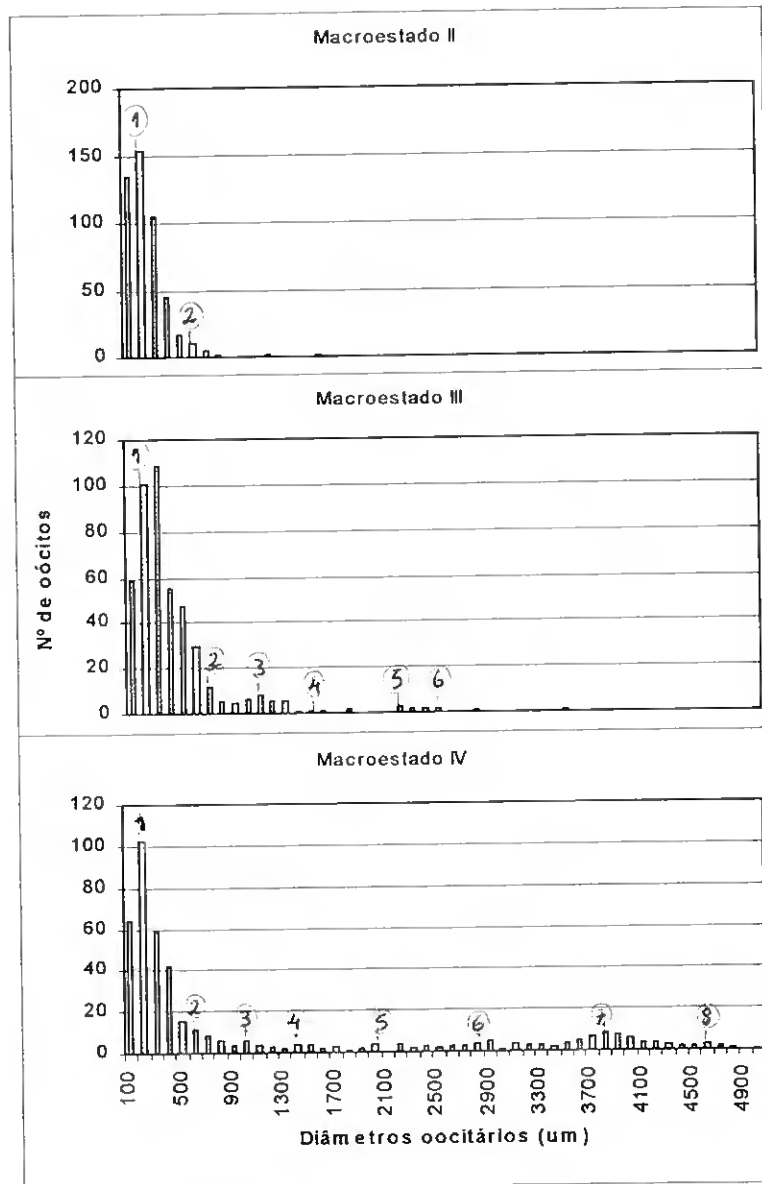


Fig. 30 – Distribuição de frequências dos diâmetros oocitários em cada macroestado de maturação. Os números indicam as classes modais obtidas pelo método de Bhattacharya

É possível constatar que a distribuição de frequências dos oócitos no macroestado II faz-se principalmente entre as classes 100 e 700µm, verificando-se

que as classes que apresentam maior número de oócitos são as classes 100 a 300 (com 73, 78 e 75 oócitos, respectivamente). No macroestado III verifica-se o aparecimento de oócitos de maior diâmetro (entre 100 e 3500 μm), em que o maior número de oócitos é encontrado nas classes cujo diâmetro varia entre 200 e 500 μm . Relativamente ao macroestado IV verifica-se uma maior dispersão dos oócitos nas classes de maior diâmetro, verificando-se ainda a presença de oócitos nas classes de menor diâmetro com elevadas frequências (>20 oócitos/classe). O maior oócito medido pertenceu à classe 4800 μm .

A análise pelo método de Bhattacharya permitiu identificar, em cada macroestado de maturação, as diversas componentes modais, sendo possível observar a sua evolução ao longo dos diferentes macroestados de maturação. Deste modo foram identificadas oito componentes modais.

A primeira componente modal é observada no macroestado de maturação II, apresentando um diâmetro médio de 175,76 μm e cuja evolução prolonga-se até ao macroestado IV onde apresenta um diâmetro médio de 215,63 μm . Neste macroestado de maturação surge ainda a segunda componente cujo diâmetro médio de 598,11 μm evolui no estado IV para 681,70 μm .

No macroestado III surgem as componentes três, quatro, cinco e seis, cujos diâmetros médios de 1088,03 μm , 1556,55 μm , 2150 μm e 2250 μm evoluem no estado IV para 1021,09 μm , 1450,97 μm , 2092,1 μm e 2811,51 μm , respectivamente.

As sétima e oitava componentes surgem no macroestado de maturação IV com valores médios de 3808,1 μm e 4614,36 μm .

Os resultados da análise das componentes modais dos diâmetros oocitários, obtidos pelo programa FISAT, encontram-se em Anexo (Tabela I e Figuras 1 a 3 - Anexo IV).

4.7.2. Classificação morfológica dos oócitos

A percentagem de oócitos, por microestado de maturação, em cada macroestado encontra-se representada na Figura 31.

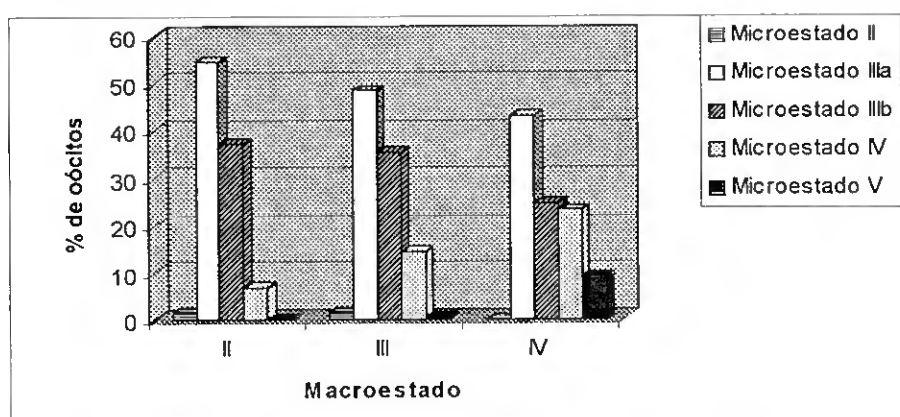


Fig. 31 – Percentagem de oócitos, por microestado de maturação, em cada macroestado de maturação.

No macroestado II verifica-se a presença de todos os estados histológicos, com excepção do microestado V, encontrando-se a maior percentagem de oócitos nos microestados IIIa e IIIb. No macroestado III constata-se o aparecimento de alguns oócitos no microestado V e pode observar-se, por um lado, uma ligeira diminuição na percentagem de oócitos nos estados histológicos IIIa e IIIb e por outro, um aumento de oócitos no microestado IV. No último macroestado de maturação não foram observados oócitos no microestado II, continuando a verificar-se a presença de oócitos nos restantes microestados. Deste modo, ocorre uma diminuição dos oócitos que se encontram nos microestados IIIa e IIIb e um aumento dos que se encontram nos estados histológicos IV e V.

A Figura 32 representa a evolução dos diâmetros médios ao longo dos quatro estados histológicos identificados neste trabalho.

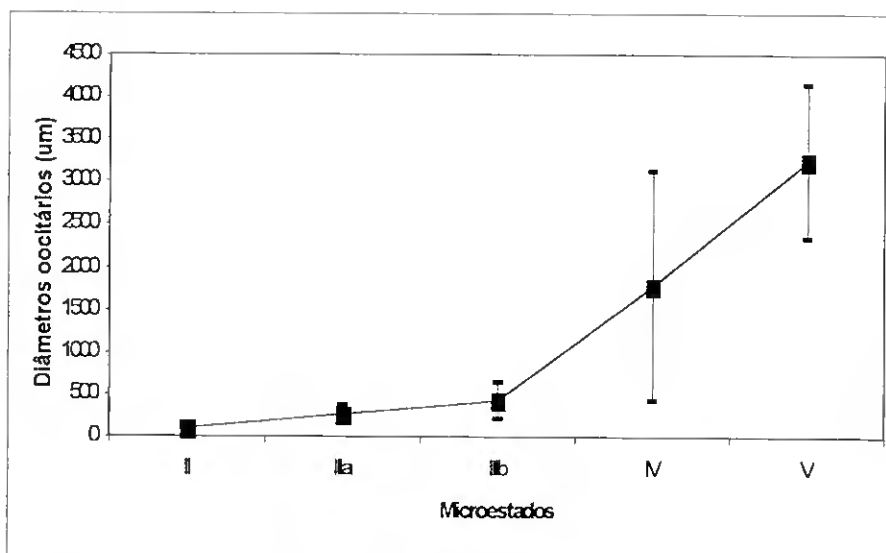


Fig. 32 – Evolução dos diâmetros médios e respectivos desvios padrão nos diversos estados histológicos

É possível observar que à medida que o diâmetro médio oocitário aumenta, os valores do desvio padrão vão sendo mais elevados. Os valores médios dos diâmetros oocitários variaram entre $87.9\mu\text{m}$ no microestado II e $3247\mu\text{m}$ no microestado V. O maior aumento registou-se na passagem do estado histológico IIIb para o estado IV.

Os resultados estatísticos referentes às medições dos diâmetros oocitários efectuados em cada microestado de maturação e respectivas análises estatísticas encontram-se na Tabela I – Anexo V.

Os resultados do teste *t-student* (Tabela II – Anexo V) aplicado aos valores dos diâmetros médios de cada estado histológico são significativamente diferentes entre os estados histológicos II e IIIa ($p < 0.001$), IIIa e IIIb ($p < 0.001$), IIIb e IV ($p < 0.001$) e IV e V ($p < 0.001$). A figura mostra o aumento progressivo dos diâmetros médios dos microestados sucessivos.

4.8. Determinação da fecundidade

4.8.1. Fecundidade individual

Após a contagem do número de oócitos presentes em 76 ovários de fêmeas no estado de maturação IV foram obtidos os resultados apresentados na Figura 33.

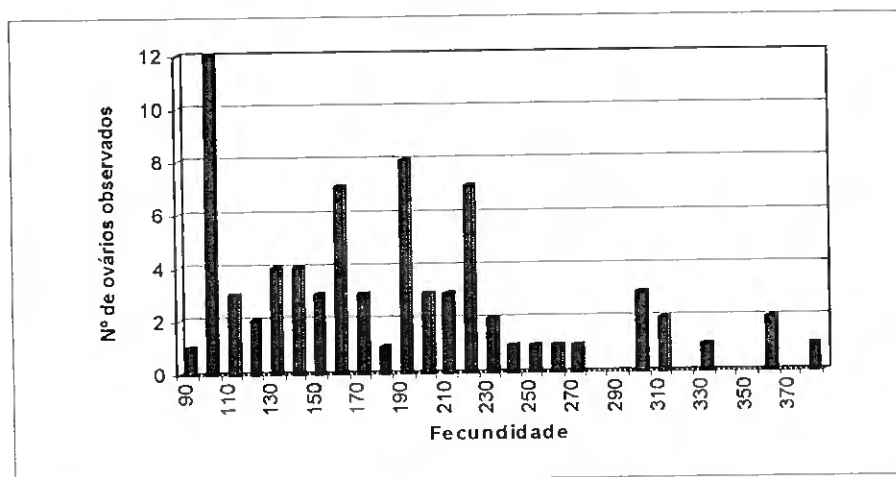


Fig. 33 – Frequência de ovários por número de oócitos presentes no ovário

O valor de fecundidade individual, para as 76 fêmeas analisadas, variou entre 98, para uma fêmea de CDM de 79mm, peso do corpo de 78.1g e peso do ovário de 2.9g, e 385 oócitos, no ovário de uma fêmea de CDM de 151mm, peso do corpo de 476,9g e peso do ovário de 18.2g. O valor de fecundidade média individual foi de 190,08 (desvio padrão de 72.08).

Verifica-se que a maior percentagem de fêmeas (16%) apresentou no ovário entre 100 a 109 oócitos. No entanto uma percentagem elevada de fêmeas (20.8%) apresenta maior número de oócitos (classes de 190 e 220).

4.8.2. Fecundidade por classes de CDM

Os valores de fecundidade média obtidos por classe de comprimento encontram-se compilados na tabela IV.

Tabela IV - Valores de fecundidade média obtidos por classe de comprimento

Classe de CDM (mm)	Nº de ovários amostrado	Nº médio de oócitos	Desvio padrão	Nº mínimo de oócitos	Nº máximo de oócitos
70	2	99	1,414	98	100
80	10	111	13,098	101	146
90	12	155	42,828	101	220
100	21	181	48,168	100	312
110	14	193	52,51	106	306
120	8	258	55,55	190	336
130	7	283	66,662	215	369
140	2	278	34,398	253	302
150	1	385	-	-	-

O número médio de oócitos por classe de comprimento variou entre 99 e 385, notando-se uma progressão do valor de fecundidade de acordo com a dimensão dos indivíduos.

4.8.3. Fecundidade mensal

Os valores de fecundidade mensal variaram entre 126 oócitos no mês de Setembro e 369 oócitos em Outubro. No entanto é de salientar que o valor de fecundidade obtido no mês de Outubro foi apenas resultado da contagem do número de oócitos num ovário. Os valores mais elevados de fecundidade foram obtidos em Julho de 1994 (valor médio de 247 oócitos) e Fevereiro de 1995 (valor médio de 202 oócitos). Os valores mais baixos foram obtidos em Setembro, Novembro e Dezembro de 1994 (<140 oócitos) (Figura 34).

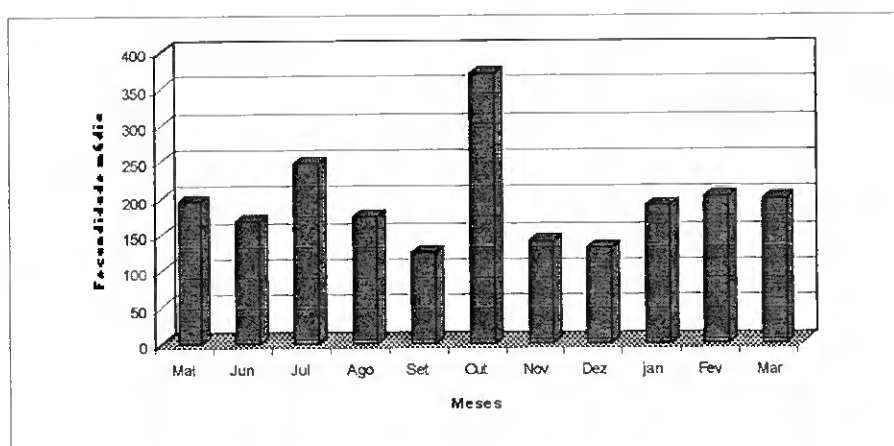


Fig 34 – Distribuição mensal dos valores médios de fecundidade

4.8.4. Regressões lineares entre a fecundidade e alguns parâmetros morfométricos

As regressões lineares fecundidade-CDM, fecundidade-peso do corpo e fecundidade-peso do ovário revelaram-se estatisticamente significativas ($p < 0.01$), verificando-se que a relação fecundidade-peso do ovário foi a que apresentou um coeficiente de correlação mais elevado ($r^2 = 0.8461$) (Figura 35).

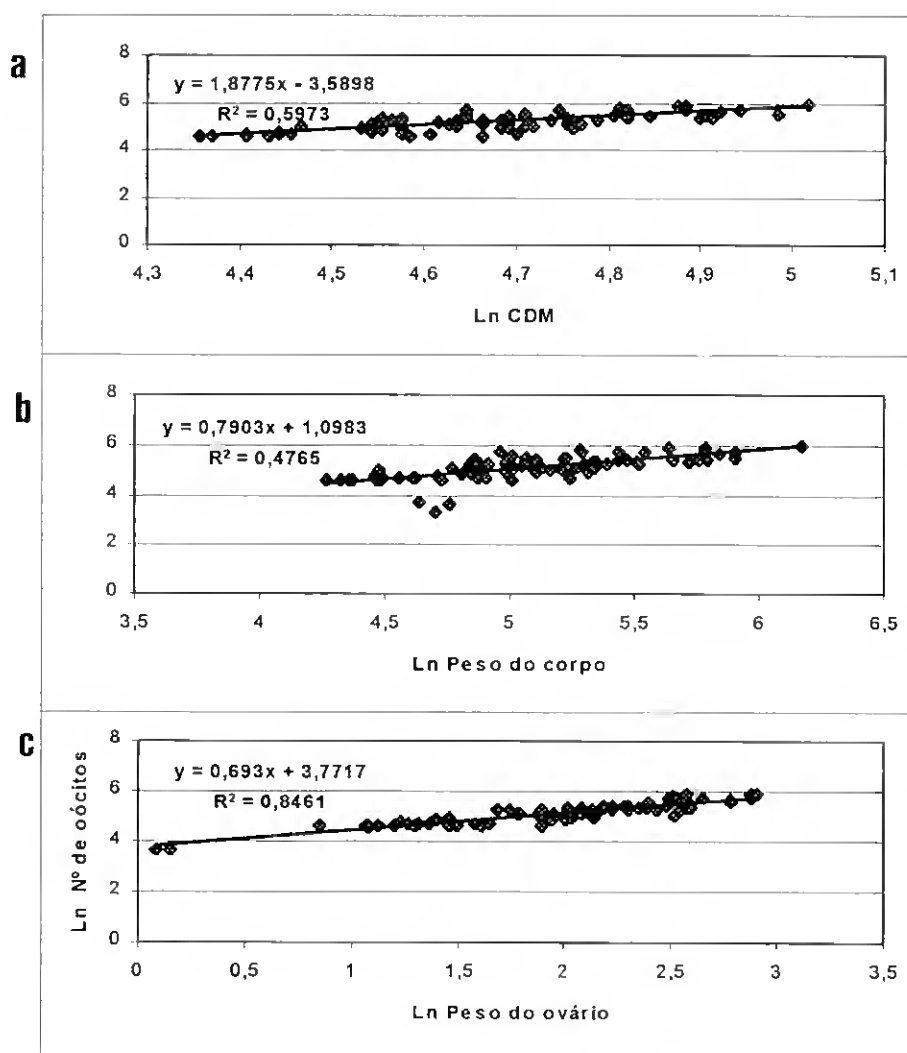


Fig. 35 – Regressão linear fecundidade-CDM (a), fecundidade-peso do corpo (b) e fecundidade-peso do ovário (c)

4.8.5. Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos e alguns parâmetros morfométricos

Das regressões lineares estabelecidas entre o diâmetro dos oócitos e alguns dos parâmetros morfométricos (CDM, peso do corpo e peso do ovário) a única que se revelou estatisticamente significativa ($p < 0.01$) foi a relação diâmetro dos oócitos-peso do ovário (Figura 36).

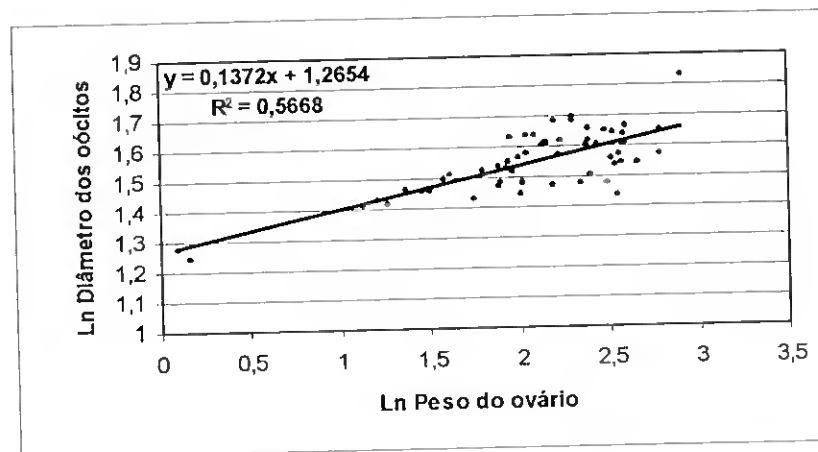


Fig. 36 – Regressão linear Diâmetro dos oócitos-peso do ovário

4.8.6. Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos hialinos e alguns parâmetros morfométricos

Das regressões lineares estabelecidas entre o diâmetro dos oócitos hialinos e alguns dos parâmetros morfométricos (CDM, peso do corpo e peso do ovário) a única que se revelou estatisticamente significativa ($p < 0.01$) foi a relação diâmetro dos oócitos hialinos-CDM. O coeficiente de correlação obtido foi de 0.3748 (Figura 37).

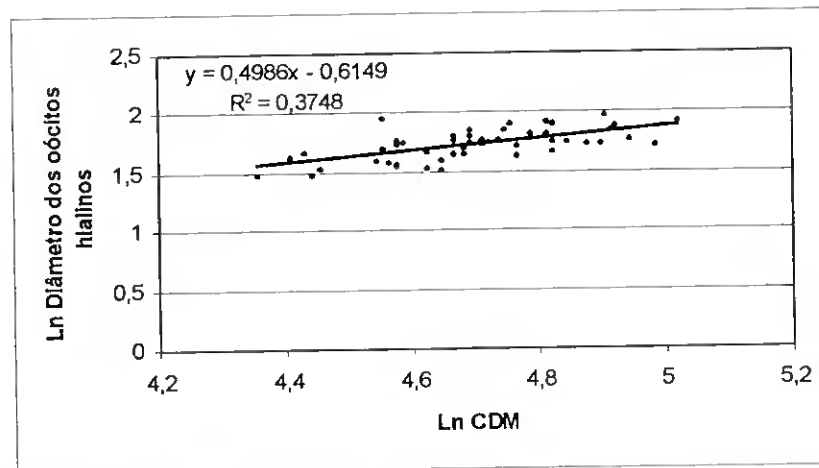


Fig. 37 – Regressão linear diâmetro dos oócitos hialinos-peso do ovário

4.8.7. Regressões lineares entre o diâmetro dos oócitos e a fecundidade

A relação linear estabelecida entre o diâmetro dos oócitos e a fecundidade apresentou um coeficiente de correlação de $r^2 = 0,3616$. Apesar do baixo valor do coeficiente de correlação a relação revelou-se estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 38). Relativamente à relação entre o diâmetro dos oócitos hialinos e a fecundidade verificou-se que a mesma não foi estatisticamente significativa, pelo que a referida relação não é aqui apresentada.

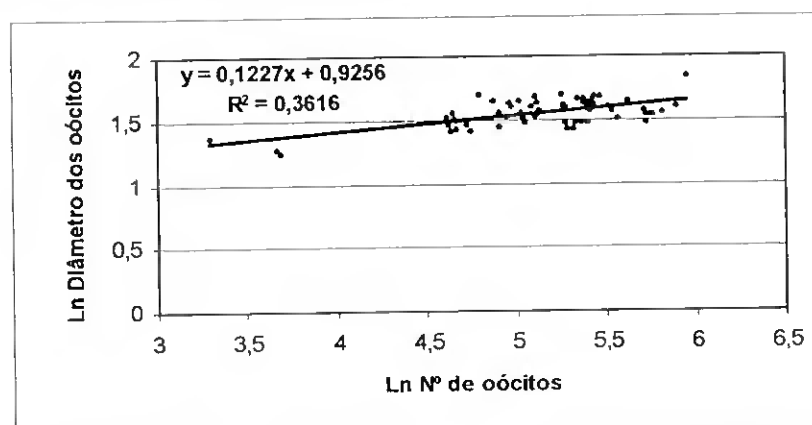


Fig. 38 – Regressão linear Diâmetro dos oócitos-fecundidade

Os parâmetros obtidos pelas respectivas regressões encontram-se nas tabelas IV a IX – Anexo II.

5. DISCUSSÃO

Os estudos da biologia das espécies semelpáticas são de extrema importância para o campo da biologia pesqueira. Neste âmbito, os aspectos relacionados com a reprodução destas espécies assumem particular importância por forma a garantir uma correcta gestão do recurso. A espécie *Sepia officinalis* constitui actualmente um dos recursos pesqueiros com elevado interesse económico na Ria Formosa, pelo que urge aprofundar os conhecimentos sobre a sua biologia reprodutiva.

Por forma a contribuir para um melhor conhecimento de alguns aspectos reprodutivos da espécie *Sepia officinalis* foi realizado um estudo com indivíduos capturados durante um ano na Ria Formosa. Foi confirmada a presença de indivíduos de ambos os sexos ao longo de todo o período de amostragem, tal como referido por Guerra & Castro (1988) na Ria de Vigo e por Martins (1990) na Ria Formosa.

Relativamente aos indivíduos de sexo indeterminado parece existir uma separação espacial entre os mesmos e os machos e fêmeas, em maturação e maturos, tal como foi observado na Ria de Vigo (Guerra & Castro, 1988). De facto, a maior frequência de indivíduos indeterminados observa-se em Julho e Agosto, quando se encontram menores frequências de indivíduos machos e fêmeas, em maturação e maturos. No entanto, tal como em Martins (1990) a variável tempo não foi considerada na análise, e dada a grande mobilidade da espécie, tal separação deve ser considerada com precaução.

Da análise da proporção dos sexos é possível observar que ao longo do período de amostragem a percentagem de machos foi ligeiramente superior à das fêmeas, no entanto a variação observada não difere significativamente da proporção

de 1:1, pelo que se considerou o número de machos igual ao das fêmeas. Esta proporção de sexos foi encontrada por outros autores em populações amostradas num período de dois anos (Ezzedine-Najai, 1984; Coelho & Martins, 1989).

Relativamente à relação peso-comprimento o valor de b foi em ambos os sexos superior à unidade ($b > 1$) pelo que o aumento de peso é mais rápido que o CDM. O valor do declive obtido foi ligeiramente superior nos machos em relação às fêmeas, o que indica que os machos aumentam de peso mais rapidamente do que as fêmeas.

Os valores do declive b obtidos neste trabalho para os machos e fêmeas são semelhantes aos valores apresentados por outros autores (Tabela V) para a mesma espécie.

Tabela V – Parâmetros da regressão Peso/CDM (a , b e r^2) em diversos estudos realizados com a espécie *Sepia officinalis*

População	Sexo	a	b	r^2	Referência
1325	M	0,00054	2,6908	0,994	Guerra & Castro, 1988
	F	0,00053	2,6978	0,9912	
260	M	0,0014	2,454	0,9884	Martins, 1990
	F	0,0004	2,7573	0,9886	
1613	M	0,0006	2,8637	0,9922	Este trabalho
	F	0,0004	2,7438	0,9945	

No entanto, verifica-se que os valores do declive b obtidos no presente estudo encontram-se ligeiramente acima dos obtidos pelos outros autores, o que poderá indicar que neste caso os indivíduos atingem pesos superiores para um mesmo CDM.

As regressões lineares peso do ovário-CDM e peso do ovário-peso do corpo apresentaram coeficientes de correlação estatisticamente significativos. Em ambos os casos o valor de b foi superior à unidade o que indica um aumento do peso do

ovário proporcionalmente mais rápido que o aumento do CDM e que o peso do corpo. Este fenómeno é particularmente acentuado no caso da relação peso do ovário-CDM, uma vez que o declive obtido foi superior ao obtido na relação peso do ovário-peso do corpo. Este facto sugere que o peso do ovário cresce de uma forma mais proporcional ao peso do corpo do que ao CDM, o que pode estar relacionado com o facto de ocorrerem fêmeas maduras para diferentes CDM (entre 70 e 200mm).

O CDM dos indivíduos capturados ao longo do período amostrado variou entre 10 e 240mm. No entanto este intervalo diminui bastante se se tiver em conta as classes de CDM com 2 ou mais indivíduos, obtendo-se assim o intervalo de classes entre 10 a 160mm. O maior CDM de 240mm correspondeu a um macho, verificando-se de um modo geral que, até à classe de 120mm, a frequência de machos por classes de comprimento é superior à das fêmeas para a mesma classe. No entanto a partir da classe 130mm o número de fêmeas é ligeiramente superior ao dos machos (17 e 13, respectivamente).

Resultados semelhantes foram encontrados por Coelho & Martins (1989) e Martins (1990) durante os anos de 1988/89, para esta espécie dentro da Ria Formosa, verificando-se a captura de indivíduos cujo CDM variou entre 15 e 156mm. Não foram contudo observados indivíduos, ainda que de uma forma pontual, de dimensões acima de 160mm como aconteceu no presente estudo.

Pela análise da distribuição de frequências por macroestado de maturação é possível constatar que os machos atingem os sucessivos diferentes macroestados para dimensões inferiores às fêmeas. Este facto poderá estar relacionado com o facto de os machos atingirem a maturação mais precocemente do que as fêmeas.

Nos estudos populacionais é usual determinar o tamanho de primeira maturação da população. No entanto, a maior parte dos cefalópodes e chocos só se reproduzem uma vez pelo que neste trabalho se designa este parâmetro por tamanho de maturação.

Assim, os resultados obtidos relativamente à percentagem de indivíduos maduros (macroestado IV) na Ria Formosa sugerem que os machos atingem o tamanho de maturação para CDM inferiores ao das fêmeas. Este padrão de maturação coincide com o observado por outros autores (Guerra & Castro, 1988; Coelho & Martins, 1989) segundo os quais o CDM de maturação dos machos varia entre 60 e 80mm e o das fêmeas é de 80mm.

Estes resultados estão de acordo com Boletzky (1983), segundo o qual a maturação sexual pode ser atingida em vários tamanhos, verificando-se de uma forma geral que os machos atingem a maturação precocemente, entre 60-80mm CDM. No entanto, segundo este autor é possível a existência de machos, de maiores dimensões (CDM superior a 100mm) ainda imaturos. Neste trabalho o macho imaturo de maiores dimensões mediu 73mm.

As fêmeas encontram-se sexualmente maduras para dimensões de 110mm (Mangold-Wirz, 1963; Boletzky, 1983). Este valor está um pouco acima dos resultados obtidos por outros autores (Ezzedine-Najai, 1984; Guerra & Castro, 1988; Coelho & Martins, 1989) e neste trabalho. Este facto pode ser explicável pela temperatura mais amena característica do Golfo de Tunes e das rias de Vigo e Formosa, que será responsável por uma maturação mais precoce.

Pela análise da evolução mensal dos macroestados de maturação é possível verificar que os indivíduos imaturos surgem na Ria Formosa no início do Verão (Junho-Julho). É provável que estes indivíduos evoluam para macroestados de maturação mais avançados, uma vez que a partir de Agosto já se observam indivíduos no macroestado II, mas devido ao grande número de indivíduos neste macroestado é possível que grande parte provenha de zonas mais profundas.

Verifica-se que a partir de Agosto e em especial no caso das fêmeas estas permanecem no estado de maturação II durante vários meses, o que sugere um atraso na maturação sexual das fêmeas. Contudo é provável que um pequeno número de indivíduos evolua para o macroestado III.

No caso dos indivíduos maduros parece não ocorrer uma evolução proveniente do macroestado III, pois se assim fosse seria de esperar a sua ocorrência na ria uns meses mais cedo do que realmente acontece. Este facto sugere a existência de um movimento migratório durante a Primavera, dos indivíduos maduros, de águas mais profundas onde os dias curtos do Inverno e de reduzida luminosidade induzem a maturação das gónadas para as águas pouco profundas da Ria Formosa para aí se reproduzirem e realizarem a desova.

Este padrão migratório tem sido observado em várias áreas geográficas, nomeadamente no Mar da Catalunha (Mangold-Wirz, 1963), Canal da Mancha (Richard, 1971), Ria de Vigo (Guerra & Castro, 1988) e na Ria Formosa (Coelho & Martins, 1989; Martins, 1990). Na Baía de Seine o desenvolvimento sexual ocorre apenas no segundo ano, sendo a época de postura mais curta (Boucaud-Camou *et al.*, 1991). Estas diferenças poderão estar relacionadas com a temperatura. Assim, nas regiões em que se verificam condições mais amenas, o crescimento é retardado, sendo o desenvolvimento sexual acelerado, o qual ocorre no primeiro ano do ciclo de vida e explica a chegada mais cedo dos indivíduos à zona litoral para aí realizarem a postura.

Tal como já foi referido é provável que os indivíduos no macroestado de maturação II tenham sofrido um atraso na maturação das suas gónadas, iniciando a época de reprodução no final do Inverno/início da Primavera. Este fenómeno pode resultar tal como referido em Martins (1990) do facto de os indivíduos jovens que ainda não tinham atingido tamanho mínimo para iniciarem o desenvolvimento sexual tenham sofrido o atraso na maturação devido à migração, tornando-se maduros apenas na migração seguinte de Inverno.

Contudo parece ocorrer um padrão de maturação diferente nos machos e nas fêmeas. Com efeito, se por um lado é possível que as fêmeas que se encontram no macroestado II possam ter sofrido um atraso na maturação, os machos ao contrário evoluem rapidamente para o macroestado de maturação III, pelo que parece ser evidente que o processo de maturação das gónadas dos machos é mais rápido

relativamente ao das fêmeas. Com efeito, Richard (1971) refere que a maturação dos testículos é um processo menos demorado do que a maturação dos ovários, pelo que, no meio natural, as fêmeas atingem a maturação sexual dois a cinco meses mais tarde que os machos.

Os dados obtidos em relação às dimensões dos indivíduos maduros parecem indicar que a população que permanece na Ria Formosa entre Abril e Julho de 1995 e a partir de Janeiro de 1996 tenha indivíduos cuja maturação sexual foi atingida em diferentes CDM. Assim, há uma mistura de indivíduos com diferentes graus de crescimento, pelo que é provável que os de menores dimensões tenham migrado de águas profundas, enquanto que os de maiores dimensões tenham amadurecido mais tarde e migrado para a costa posteriormente.

O período de postura estende-se provavelmente por todo o ano (Mangold-Wirz, 1963), existindo no entanto uma época, que varia consoante a área geográfica, em que a postura é mais intensa (Tabela VI). No presente estudo a época de postura parece decorrer ao longo de todo o ano, especialmente nas estações da Primavera e Verão, o que coincide com os resultados obtidos em locais de condições semelhantes às da Ria Formosa.

Tabela VI – Época de postura da espécie *Sepia officinalis* consoante a região estudada

Área geográfica	Período de postura	Referência
Canal da Mancha	Abril-Setembro	Richard, 1970
Mediterrâneo	Todo o ano (Março-Agosto)	Mangold-Wirz, 1963
Ria de Vigo	Todo o ano (Primavera-Verão)	Guerra & Castro, 1988
Ria Formosa	Todo o ano (Primavera-Verão)	Este trabalho

O índice gonadossomático individual variou entre 0.02 e 9.13%, tendo-se observado os valores superiores para CDM acima dos 90mm. Em Martins (1990) os

valores obtidos para este índice variaram entre 3 e 7,8%, diferenças estas que podem estar relacionadas com as diferentes metodologias utilizadas para o referido cálculo. Os resultados obtidos são inferiores aos valores de IGS propostos por Boletzky (1983), segundo o qual, nas fêmeas maduras os órgãos reprodutores representam até 16% do peso do corpo. No entanto, este facto é facilmente explicável, uma vez que este autor utiliza o peso das glândulas anexas no cálculo deste índice.

Os valores médios mensais do índice gonadossomático variaram entre 0.37 em Dezembro de 1995 e 7.62 em Julho do mesmo ano, verificando-se que os valores mais baixos ocorreram no Outono-Inverno e os valores mais elevados na Primavera-Verão.

Deste modo é possível a ocorrência de diferentes estados de evolução sexual ao longo do período de amostragem:

- de Abril a Junho os valores de IGS são elevados, o que deverá corresponder ao período de maturação sexual;
- em Julho é atingido o máximo de IGS, pelo neste mês os indivíduos deverão encontrar-se na fase de pré-desova;
- em Agosto e Setembro regista-se uma diminuição progressiva do IGS pelo que este período corresponderá à desova;
- de Setembro a Dezembro os valores de IGS são os mais baixos de todo o período o que sugere a fase de repouso sexual.
- de Janeiro a Março os valores de IGS aumentam progressivamente, o que é característico de novo período de maturação sexual.

A variação do IGS e a sua possível relação com os estados de evolução sexual aqui apresentados são coincidentes aos resultados obtidos por Ezzedine-Najai (1984) num estudo realizado durante dois anos com a espécie *Sepia officinalis* no Golfe de Tunes.

O estudo da oogénese da espécie *Sepia officinalis* é, de uma forma geral, dividido em seis estados histológicos (Richard, 1971; Richard & Dhainaut, 1973; Dhainaut & Richard, 1976; Koueta *et al.*, 1993), dos quais apenas quatro foram identificados neste trabalho.

Não foram analisadas gónadas de indivíduos imaturos ou estado de maturação incipiente, pelo que o primeiro estado histológico identificado neste trabalho coincide com o estado histológico II da bibliografia consultada. É característico dos indivíduos cuja dimensão varia entre 20 a 40 mm. Nesta fase as células foliculares misturam-se com as germinais (Dhainaut & Richard, 1976). As características referidas neste trabalho coincidem com as apresentadas por Richard (1971). Este autor refere também as pequenas dimensões dos oócitos, bem como a presença de um nucléolo no núcleo que segundo este autor acaba por desaparecer no decorrer desta fase. Este fenómeno é também referido no estado histológico 3 de Coelho (1990) para a espécie *Illex illecebrosus*.

O estado histológico seguinte diz respeito à fase da pré-vitelogénese, sendo dividido por vários autores em dois estados (IIIa e IIIb) (Richard & Dhainaut, 1973; Dhainaut & Richard, 1976) pelo que neste trabalho, por forma a facilitar a comparação da oogénese optou-se por utilizar a mesma divisão.

A descrição do estado IIIa aqui efectuada corresponde à de Richard & Dhainaut (1973), Dhainaut & Richard (1976) e Koueta *et al.* (1993) para a espécie *Sepia officinalis*. Dá-se o início da pré-vitelogénese (Koueta *et al.*, 1993), em que os oócitos de forma esférica encontram-se rodeados por um envelope contínuo de células foliculares (Richard & Dhainaut, 1973; Koueta *et al.*, 1993). Este estado é semelhante ao estado histológico 4 descrito por Coelho, (1990) para a espécie *Illex illecebrosus*, ao estado 2 observado por Sauer & Lipinski (1990) e Lopes (1995) para as subespécies *Loligo vulgaris reynaudii* e *L. vulgaris vulgaris*, respectivamente.

Em IIIb as células encontram-se no estado de pré-vitelogénese (Koueta *et al.*, 1993). As células foliculares dispõem-se em duas camadas formando cordões

foliculares que migram para o interior do oócito, o que confere ao oócito um aspecto estriado. Este fenómeno é característico do processo de oogénese dos cefalópodes (Dhainaut & Richard, 1976), sendo particularmente evidente para a espécie *Sepia officinalis*, em virtude da produção de ovos muito volumosos (diâmetro de 1.2 a 1,4cm) (Koueta *et al.*, 1993). A migração das células foliculares para o interior do oócito está na origem do deslocamento do núcleo para o pólo animal (Coelho, 1990; Sauer & Lipinski, 1990).

Em algumas espécies de cefalópodes assiste-se à formação do *sincitium* que consiste no desaparecimento das membranas laterais das células foliculares para originar uma camada contínua destas células polinucleadas com numerosos nucléolos proeminentes. Este fenómeno foi observado por Sauer & Lipinski (1990) para a subespécie *Loligo vulgaris reynaudii*, por Lum-Kong (1993) para a espécie *Loligo forbesi*, por Lopes (1995) para *Loligo vulgaris*. Contudo na espécie *Octopus vulgaris* as células foliculares permanecem separadas não formando assim o *sincitium* (Buckley, 1979 *in* Mangold, 1987). No presente estudo, pela observação pormenorizada dos cordões foliculares, parece ocorrer a formação do *sincitium*. Este fenómeno foi, no caso da espécie *Sepia officinalis*, descrito pela primeira vez num estudo realizado por Koueta *et al.* (1993), no qual foi observado que no decorrer da vitelogénese as células foliculares formaram o *sincitium*.

No estado histológico IV os cordões foliculares parecem atingir o máximo do seu desenvolvimento, ocupando assim grande parte do citoplasma. Este fenómeno é confirmado por Richard & Dhainaut (1973) que sugerem uma ocupação dos cordões foliculares de 7/10 relativamente à área do citoplasma. O citoplasma encontra-se repleto de grânulos de vitelo que segundo Dhainaut & Richard (1976) serão constituídos por proteínas e polissacarídeos. É o final da vitelogénese.

Nos cefalópodes os estudos relacionados com o processo de síntese do vitelo parecem indicar a participação das células foliculares neste processo. A vitelogénese foi investigada por Selman & Arnold (1977) e por Selman & Wallace (1978) na espécie *L. pealei*. Estes autores referem que o vitelo pode ser produzido

pelo próprio oócito (autossíntese), por células exteriores ao oócito (heterossíntese) ou pela combinação dos dois processos. Ramirez & Guajardo (1980 *in* Lopes, 1995) em estudos realizados com a espécie *L. pealei* apoiam a hipótese da heterossíntese. Um argumento a favor desta hipótese, no caso da espécie *Sepia officinalis*, é o facto de durante a pré-vitelogénese e vitelogénese o oócito encontrar-se bloqueado na prófase da primeira divisão da meiose, pelo que apenas as células foliculares sofrem um processo de divisão intensa (Richard, 1971; Richard & Dhainaut, 1973; Dhainaut & Richard, 1976; Medhioub, 1986; Koueta *et al.*, 1993).

No estado histológico V observa-se a regressão dos cordões foliculares. Este facto deve-se à acumulação do vitelo no citoplasma que conduz assim ao recuo progressivo dos cordões foliculares. As células foliculares elaboram o *corion*, após o que degeneram. A estrutura do oócito maturo nesta espécie é comparável à descrita por Arnold (1971) para a espécie *Loligo pealei*, caracterizando-se pela existência de uma camada fina de citoplasma, entre o *corion* e o vitelo, que contorna todo o oócito. Durante o decorrer deste estado o oócito acaba por romper o epitélio do ovário.

No estado histológico VI a meiose reinicia-se e dá-se a emissão dos glóbulos polares. Este processo é induzido pela penetração do esperma no micrópilo (Hoadley, 1930 *in* Dhainaut & Richard, 1976; Arnold, 1971), libertando-se o primeiro glóbulo polar 20 a 30 minutos após a fertilização e o segundo cerca de uma hora depois (Arnold, 1971).

No que se refere à espermatogénese a descrição efectuada neste trabalho baseou-se em larga medida na bibliografia consultada, uma vez que os sucessivos estados celulares apresentam reduzidas dimensões. Este facto dificulta a caracterização dos mesmos, permitindo apenas a sua identificação.

Assim e tal como referido por Lopes (1995) a descrição da espermatogénese é de um modo geral mais pobre em características comparativamente à descrição da oogénese. Este facto é devido à própria natureza do processo, que não envolve tão

pronunciada diferenciação de estruturas, para além da diferenciação da cauda nos espermatozóides.

No entanto foi possível constatar tal como referido por Richard (1971) que a evolução citológica do testículo é clássica. A diferenciação celular é centrípeta e contínua podendo-se observar nas gónadas maduras de um indivíduo adulto todos os estados de evolução celular. Este fenómeno foi observado por Schuldt (1979) para a espécie *Illex argentinus*, por Coelho (1990) para a espécie *Illex illecebrosus*, por Lopes (1995) para *Loligo vulgaris* e por Sauer & Lipinski (1990) para a subespécie *Loligo vulgaris reynaudii*.

Relativamente aos diâmetros oocitários medidos em cada microestado observou-se uma grande sobreposição de intervalos, razão pela qual, a medição dos diâmetros oocitários não pode constituir um critério suficiente na separação dos diferentes estados histológicos, sendo este mais eficaz quando é baseado na descrição morfológica dos diferentes estados histológicos.

No entanto, apesar da elevada sobreposição dos diâmetros oocitários entre os microestados sucessivos, os resultados do teste *t-student* indicaram que os cinco estados histológicos identificados neste trabalho apresentaram diâmetros oocitários médios significativamente diferentes.

Na tabela VII são confrontados intervalos de diâmetros oocitários para cada estado histológico da oogénese de algumas espécies de Loliginídeos e Omastreífídeos.

Tabela VII – Diâmetros oocitários médios obtidos por microestado de maturação em várias espécies de cefalópodes

Espécie	Estados histológicos								Referência
	-2	-1	1	2	3	4	5	6	
<i>Loligo vulgaris</i>	-	-	30-390	40-500	50-1100	320-1740	430-2370	820-2190	Lopes, 1994
<i>Loligo pealei</i>	-	-	50-100	100-200	200-800	800-1500	800-1500	800-1500	Ramirez & Guajardo, 1980
<i>Alloteuthis subulata</i>	-	-	100	100	250-700	250-700	até 1300	até 1300	Botike, 1974
<i>Illex illecebrosus</i>	9-30	20-90	90-160	180-210	200-260	270-340	320-500	400-700	Coelho, 1990
<i>Illex argentinus</i>	9-11	12-18	90	90	280	400	-	900	Schuldt, 1979
<i>Sepia officinalis</i>	-	-	*	60-120	3a) 40-900 3b) 90-2400	300-4900	1100-5100	*	Este trabalho

* não foram observadas gónadas de indivíduos imaturos e em estado posterior à fertilização

Da comparação dos diâmetros oocitários entre os Loliginídeos e Omastrefídeos constata-se que o grupo de Omastrefídeos apresenta oócitos de menores dimensões. Este facto parece estar relacionado com a fecundidade, uma vez que esta é geralmente mais elevada neste grupo de cefalópodes (Mangold, 1987), provavelmente porque a energia reprodutiva é desviada para o aumento do número de ovos em prejuízo das suas dimensões (Coelho, 1986; Santos, 1993).

Relativamente à espécie *Sepia officinalis* verifica-se que os diâmetros oocitários são de grandes dimensões comparativamente às outras espécies de cefalópodes analisadas. Este facto apoia o que foi anteriormente referido, pois segundo os dados disponíveis os valores de fecundidade nesta espécie são muito baixos.

Em relação à análise de distribuição de frequências dos diâmetros oocitários nos diferentes macroestados de maturação, considerou-se que o ajustamento do método de Bhattacharya foi qualitativamente satisfatório. Os coeficientes de separação apresentaram valores superiores a 2, o que é indicativo da presença de grupos individualizados na distribuição de frequências.

Verifica-se que o número de componentes modais identificados (8) é superior ao número de microestados (5) e que o confronto dos valores médios das componentes modais (Tabela I – Anexo IV) com a amplitude dos diâmetros oocitários (Tabela I – Anexo V) permite estabelecer uma correspondência próxima da realidade. Deste modo, por exemplo, a componente 1, que abrange diâmetros oocitários médios dos 175,78 μm a 215,63 μm é constituída por oócitos nos microestados II e IIIa. A componente 2, que abrange diâmetros oocitários entre 598,11 μm e 681,70 μm é constituída por oócitos nos estados IIIa e IIIb. A componente 3 é constituída por oócitos nos estados IIIb e IV. As componentes 4, 5 e 6 contêm oócitos nos estados IIIb, IV e V. As componentes 7 e 8 são constituídos por oócitos nos estados IV e V. Assim verifica-se que no macroestado IV e de acordo com as oito componentes modais observam-se todos os estados histológicos.

O facto de não ocorrer o desaparecimento dos estados celulares mais atrasados no macroestado de maturação IV vem apoiar a ideia de que nesta espécie a postura é do tipo intermitente tal como já tinha sido referido por Boletzky (1983, 1987).

Este facto sugere ainda que o processo de ovulação é parcial, o que possibilita a produção continua de ovos a partir do momento em que a postura se inicia. Deste modo, a libertação dos ovos ocorre em grupos separados durante um período relativamente longo, durante o qual não ocorre crescimento somático (Rocha *et al.*, 1994).

Com efeito Boletzky (1987) observou, em cativeiro, a postura de uma fêmea pertencente à espécie *Sepia officinalis*, tendo constatado que a mesma foi realizada em intervalos irregulares durante 4 meses, e que em cada postura o número de ovos era variável.

Os dados sobre fecundidade nos cefalópodes são escassos (Boyle, 1990), sendo as suas estimativas problemáticas devido à insuficiência de conhecimentos acerca do processo de desova. Segundo Mangold (1987), a pouca consistência nos

métodos de estimação é um factor responsável pela existência na maioria das espécies de uma grande variação nos valores de fecundidade obtidos.

Nestes estudos é particularmente importante saber se a espécie em causa efectua a postura de uma única vez ou se pelo contrário essa postura é efectuada de uma forma intermitente.

A presença de oócitos de vários tamanhos e em diferentes estados de desenvolvimento, tal como acontece no presente estudo, pode indicar um período de desova prolongado, durante o qual pode ocorrer a produção de novos ovos e o desenvolvimento de outros. Neste caso o método de determinação da fecundidade apresenta alguma limitação, podendo resultar numa subestimação dos valores obtidos, pois no momento de determinação do número de oócitos não é possível conhecer o número de oócitos imaturos ou em maturação que poderiam ainda atingir a maturação no decorrer da desova (Mangold, 1987).

Com efeito Boletzky (1987) analisou o ovário de uma fêmea, da espécie *Sepia officinalis*, cuja desova ocorreu em cativeiro e após a morte do indivíduo verificou que, apesar da inexistência de oócitos maduros, ocorriam oócitos em maturação (cerca de 1000). Estes resultados levantam a hipótese de que uma maior sobrevivência deste animal poderia ter conduzido à maturação completa dos restantes oócitos presentes no ovário.

Deste modo, parece óbvio que o número de ovos colocado por uma fêmea na natureza está dependente da sua sobrevivência durante o período de desova. A disponibilidade de alimento de boa qualidade, bem como a ausência de predadores podem constituir factores determinantes na duração do período de desova, uma vez que podem condicionar uma menor exaustão do animal.

A fecundidade pode variar bastante entre os vários grupos de espécies de cefalópodes (Voss, 1983; Coelho, 1985; Mangold, 1987), encontrando-se na literatura valores entre 25 e 6.000.000 oócitos (Voss, 1983) (Tabela VIII).

Tabela VIII – Valores de fecundidade para diversas espécies de cefalópodes

Grupo	Espécie	Nº Ovos	Dim. Ovos (mm)	Referência
Loliginidae	<i>Doryteuthis plei</i>	14.310	-	Roper, 1965
	<i>Loligo vulgaris</i>	1441 - 14886	2.1	Villa, 1993
		-	2.2	Naef, 1928
		-	2.3 - 2.5	Mangold-Wirz, 1963
		-	2.0 - 2.2	Boletzky, 1987
	<i>Loligo opalescens</i>	14.000	2.0 - 2.5	Fields, 1965
	<i>Loligo forbesi</i>	-	3.3	Naef, 1928
		-	3.0 - 3.4	Boletzky, 1987
		-	3.0 - 3.1	Segawa <i>et al</i> , 1988
		6000 - 32000	3.4	Santos, 1993
	<i>Loligo pealei</i>	950 - 8500	-	Haefner, 1959
		21135 - 55308	-	Hixon, 1980
		3500 - 6000	-	Summers, 1971
		-	1.5	Coelho, 1985
<i>Lolliguncula brevis</i>	1600 - 6350	-	Haefner, 1959	
	1400 - 6360	-	Hixon, 1980	
Ommastrephidae	<i>Dosidicus gigas</i>	100.000-650.000	-	Nesis, 1970
	<i>Illex illecebrosus</i>	420.000	0.2 - 0.9	Durward <i>et al</i> , 1979
		13470 - 71458	0.4 - 0.91	Coelho <i>et al</i> , 1982
		100.000	-	Roper <i>et al</i> , 1984
	<i>Illex coindetii</i>	200.000	-	Boletzky <i>et al</i> , 1973
		-	0.3	Coelho, 1985
	<i>Ommastrephes pteropus</i>	52.618-186.461	-	Hixon <i>et al</i> , 1981
	<i>Ommastrephes caroli</i>	360.000	-	Clarke, 1966
<i>Todarodes pacificus</i>	70.000	-	Lim, 1967	
	320000 - 470000	-	Soeda, 1956	
Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	99-543	6-10	Najai, 1985
		250-500	-	Mangold-Wirz, 1963
		150-500	-	Richard, 1971
		150-500	4.5 - 9	Boletzky, 1983
		600	-	Boletzky, 1987
		500-1000	-	Mangold, 1987
		98-385	-	Neste trabalho
	<i>Rossia macrosoma</i>	cerca de 40	-	Mangold-Wirz, 1963
<i>Idiosepius pygmaeus</i>	25-64	-	Natsukari, 1970	

Estes números dependem principalmente do tamanho dos ovos, verificando-se que todas as espécies que produzem um número elevado de ovos (superior a

5000) apresentam ovos pequenos (diâmetro inferior a 3mm). Como regra geral, quanto maior o número de ovos produzido mais pequenos eles são (Voss, 1983).

As espécies oceânicas parecem possuir ovos numerosos e mais pequenos quando comparados com as espécies neríticas, as quais possuem menor número de ovos, mas de maiores dimensões. Esta condição geral pode reflectir selecção devido à baixa sobrevivência dos ovos e estados juvenis das espécies oceânicas (Coelho, 1985).

Em adicção, os dados de fecundidade disponíveis indicam que as espécies cuja postura é realizada nas zonas costeiras, encapsulando os ovos e fixando-os ao substrato, produzem um menor número de ovos e de maior tamanho do que aquelas que depositam os ovos livremente na água, onde as condições são mais instáveis.

Relativamente à espécie *Sepia officinalis*, os resultados de fecundidade obtidos são semelhantes aos valores propostos por outros autores (Mangold-Wirz, 1963; Richard, 1971; Boletzky, 1983), tendo variado entre 98 e 385 oócitos (Tabela VIII).

Relativamente aos valores de fecundidade propostos por Mangold (1987) e que podem variar entre 500 e 1000 oócitos, verifica-se que estes são mais elevados do que os obtidos neste estudo. No entanto, esta diferença pode ser facilmente explicável pela diferença de metodologia aplicada na determinação da fecundidade e que consistiu em Mangold (1987) na contagem de ovos imaturos, em maturação e maturos.

A espécie *Sepia officinalis* deposita ovos cujas dimensões variam entre 8 a 10mm, pelo que os números baixos de fecundidade encontrados estão de acordo com a relação número/dimensão referida anteriormente.

Deste modo e uma vez que a espécie *Sepia officinalis* deposita os seus ovos junto ao litoral é de admitir que o reduzido número de ovos produzido poderá estar relacionado com a ocorrência de maior sobrevivência das fases juvenis nestes

locais, em detrimento das espécies cujos valores elevados de fecundidade poderá ser uma forma de contrabalançar a maior mortalidade das fases juvenis.

Com base na fecundidade média obtida por classe de comprimento das fêmeas é possível constatar que a fecundidade parece estar relacionada com a dimensão da fêmea, tal como sugerido por outros autores (Ezzedine-Najai, 1985; Boletzky, 1983; Mangold, 1987). É ainda de referir que estes valores são muito semelhantes aos obtidos por Ezzedine-Najai (1985) num estudo realizado no Golfe de Tunes com a espécie *Sepia officinalis* (Tabela IX).

Tabela IX – Comparação de valores de fecundidade média obtidos por diferentes autores

Classe de CDM (mm)	Fecundidade média	
	Najai, 1982	Este trabalho
70	-	99
80	99	111
90	163	124
100	181	181
112	228	193
120	235	254
130	230	283
140	195	277
150	383	395
160	345	-
170	365	-
180	420	-
190	543	-

A relação entre a fecundidade e a dimensão dos indivíduos será ainda abordado no decorrer deste trabalho.

Relativamente aos valores de fecundidade média mensal é possível constatar que o valor máximo é atingido no mês de Julho de 1995, precedido por valores elevados nos meses de Maio e Junho de 1995. Este fenómeno sugere que em Julho os indivíduos estariam na fase de pré-desova e nos dois meses anteriores em maturação sexual. Em Agosto e Setembro verifica-se uma diminuição dos valores de fecundidade, o que poderá indicar o período de desova. De Setembro a Dezembro (com excepção de Outubro) os valores de fecundidade obtidos são os mais baixos

de todo o período de amostragem, o que sugere a ocorrência de um período de repouso sexual. Os resultados obtidos no mês de Outubro não são aqui discutidos, uma vez que se basearam apenas em um indivíduo, o que poderá não traduzir a realidade da população. De Janeiro a Março de 1996 verifica-se novo aumento nos valores de fecundidade, o que poderá ser representativo de um novo período de maturação sexual. Esta análise vem apoiar a evolução sexual estabelecida para o período de amostragem através da análise do IGS.

Com base no que foi anteriormente referido, facilmente se conclui que os ovários utilizados na determinação da fecundidade pertenciam a indivíduos que provavelmente já teriam iniciado a postura. Esta possibilidade aumenta se se tiver em conta que alguns dos oócitos observados encontravam-se no estado histológico V. Deste modo, mais uma vez se assiste a uma possível subestimação dos resultados obtidos.

Com efeito, Boletzky (1987) refere que os resultados de fecundidade, obtidos em fêmeas capturadas na natureza, não revelam se os indivíduos já teriam iniciado a postura no período que antecede a captura dos mesmos.

A relação entre a fecundidade e o CDM está ainda por esclarecer. Estudos efectuados por diversos autores (Fields, 1965; Vovk, 1972; Bakhayoko, 1983; Calow, 1983; Boletzky, 1985; Ezzedine-Najai, 1985; Howard *et al.*, 1987; Mangold, 1987; Santos, 1993) para diferentes espécies de cefalópodes indicam que o número de ovos produzido por uma fêmea é dependente da dimensão do seu corpo. No entanto esta relação não é clara no caso de indivíduos de grandes dimensões (Boyle, 1990).

No presente trabalho das relações estabelecidas entre as características morfométricas e a fecundidade, verificou-se a existência de uma correlação positiva entre os valores de fecundidade obtidos e a dimensão dos indivíduos amostrados. Este resultado vem apoiar o que foi anteriormente referido neste trabalho e por outros autores relativamente a esta relação.

No entanto, a relação entre a fecundidade e o peso do ovário está melhor correlacionada, o que sugere a importância do desenvolvimento desta porção da gónada em todo o processo de reprodução.

Das relações estabelecidas entre o diâmetros dos oócitos hialinos e outros parâmetros (peso do ovário, fecundidade e CDM), a única que se revelou estatisticamente significativa, diz respeito ao CDM. Uma vez que o tamanho do animal no momento da eclosão depende da dimensão do ovo (Boletzky, 1983; Guerra, 1987), é possível que dependa também da dimensão da progenitora.

No que diz respeito à relação diâmetro dos oócitos-peso do ovário verifica-se que estas duas variáveis se correlacionam positivamente, pelo que parece evidente que o desenvolvimento do ovário está mais dependente do desenvolvimento dos oócitos em vitelogénese do que dos oócitos hialinos. Este facto pode estar relacionado com o número de oócitos em vitelogénese e hialinos presentes no ovário. Com efeito observou-se que os oócitos hialinos apesar das suas maiores dimensões eram pouco numerosos relativamente aos oócitos em vitelogénese de menores dimensões mas mais abundantes.

De salientar ainda que apesar do baixo coeficiente de correlação constatou-se que o diâmetro dos oócitos se relaciona de forma positiva com a fecundidade. No entanto, esta relação deverá ser aceite com alguma precaução, uma vez que se observa alguma dispersão de valores.

A relação diâmetro dos oócitos-CDM não foi considerada estatisticamente significativa, pelo que não é apresentada neste trabalho. No entanto é de salientar que Boletzky (1983, 1987) refere que o comprimento dos oócitos é independente do tamanho das progenitoras.

6. CONCLUSÕES

- Da população amostrada na ria Formosa no período entre Abril de 1995 e Março de 1996 verificou-se que os machos e as fêmeas se distribuíram por todo o período de amostragem com relativa abundância. Os indivíduos de sexo indeterminado surgem com maior frequência nos meses de Julho e Agosto de 1995.
- A variação da proporção de sexos não diferiu significativamente da proporção 1:1, pelo que se considerou o número de machos igual ao das fêmeas.
- Através das relações peso-comprimento foi possível obter a equação $P = 0.0006CDM^{2.8637}$ para os machos e $P = 0.0004CDM^{2.7438}$ para as fêmeas.
- As regressões lineares peso do ovário-CDM e peso do ovário-peso do corpo revelaram-se estatisticamente significativas, com coeficientes de correlação de 0.7882 e 0.7989, respectivamente.
- Dos indivíduos amostrados, os machos atingiram maiores dimensões (240mm) relativamente às fêmeas (200mm).
- Os tamanhos de maturação obtidos nos machos e fêmeas foram, respectivamente, de 66.59 e 80.17mm, pelo que é possível que os machos atinjam a maturação mais precocemente do que as fêmeas.
- A análise da evolução mensal dos macroestados de maturação sugere um padrão migratório, no qual ocorre uma migração dos indivíduos maduros para a ria durante a Primavera para aí se reproduzirem e efectuarem a postura, e uma migração no início do Inverno para águas mais profundas onde decorrerá a maturação das gónadas.

- Em virtude de se terem capturado indivíduos maduros ao longo de todo o período de amostragem sugere-se a ocorrência de um período de desova ao longo de todo o ano. No entanto, verifica-se a ocorrência de um maior número de indivíduos maduros durante a Primavera e Verão, pelo que será provável que a desova ocorra principalmente neste período.
- Os valores médios mensais do índice gonadossomático (IGS) sugerem a existência de uma evolução sexual nos indivíduos, ao longo do período de amostragem, que deverá passar pelas seguintes fases: maturação sexual, pré-desova, desova, repouso sexual e novo período de maturação sexual.
- Foram reconhecidos quatro estados histológicos durante a oogénese da espécie *S. officinalis*, com base na morfologia dos oócitos e do folículo, facto que foi reforçado pelas diferenças significativas entre as médias dos diâmetros oocitários, em cada um desses quatro estados histológicos. Não foram contudo observados oócitos de indivíduos imaturos e de indivíduos em que já tivesse ocorrido a fertilização, pelo que é de considerar a existência dos seis estados histológicos referidos na bibliografia para esta espécie.
- Com base na distribuição de frequências dos diâmetros oocitários por macroestado de maturação e na análise morfológica dos oócitos, verificou-se que não ocorre o desaparecimento de estados celulares mais atrasados no macroestado de maturação IV. Este facto sugere que a postura ocorre de uma forma intermitente.
- A observação dos ovários dos indivíduos no macroestado de maturação IV permitiu constatar a presença de oócitos de vários tamanhos e em diferentes estados de desenvolvimento, o que vem apoiar a ideia de que o período de desova pode ser prolongado.
- Os valores de fecundidade individuais variaram entre 98 e 385. No entanto é provável que estes valores estejam sub-estimados, uma vez que no momento em

que se determinou a fecundidade não foi possível conhecer o número de oócitos imaturos ou em maturação que poderiam ainda atingir a maturação.

- Assim, por forma a testar os valores de fecundidade obtidos neste trabalho sugere-se a realização de estudos de posturas (na natureza e em cativeiro), bem como do estado de repleção das gónadas no final das mesmas. Em princípio, esse momento será coincidente com o final da vida das fêmeas, daí a importância de recolher fêmeas acabadas de morrer.
- Com base nos resultados de fecundidade média obtidos por classe de comprimento é possível constatar que a fecundidade parece estar relacionada com a dimensão das fêmeas.
- A análise dos valores de fecundidade média mensal sugerem a existência de uma evolução sexual ao longo do período de amostragem coincidente com a evolução referida anteriormente para o índice gonadossomático.
- A regressão linear fecundidade-peso do ovário foi estatisticamente significativa, apresentando-se estes dois parâmetros bem correlacionados ($r^2 = 0.8461$). Obteve-se a seguinte equação da recta $Fec = 1.8776CDM - 3.5898$.
- O diâmetro dos oócitos parece estar correlacionado com o peso do ovário e com a fecundidade, apesar dos valores de r^2 serem baixos (0.5668 e 0.3616, respectivamente).
- A relação entre o diâmetro dos oócitos hialinos e o CDM dos indivíduos parece também correlacionar-se positivamente apesar do valor baixo de r^2 (0.3748).
- No que diz respeito à utilização da parafina como meio de montagem histológica, verifica-se que esta é pouco adequada para os ovários em estados de maturação avançada devido à grande dimensão dos oócitos, pelo que sugere-se a aplicação de uma outra técnica, como por exemplo a resina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Allende, J.M. & A. Guerra, 1984. Crustáceos decápodos y molluscos de la ría de Vigo (mimeo). Presentado a los premios de investigación 1984, Excm. Diputación de Pontevedra, 152p.

Arkhipkin, A.I., 1988. Types of development and sexual system functioning of cephalopods – approach to creation of general scale for maturity stages. *NAFO SCR Doc.*, Nº 1556, 30p.

Arnold, J.M., 1971. Cephalopods. In: *Experimentale embryology of marine and fresh water invertebrates*, edited by G. Reverberi, *North Holland Pub. Co.*, Chap. 10, 265-311.

Arnold, J.M. & L.D. Williams-Arnold, 1977. Cephalopoda: Decapoda. In: *Reproduction of marine invertebrates*, edited by A.C. Giese & J.S. Pearse, Academic Press, New York, Vol. IV: 243-290.

Badenhorst, J.H., 1973. The morphology and histology of the male genital system of the squid *Loligo reynaudii* (d'Orbigny). *Annale Univ. Stellenbosch*, Ser. A 49(1), 36p.

Bakhayokho, M., 1983. Biology of the cuttlefish *Sepia officinalis hierreda* off the senegalese coast. In: *Advances in assessment of world cephalopod resources*, edited by J.F. Caddy, *FAO Fish. Tech. Pap.*, 231: 204-263.

Bernard, D.R., 1981. Multivariate analysis as a means of comparing growth in fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 233-236.

Boletzky, S.v., 1975. The reproductive cycle os sepiolidae (Mollusca, Cephalopoda). *Pubbl. Stz. Zool. Napoli*, Vol. 39 Suppl, 84-95.

Boletzky, S.v., 1979. Growth and life-span of *Sepia officinalis* under Artificial Conditions (Mollusca: Cephalopoda). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, Vol. 25/26 (10): 159-168

Boletzky, S.v., 1983. *Sepia officinalis*. In: *Cephalopod Life Cycles*, edited by P.R. Boyle, Academic Press, London, Vol. 1, Species Accounts, 253-275.

Boletzky, S.v., 1987. Fecundity variation in relation to intermittent or chronic spawning in the cuttlefish, *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). *Bull. Mar. Sci.*, 40: 382-387.

Boletzky, S.v., 1988. A new record of long-continued spawning in *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.* Vol. 31(2), 257p.

Boletzky, S.v., L. Rowe & L. Aroles, 1973. Spawning and development of the eggs in the laboratory of *Illex coindetti* (Mollusca: Cephalopoda). *Veliger*, 15: 257-258.

Boletzky, S.v. & R.T. Hanlon, 1983. A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoire of the National Museum Victoria*, Vol. 44: 147-187.

Bottke, W., 1974. The fine structure of the ovarian follicle of *Alloteuthis subulata* Lam. (Mollusca, Cephalopoda). *Cell Tiss. Res.* 150: 463-479.

Boucaud-Camou, E., 1990. La seiche, un animal d'avenir. *La Peche Maritime*, 321-329.

- Boucaud-Camou, E, N. Koueta, J. Boismery & A. Medhioub, 1991. The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine. *Ibid.*, 141-151.
- Boyle, P.R., 1990. Cephalopod biology in the fisheries context. *Fisheries Research*, 8: 303-321.
- Boyle, P.R. & D. Knoblock, 1983. The female reproductive cycle of the Octopus *Eledone cirrhosa*. *J. Mar Biol. Ass. U.K.*, 63: 71-83.
- Burukovski, R.N., G.V. Zuev, C.M Nigmatullin, & M.A. Tsymball, M.A., 1977. Method of establishing a maturity scale for the reproductive system of female squids with *Stenoteuthis pteropus* as an example. *Zool. Zh.* 56: 1781-1791.
- Calow, P., 1983. Life-cycle patterns and evolution. In: *The Mollusca*, edited by W.D. Russel-Hunter), Ecology, Academic Press Inc., Vol. 6, Cap. 15: 649-679.
- Clarke, 1966. A review of the systematics and ecology of oceanic squids. *Adv. Mar. Biol.*, 4: 91-300.
- Coelho, M.L., 1985. Review of the influence of oceanographic factors on cephalopod distribution and life cycles. *NAFO, Sci. Counc Stud.*, Vol. 9: 47-57.
- Coelho, M.L., 1986. Geographical Variations in Maturation, Size Patterns and Population Structure of the Squid *Illex illecebrosus* on the NW Atlantic, with Implications for Abundance and Recruitment. PHD Thesis Dalhousie University, Halifax, Canada, 214p.
- Coelho, M.L., 1990. Gametogenesis in the squid *Illex illecebrosus*. *J. cephalopod Biol.*, 1(2): 75-99.

Coelho, M.L & M.C. Martins, 1989. Preliminary observations on the biology of *Sepia officinalis* in ria Formosa, Portugal. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on the Cuttlefish Sepia*, edited by E. Boucaud-Camou, Institut de Biochimie et de Biologie Appliquée, Université de Caen, 281-288

Coelho, M.L., T. Amaratunga & H. Dupoy, 1982. Some field data on fecundity of *Illex illecebrosus* (LeSuer). *NAFO SCR Doc.*, N° 47, Ser. N° N536, 6p.

Cowden, R.R., 1968. Cytological and cytochemical studies of oocyte development and development of follicular epithelium in the squid, *Loligo brevis*. *Acta embriol. Morphol. Exp.*, Vol. 10: 160-173.

Dhainaut, A. & A. Richard, 1976. Vitellogénese chez les céphalopodes décapods. Évolution de l'ovocyte et des cellules folliculaires au cours de la maturation génitale. *Archives d'Anatomie microscopique*, Vol. 65(3):183-208.

Durchon, M. & A. Richard, 1967. Étude en culture organotypique du rôle endocrine de la glande optique dans la maturation ovarienne chez *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 264D, 1497-1500.

Durward, R.D., T. Amaratunga & R.K. O'Dor, 1979. Maturation index and fecundity for female squid, *Illex illecebrosus* (Le Suer, 1821). *ICNAF Res. Bull.*, 14: 67-72.

Ezzedine-Najai, S., 1984. Reproduction de la seiche *Sepia officinalis* Linne, 1758 (Mollusque, Cephalopode) di Golfe de Tunis: Etude morphologique et morphometrique. *Bull. Inst. Nat. Scient. Tech. Oceanogr. Pêche Salammbô*, Vol. 11: 71-118.

Ezzedine-Najai, S., 1985. Fecundity of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda) from the gulf of Tunis. *Vie Milieu*, 35 (3/4): 283-284.

Fields, W.G., 1965. The structure, development, food relations, reproduction and life history of the squid, *Loligo opalescens*. *Berry. Calif. Dept. Fish. Game & Fish Bull.*, 131, 108p.

Forsythe, J.W., R.T.Hanlon & R. DeRusha, 1991. Pilot large-scale culture of *Sepia* in biomedical research. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on the Cuttlefish Sepia*, edited by E. Boucaud-Camou, Institut de Biochimie et de Biologie Appliquée, Université de Caen, Centre de Publications, 313-323.

Guerra, A., 1987. La *Sepia* un invertebrado muy desarrollado. *Revista Oficial de la Junta del Puerto y Ria de Vigo*, N° X: 30-33.

Guerra, A. & B.G. Castro, 1988. On the life cycle of *Sepia officinalis* (Cephalopoda, Sepiodea) in the ria de Vigo (NW Spain). *Cah. Biol. Mar.*, Vol. 29: 395-405.

Guerra, A., M. Nixon, & B.G. Castro, 1988. Initial stages of food ingestion by *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J. Zool., Lond.*, Vol. 214: 189-197.

Haefner, P.A., 1959. Morphometry and biology of *Loligo pealei* (LeSuer, 1821) and *Lolliguncula brevis* (Blainville, 1823) in Delaware Bay. Master thesis, University of Delaware, 61p.

Henry, J., Koueta, E., Boucaud, E & P. Lubet, 1994. Données recents sur la reproduction des céphalopods: un modèle - la seiche. *Année biol*, Vol. 33(3): 139-155.

Hixon, R.F., 1980. Growth, reproductive biology, distribution and abundance of three species of loliginid squid (Myopsid, Cephalopoda) in northwest gulf of Mexico. PhD Thesis, University of Miami.

- Hixon, R.F., R.T. Hanlon & W.H. Hulet., 1981. Growth and maximal size of the long-finned squid *Loligo pealei* in the northwestern Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 1: 181-185.
- Howard, F.G., M.A. Ngoile & J. Mason., 1987. *Loligo forbesi*: Its present status in Scottish fisheries. International Council for the Exploration of the Sea (C.M. Papers and Reports) K:5, 10p.
- Knipe, J.H. & R.D. Beeman, 1978. Histological observations on the oogenesis in *Loligo opalescens*. Calif. Dept. Fish. & Game, *Fish. Bull.*, 169: 23-34.
- Koueta, N, 1990. Étude expérimentale de contrôle endocrine de la maturation génitale chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Thèse Doct. État. Sci. Nat.*, Univ. de Caen, 281p.
- Koueta, N. & E. Boucaud-Camou, 1991. Aspartate transcarbamylase activity: a bioassay for a gonial-mitosis stimulating factor from the optical gland of *Sepia officinalis* L. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on the Cuttlefish Sepia*, edited by E. Boucaud-Camou, Institut de Biochimie et de Biologie Appliquée, Université de Caen, Centre de Publications, 271-279.
- Koueta, N., Boucaud-Camou, E. & A.M. Renou, 1993. Étude cytologique des gonads au cours de la maturation sexuelle des seiches *Sepia officinalis* L. de la baie de Seine: intérêt pour une étude expérimentale. *Cah. Biol. Mar.*, 34: 461-476.
- Koueta, N., E. Boucaud-Camou & P. Lubet, 1994. Données recents sur la reproduction des céphalopodes: un modèle – la seiche (*Sepia officinalis*, Linné, 1758). *Ann. Biol.*, Vol. 33(3): 140-154.

- Koueta, N., E. Boucaud-Camou & A.M. Renou, 1995. Gonadotropic mitogenic activity of the optic gland of the cuttlefish, *Sepia officinalis*, during sexual maturation. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, Vol. 75: 391-404.
- Levin, J., 1987. Estatística aplicada a ciências humanas. Editora Harbra, Ltda., 2ªed., Brasil, 392p.
- Lim, J.Y., 1967. Ecological studies on common squids, *Ommastrephes sloani pacificus* in the eastern water of Korea. *Rep. Res. Fish. Develop. Agency*, 7: 41-49.
- Lipinski, M.R., 1979. Universal maturity scale for the commercially-important squids (Cephalopoda: Teuthoidea). The results of maturity classifications of the *Illex illecebrosus* (LeSuer, 1821) populations for the years 1973-1977. *Res. Doc. Int. Commn NW. Atl. Fish.* 79/III/38: 40p.
- Lipinski, M.R. & L.G. Underhill, 1995. Sexual maturation in squid: quantum or continuum? *S. Afr. J. mar. Sci.*, 15: 207-223
- Lopes, SS., 1995. Aspectos da gametogénese e fecundidade da espécie *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1799). Rel. Est. Lic. Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 64p.
- Lopes, SS., M.L. Coelho & J.P. Andrade, 1997. Analysis of oocyte development and potential fecundity of the squid *Loligo vulgaris* from the waters of Southern Portugal. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 77: 903-906.
- Lum-Kong, A., 1992. A histological study of accessory reproductive organs of female *Loligo forbesi* (Cephalopoda: Loliginidae). *J. Zool. Lond.*, 226: 469-490.
- Mangold-Wirz, K., 1963. Biologie des céphalopods benthiques et nectoniques de la Mer Catalane. *Vie Milieu*, Suppl. 13, 285p.

- Mangold, K., 1987.** Reproduction. In: *Cephalopods Life Cycles*, edited by P.R. Boyle, Academic Press, London, Vol. II, Comparative Reviews, 157-200.
- Mangold, K., Young, R.E. & M. Nixon, 1993.** Growth versus maturation in cephalopods. In: *Recent Advances in Fisheries Biology*, edited by T. Okutani, R.K. O'Dor & T. Kubodera. Tokai University Press, Tokyo, 697-703.
- Martins, M.C., 1990.** Revisão da espécie *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 e um estudo preliminar da sua biologia e pesca na região algarvia. Rel. Est. Lic. Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 70p.
- Medhioub, A., 1986.** Étude de la croissance et du cycle sexuel de la Seiche (*Sepia officinalis*) des côtes normandes. *Thèse Doct. 3^o cycle*, Univ. de Caen, 117p.
- Moriyasu, M., 1988.** Analyse de la maturation sexuelle d'*Eledone cirrosa* (Cephalopoda: Octopoda) du golf de Lion. *Aquat. Living Resour.*, Vol. 1: 59-65.
- Naef, A., 1928.** Die cephalopoden. *Fauna Flora Golf. Neapel.*, 35B, 357p.
- Natsukari, Y., 1970.** Egg-laying behavior, embryonic development and hatched larva of the pygmy cuttlefish. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* (30): 15-29.
- Nesis, K.N., 1970.** Biology of the Peru-Chilean giant squid *Dosidicus gigas*. *Okeanology*, 10: 140-152 [R].
- Nixon, M., 1985.** Capture of prey, diet and feeding of *Sepia officinalis* and *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) from hatchling to adult. *Vie Milieu*, 33(3/4): 255-261.

- Palmelegiano, G.B. & R. Sequi, 1981.** On the possibility of the introduction of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in a management strategy for the coastal lagoons. In: Symposium International sur les Lagunes Cotieres, France (8/14), 9p.
- Palmelegiano, G.B. & D'Apote, M.P., 1983.** Combined effects of temperature and salinity on cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) hatching. *Aquaculture*, Vol. 35: 259-264.
- Ramirez, S. & M. Guajardo, 1980.** A cytological and histochemical analysis of the ovarian follicle cells of the south Texas squid (*Loligo pealei*). *The Texas Journal of Science* 32(1): 43-54.
- Richard, A., 1966.** Action de la température sur l'évolution genitale de *Sepia officinalis* L., *C. R. Acad. Sc. Paris*, 263D, 1998-2001.
- Richard, A., 1967.** Rôle de la photoperiode dans le determinisme de la maturation genitale femelle du céphalopode *Sepia officinalis* L., *C. R. Acad. Sc. Paris*, 264D, 1315-1318.
- Richard, A., 1968.** Mise en évidence de l'action de la lumière dans le determinisme de la ponte chez le céphalopode *Sepia officinalis* L., *C. R. Acad. Sc. Paris*, 267D, 2360-2363.
- Richard, A., 1970.** Analyse du cycle sexuel chez les cêphalopodes: mise en évidence experimentale d'un rytme conditionné par les variations des facteurs extems et internes. *Bull. Soc. Zool. France*, 95 (3): 461-469.
- Richard, A., 1971.** Contribution a l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Cêphalopode). Thèse Doctorat d'État ès Sciences Naturelles, Univerversité de Lille, France, 264p.

Richard, A., 1975. L'élevage de la seiche (*Sepia officinalis* L., Mollusque Céphalopode). In: 10th Europ. Symp. Mar. Biol., Ostend (Belgium), Vol. 1: 359-380.

Richard, A. & A. Dhainaut, 1973. Évolution des cellules folliculaires au cours de l'ovogénèse de *Sepia officinalis* L. (Moll. Céphalopode). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 277, 2185-2188.

Rocha, F; A.F. González, M. Rasero, A. Guerra, B.G. Castro & T Cortez, 1996. An overview on the reproductive strategies in Cephalopoda. *ICES Working Group on Cephalopod Fisheries and Life History*, 17-19 April 1996, Lisbon, Portugal, 6p.

Roper, C.F.E., M.J. Sweeney, C.E. Nauen, 1984. FAO Species catalogue. Cephalopods of the World. An annotated and illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. *FAO Fish. Synop.*, Vol 125(3), 277p.

Santos, V.M.C., 1993. Fecundidade na espécie *Loligo forbesi* (Steenstrup, 1856). Rel. Est. Lic. Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 51p.

Saville, A., 1987. Comparisons between cephalopods and fish of those aspects of the biology related to stock management. In: *Cephalopods Life Cycles*, edited by P.R. Boyle, Academic Press, London, Vol. II, Comparative Reviews, 277-290.

Sauer, W.H. & M.R. Lipinski, 1990. Histological validation of morphological stages of sexual maturity in Chokker Squid *Loligo vulgaris reynaudii* D'Orb (Cephalopoda: Loliginidae). *S. Afr. J. Mar. Sci.*, Vol. 9: 189-200.

Schuldt, M., 1979. Contribución al conocimiento del ciclo reproductor de *Illex argentinus* (Cephalopoda: Omastrephidae). Monografías 10. *Comicion de investigaciones científicas*, Provincia de Buenos Aires, Argentina, 110 p.

Segawa, S., W.T. Yang, H.-J. Marthy & R.T. Hanlon, 1988. Embryonic development of the eastern atlantic squid *Loligo forbesi*. *Veliger*, 30: 230-243.

Selman, K. & J.M. Arnold, 1977. An ultrastructural and cytochemical analysis of oogenesis in the squid *Loligo pealei*. *J. Morph.* 152: 381-400.

Selman, K. & R.A. Wallace, 1978. An autoradiographic study of vitellogenesis in the squid *Loligo pealei*. *Tissue and Cell*. 10(3): 599-608.

Soeda, 1956. Studies on the ecology and breeding habits of the squid, *Ommastrephes sloani pacificus* (Steenstrup). *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab.*, 14, 24p.

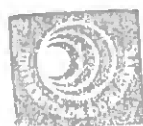
Takahashi, N., 1978. Ultrastructural characteristics of the protein yolk formation in the ovary of the squid, *Todarodes pacificus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, Vol. 29, 89-99.

Villa, H.M., 1993. Biologia reprodutiva e fecundidade da espécie *Loligo vulgaris* (Lamarck, 1799). Rel. Est. Lic. Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, Faro, 55p.

Voss, G.L., 1983. A review of cephalopod fisheries biology. *Mem. Natl. Mus. Victoria*, 44: 229-241.

Vovk, A.N., 1972. Fecundity of the north american squid *Loligo pealei* (Le Suer, 1821). *Atl. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 42, pp. 133-140. *Fish. Res. Bd. Can. Trans. Serv.* Nº 3302.

Wells, M.J. & J. Wells, 1977. Optic glands and the endocrinology of reproduction. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 38: 525-540.



ANEXOS

ANEXO I

Escalas de Maturação

Tabela I - Escala de maturação para a espécie *Sepia officinalis* (adaptado de Martins, 1990)

Estado de Maturação		Machos	Fêmeas
IMATURO	(1)	Sexo indeterminado	
EM MATURAÇÃO	EM I	(2) Tracto genital pouco desenvolvido testículo pequeno	Glândulas nidamentares reduzidas e de cor acinzentada, ovário pequeno-médio, oócitos com diâmetro inferior a 4 mm
	EM II	(3) Tracto genital bem desenvolvido bolsa de Needham pequena sem espermatóforos	Glândulas nidamentares bem desenvolvidas, g.n. acessórias de cor alaranjada, ovário com oócitos ($\varnothing < 6$ mm)
MATUROS	(4)	Bolsa de Needham grande com espermatóforos, estando por vezes alguns agarrados às paredes do manto ou a outros órgãos	G.n. acessórias cor de coral, muitos oócitos reticulados e hialinos ($6 < \varnothing < 9$ mm), oócitos hialinos na glândula do oviducto

ANEXO II

Parâmetros de Regressões Lineares

Tabela I - Parâmetros da regressão peso-comprimento

MACHOS						
<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,99607085					
R Square	0,99215713					
Adjusted R Squa	0,99214746					
Standard Error	0,07863687					
Observations	813					
ANOVA						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	634,4230419	634,423	102595,1	0	
Residual	811	5,015027724	0,006184			
Total	812	639,4380696				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-7,4086523	0,035957483	-206,039	0	-7,479233	-7,338072
X Variable 1	2,66371794	0,008316201	320,3046	0	2,6473941	2,6800418
FÊMEAS						
<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,99723387					
R Square	0,99447539					
Adjusted R Squa	0,9944658					
Standard Error	0,07435479					
Observations	578					
ANOVA						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	573,2349551	573,235	103684,7	0	
Residual	576	3,184493718	0,005529			
Total	577	576,4194488				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-7,7281721	0,036550543	-211,438	0	-7,799961	-7,656384
X Variable 1	2,74382714	0,008521173	322,0011	0	2,7270908	2,7605635
SEXO INDETERMINADO						
<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,97229281					
R Square	0,94535331					
Adjusted R Squa	0,9449515					
Standard Error	0,21570977					
Observations	138					
ANOVA						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	109,4734686	109,4735	2352,715	1,002E-87	
Residual	136	6,32817606	0,046531			
Total	137	115,8016446				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-7,1511369	0,182075631	-39,2756	4,34E-76	-7,511202	-6,791071
X Variable 1	2,59727405	0,053546755	48,50479	1E-87	2,4913821	2,703166

Tabela II - Parâmetros da regressão peso do ovário-CDM

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,88777912					
R Square	0,78815177					
Adjusted R Square	0,78778398					
Standard Error	1,11629393					
Observations	578					
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	2670,32809	2670,328	2142,928	2,9389E-196	
Residual	576	717,760596	1,246112			
Total	577	3388,08869				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-26,449604	0,54873599	-48,201	2,7E-204	-27,5273714	-25,37184
X Variable 1	5,92205896	0,12792899	46,29177	2,9E-196	5,670794881	6,173323

Tabela III - Parâmetros da regressão peso do ovário-peso do corpo

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,89381575					
R Square	0,79890659					
Adjusted R Square	0,79855747					
Standard Error	1,08758964					
Observations	578					
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	2706,76639	2706,766	2288,341	8,8855E-203	
Residual	576	681,322301	1,182851			
Total	577	3388,08869				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-9,8043817	0,18671379	-52,5102	9,5E-222	-10,1711044	-9,437659
X Variable 1	2,16698584	0,04529974	47,8366	8,9E-203	2,078013062	2,255959

Tabela IV - Parâmetros da regressão fecundidade-CDM

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,77286219				
R Square		0,59731597				
Adjusted R Square		0,59194685				
Standard Error		0,23807521				
Observations		76				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	6,305642423	6,30564	111,25	1,80842E-16	
Residual	75	4,250985511	0,05668			
Total	76	10,55662793				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	-3,5897607	0,831782081	-4,31575	4,8E-05	-5,24675602	-1,932765
X Variable 1	1,87747721	0,178001715	10,5475	1,8E-16	1,52287953	2,232075

Tabela V - Parâmetros da regressão fecundidade-peso do corpo

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,69031952				
R Square		0,47654103				
Adjusted R Square		0,46983002				
Standard Error		0,35063072				
Observations		76				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	8,729958578	8,72996	71,0088	1,3999E-12	
Residual	78	9,589468236	0,12294			
Total	79	18,31942681				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	1,09829306	0,478595595	2,29482	0,02443	0,145482209	2,051104
X Variable 1	0,79025064	0,093779675	8,42667	1,4E-12	0,603549604	0,976952

Tabela VI - Parâmetros da regressão fecundidade-peso do ovário

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,9198139				
R Square		0,84605761				
Adjusted R Square		0,84405836				
Standard Error		0,17293117				
Observations		76				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	12,65549102	12,6555	423,187	5,08021E-33	
Residual	77	2,302699655	0,02991			
Total	78	14,95819067				
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>
Intercept	3,77172165	0,069336501	54,3973	3,3E-63	3,633654871	3,909788
X Variable 1	0,6930053	0,033687621	20,5715	5,1E-33	0,625924592	0,760086

Tabela VII - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos-peso do ovário

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,752832				
R Square		0,566756				
Adjusted R Square		0,558879				
Standard Error		0,067582				
Observations		57				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,328613227	0,32861	71,9492	1,43745E-11	
Residual	55	0,251201367	0,00457			
Total	56	0,579814594				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept		1,265426	0,034718729	36,4479	3,3E-40	1,195848531 1,335004
X Variable 1		0,137162	0,01617038	8,48229	1,4E-11	0,104755615 0,169568

Tabela VIII - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos hialinos-CDM

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,612174				
R Square		0,374757				
Adjusted R Square		0,361454				
Standard Error		0,100457				
Observations		49				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,284290387	0,28429	28,1707	2,95201E-06	
Residual	47	0,474309375	0,01009			
Total	48	0,758599761				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept		-0,61493	0,441653166	-1,3923	0,17037	-1,50342252 0,273559
X Variable 1		0,498649	0,093949815	5,30761	3E-06	0,309646688 0,687652

Tabela IX - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos-fecundidade

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R		0,601372				
R Square		0,361648				
Adjusted R Square		0,351352				
Standard Error		0,082921				
Observations		64				
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,241513652	0,24151	35,1251	1,48065E-07	
Residual	62	0,42630088	0,00688			
Total	63	0,667814532				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept		0,925561	0,106326329	8,70491	2,4E-12	0,71301769 1,138104
X Variable 1		0,122662	0,020696712	5,92664	1,5E-07	0,081289875 0,164034

Tabela VII - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos-peso do ovário

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,752832					
R Square	0,566756					
Adjusted R Square	0,558879					
Standard Error	0,067582					
Observations	57					
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,328613227	0,32861	71,9492	1,43745E-11	
Residual	55	0,251201367	0,00457			
Total	56	0,579814594				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept	1,265426	0,034718729	36,4479	3,3E-40	1,195848531	1,335004
X Variable 1	0,137162	0,01617038	8,48229	1,4E-11	0,104755615	0,169568

Tabela VIII - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos-fecundidade

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,601372					
R Square	0,361648					
Adjusted R Square	0,351352					
Standard Error	0,082921					
Observations	64					
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,241513652	0,24151	35,1251	1,48065E-07	
Residual	62	0,42630088	0,00688			
Total	63	0,667814532				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept	0,925561	0,106326329	8,70491	2,4E-12	0,71301769	1,138104
X Variable 1	0,122662	0,020696712	5,92664	1,5E-07	0,081289875	0,164034

Tabela IX - Parâmetros da regressão diâmetro dos oócitos hialinos-CDM

<i>Regression Statistics</i>						
Multiple R	0,612174					
R Square	0,374757					
Adjusted R Square	0,361454					
Standard Error	0,100457					
Observations	49					
<i>ANOVA</i>						
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>	
Regression	1	0,284290387	0,28429	28,1707	2,95201E-06	
Residual	47	0,474309375	0,01009			
Total	48	0,758599761				
<i>Coefficients Standard Error t Stat P-value Lower 95% Upper 95%</i>						
Intercept	-0,61493	0,441653166	-1,3923	0,17037	-1,50342252	0,273559
X Variable 1	0,498649	0,093949815	5,30761	3E-06	0,309646688	0,687652

ANEXO III

Teste T^2 de Hotelling

Tabela I – Parâmetros obtidos pelo programa SAS na determinação do $L_{50\%}$ dos machos

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B	0.20923569	0.00619155674	0.196038752	0.222432634
L50	66.58758952	0.16667107606	66.232339885	66.942839163

Tabela II – Parâmetros obtidos pelo programa SAS na determinação do $L_{50\%}$ das fêmeas

Parameter	Estimate	Asymptotic Std. Error	Asymptotic 95 % Confidence Interval	
			Lower	Upper
B	0.92185873	0.00000000000	0.921858730	0.921858730
L50	80.16785930	0.35761881213	79.409745053	80.925973548

Tabela III – Resultados obtidos pelo teste T^2 de Hotelling

T^2		T_0	
233439.04		2.0645161	
PP1		PP2	
0.002204		0.1375083	
DIF			
$b_{\sigma} - b_{\varphi}$	-0.71266		
$L_{50\sigma} - L_{50\varphi}$	-13.5803		
INTERVALO DE CONFIANÇA			
b	-0.71266±0.002204*		
L₅₀	-13.5803±0.13751*		

* o zero não está incluído

ANEXO IV

Método de Bhattacharya

Tabela I - Resultados da análise das componentes modais dos diâmetros occitários pelo método de Bhattacharya

Macroestados	Componentes modais	Média (µm)	Desvio padrão (s.d.)	População (N)	Índice de separação (I.S)
II	1	175.76	142.865	437	-
	2	598.11	74.631	17.5	3.884
III	1	244.19	129.736	326	-
	2	538.81	109.404	67.85	2.464
	3	1088.03	114.827	19	4.899
	4	1556.55	224.68	2.79	2.76
	5	2150	157.727	4.98	3.104
	6	2550	149.380	2.840	2.605
IV	1	215.63	152.515	283	-
	2	681.7	115.266	26.55	3.481
	3	1021.09	88.255	12.080	3.335
	4	1450.97	119.240	11.960	4.143
	5	2092.10	166.943	12.940	4.481
	6	2811.51	102.617	12.990	5.338
	7	3808.10	242.237	45.000	5.780
	8	4614.36	131.566	7.800	4.314

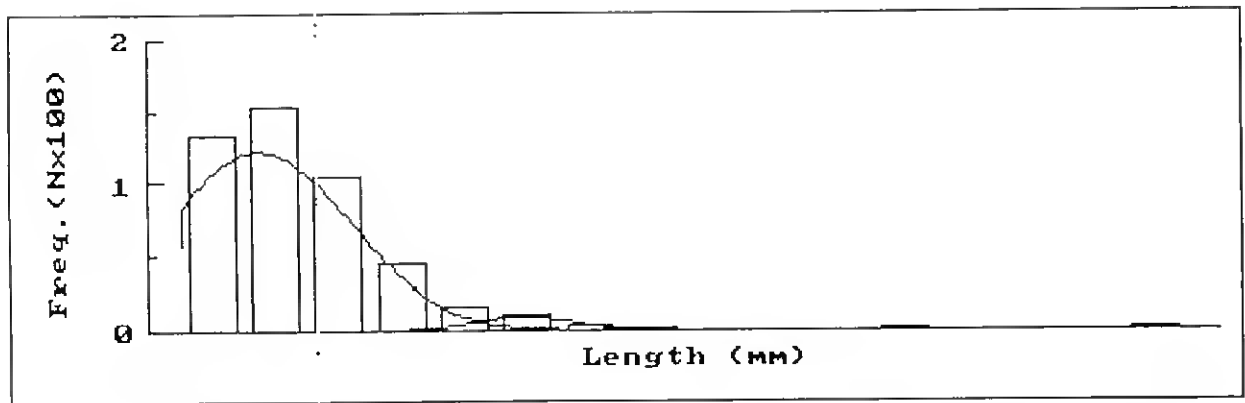


Figura 1 – Método de Bhattacharya aplicado aos diâmetros oocitários no macroestado II

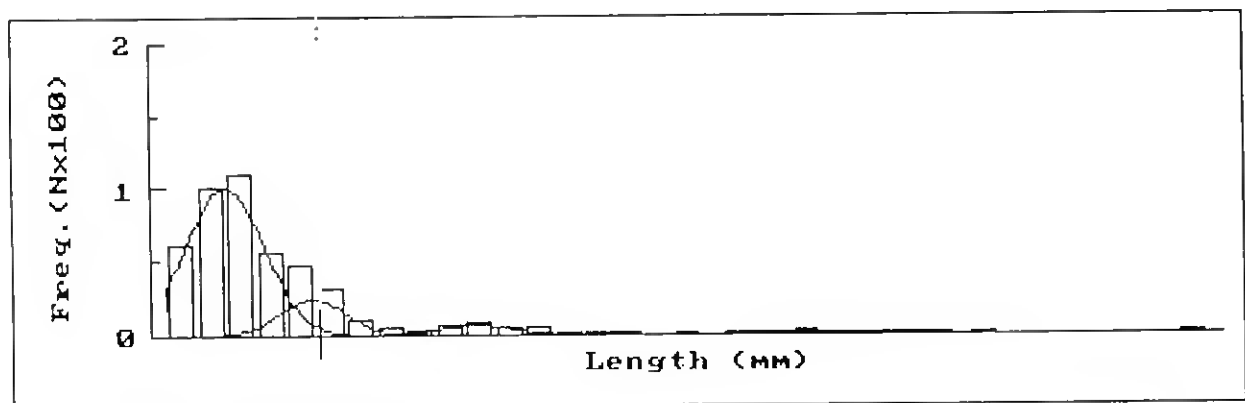


Figura 2 – Método de Bhattacharya aplicado aos diâmetros oocitários no macroestado III

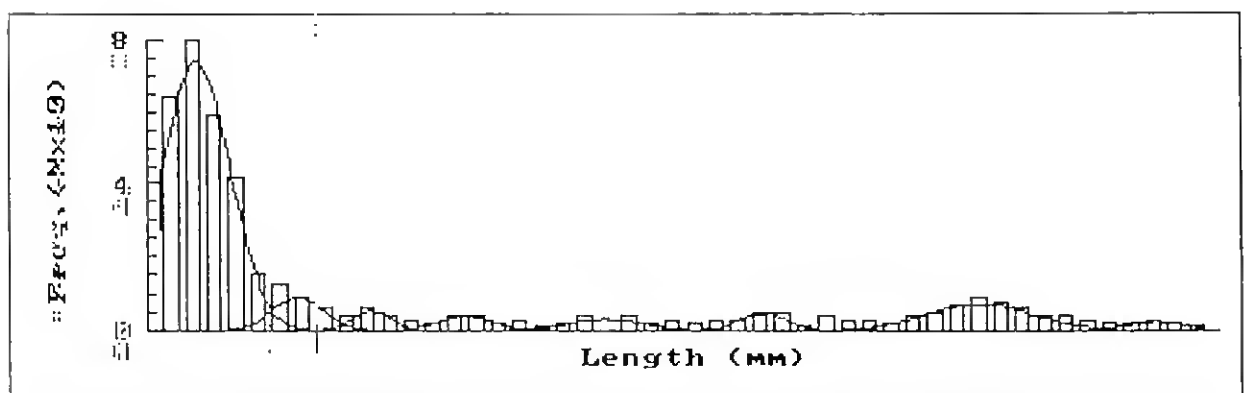


Figura 3 – Método de Bhattacharya aplicado aos diâmetros oocitários no macroestado IV

ANEXO V

Medições dos Diâmetros Oocitários

Tabela I - Resultados obtidos na medição dos diâmetros oocitários em cada macroestado de maturação e respectiva análise estatística

Estado histológico	Nº de oócitos amostrado	Diâmetro oocitário (valor médio)	Diâmetro oocitário (valor mínimo)	Diâmetro oocitário (valor máximo)	Intervalo de confiança (L95%)
II	16	87,93	62,5	129,8	10,16
IIIa	677	270,31	48,75	921,84	7,94
IIIb	451	423,23	92,18	2406,18	19,88
IV	204	1776,98	303,51	4945,98	186,62
V	41	3247,74	1121,94	5178,96	266,44

Tabela II - Resultados do teste t-student aplicado aos diâmetros médios dos estados histológicos

Comparação dos estados histológicos II e IIIa			Comparação dos estados histológicos IIIb e IV		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	0,087931	0,270587	Mean	0,423229	1,776986
Variance	0,00043	0,011117	Variance	0,046411	1,849439
Observations	16	673	Observations	451	204
Hypothesized Mean	0		Hypothesized Mean	0	
df	39		df	208	
t Stat	-27,7232		t Stat	-14,1379	
P(T<=t) one-tail	1,41E-27		P(T<=t) one-tail	1,5E-32	
t Critical one-tail	1,684875		t Critical one-tail	1,652213	
P(T<=t) two-tail	2,82E-27		P(T<=t) two-tail	3,01E-32	
t Critical two-tail	2,022689		t Critical two-tail	1,971434	
Comparação dos estados histológicos IIIa e IIIb			Comparação dos estados histológicos IV e V		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	0,270587	0,423229	Mean	1,776986	3,24739
Variance	0,011117	0,046411	Variance	1,849439	0,794645
Observations	673	451	Observations	204	43
Hypothesized Mean	0		Hypothesized Mean	0	
df	596		df	89	
t Stat	-13,9677		t Stat	-8,85946	
P(T<=t) one-tail	7,34E-39		P(T<=t) one-tail	3,67E-14	
t Critical one-tail	1,647413		t Critical one-tail	1,662156	
P(T<=t) two-tail	1,47E-38		P(T<=t) two-tail	7,34E-14	
t Critical two-tail	1,963954		t Critical two-tail	1,986978	

