



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Mestrado em Zootecnia**

**Dissertação**

**Relação entre a condição corporal e fisiológica do lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*) e a degradação ambiental do meio**

Mauro Miguel Guerra Soares

**Orientadora:**

Professora Doutora Maria Antónia Pacheco Ilhéu

Outubro de 2012

**Mestrado em Zootecnia**

**Dissertação**

**Relação entre a condição corporal e fisiológica do lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*) e a degradação ambiental do meio**

Mauro Miguel Guerra Soares

**Orientadora:**

Professora Doutora Maria Antónia Pacheco Ilhéu

Outubro de 2012



# **Relação entre a condição corporal e fisiológica do Lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*) e a degradação ambiental do meio**

## **Resumo**

O lagostim vermelho da Louisiana, *Procambarus clarkii* (Girard 1852), encontra-se amplamente distribuído por todo o Mundo e em locais com diversos níveis de qualidade ambiental.

Neste trabalho, pretendeu-se avaliar a resposta fisiológica de *P. clarkii* a diferentes condições de degradação ambiental, através da condição corporal, índice hepatossomático e coloração do hepatopâncreas.

A sobrevivência e resposta fisiológica de *P. clarkii* sujeito a condições de hipoxia foram avaliadas em condições laboratoriais. Adicionalmente analisaram-se indivíduos da mesma espécie, provenientes de diversos locais com diferentes condições ambientais.

Verificou-se que condições de hipoxia moderada (3-5mg/L) não afetam a taxa de sobrevivência, o crescimento e a condição corporal e hepatossomática de *P. clarkii*. Indivíduos provenientes de massas de água com elevada degradação apresentam significativamente maior dimensão e condição corporal. O Índice hepatossomático assim como a cor do hepatopâncreas apresentam correlação com modificações hidro-morfológicas causadas por ação humana.

Os resultados obtidos enfatizam a elevada tolerância de *P. clarkii* a condições ambientais de elevado constrangimento assim como demonstram que esta espécie beneficia de condições ambientais degradadas.

# **Relation between body and physiological condition of red crayfish (*Procambarus clarkii*) and environmental degradation**

## **Abstract**

The Louisiana red crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard 1852), is widely distributed throughout the world, being found in habitats with various levels of environmental quality.

This study, aims to evaluate the physiological response of *P. clarkii* to environmental degradation through the body condition and hepatosomatic indexes and the color of the hepatopancreas.

The survival and physiological response of *P. clarkii* under hypoxia was assessed in laboratory conditions. Additionally individuals of *P. clarkii* from several habitats with different environmental conditions were analyzed.

It was found that conditions of moderate hypoxia (3-5mg / L) did not affect survival, growth and body and hepatosomatic condition of *P. clarkii*. Moreover, individuals from degraded water bodies presented significantly higher body size and condition the hepatosomatic index and the color of the hepatopancreas correlate with hydro-morphological changes caused by human action.

This study demonstrates and emphasizes the great adaptability of this species to a wide range of environmental conditions as well as a high resistance to habitat degradation constrains.

## **Agradecimentos**

À Professora Dra. Maria Antónia Pacheco Ilhéu, por ter aceitado orientar o meu trabalho, pelas críticas e sugestões feitas durante a realização deste trabalho, pela disponibilidade que sempre demonstrou e, sobretudo, pela amizade e confiança em mim depositadas;

À Professora Dra. Ana Costa, por todo o apoio que prestou aquando da execução do trabalho laboratorial, bem como a disponibilidade demonstrada na revisão do trabalho escrito.

Queria agradecer ao Departamento Paisagem, Ambiente de Ordenamento pela cedência do espaço no laboratório de Ecologia Aquática, bem como, de todo o material utilizado ao longo da experiência.

Queria agradecer ao Departamento de Zootecnia, pela cedência do espaço no laboratório de Nutrição, bem como de todo o material utilizado ao longo da experiência.

Queria agradecer a D. Maria José e à D. Margarida pela colaboração no registo de alguns dados ao longo da experiência, pelo incentivo e ajuda em torno de todas as questões laboratoriais.

Ao colega António Vareia, por me ter acompanhado ao longo da experiência e pelo apoio e paciência que demonstrou e, sobretudo, pela amizade que teve para comigo.

A todos os meus colegas de Mestrado, do curso de Engenharia Zootécnica, de Ciência e Tecnologia Animal e do Grupo Académico Seistetos, pelo apoio e amizade demonstrados e que me acompanharam ao longo de todos estes anos.

À Daniela Marecos, pelo apoio e confiança que sempre me deu, pelo estímulo e alegria que demonstrou, pela paciência revelada, pela ajuda e críticas construtivas e por tudo o que me fez por mim até hoje.

A toda a minha família mas em especial aos meus pais, por me possibilitarem a frequência deste curso e por todo o apoio paciência e disponibilidade que sempre demonstraram para comigo.

# Índice

Resumo.....	I
Abstract .....	II
Agradecimentos .....	III
Índice.....	IV
Índice de Figuras .....	V
Índice de Tabelas.....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VII
Introdução.....	1
1 Estado da arte .....	3
1.1 Avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos .....	3
1.2 Utilização de bioindicadores .....	5
1.3 Utilização de espécies invasoras como bioindicadores .....	6
1.4 Índices de Condição Corporal e fisiológica .....	8
1.5 O hepatopâncreas como elemento de avaliação da condição fisiológica do lagostim ..	9
2 Metodologia .....	11
2.1 Ensaio laboratorial em condições controladas de oxigénio.....	11
2.1.1 Desenho Experimental .....	12
2.1.2 Monitorização dos parâmetros ambientais .....	14
2.1.3 Parâmetros biológicos .....	15
2.2 Condição corporal e hepatossomática de Lagostins provenientes de diferentes massas de água .....	17
2.2.1 Área de estudo.....	17
2.2.2 Parâmetros ambientais.....	18
2.2.3 Parâmetros biológicos .....	19
2.3 Tratamento de dados e análise estatística.....	20
3 Resultados .....	21
3.1 Ensaio em condições ambientais controladas .....	21
3.1.1 Sobrevivência, crescimento e resposta fisiológica do Lagostim em condições de hipoxia.....	21
Condição corporal e hepatossomática do Lagostim em massas de água com diferentes condições ambientais.....	24
3.2 Caracterização ambiental das massas de água .....	24
3.2.1 Parâmetros morfométricos e biofísicos .....	24
3.2.2 Parâmetros físico-químicos .....	27
3.2.3 Pressão Antropogénica .....	28
3.3 Parâmetros biométricos e índices de condição corporal e hepatossomático .....	29
3.4 Relação entre os parâmetros biológicos e ambientais .....	33
4 Discussão .....	35
4.1 Influência dos factores ambientais .....	35
4.2 Interpretação de Índices .....	36
4.3 Interpretação da cor do hepatopâncreas .....	37
5 Conclusão .....	40
Referências Bibliográficas .....	41
Anexos .....	53

## Índice de Figuras

	Página
Equação 1.....	15
Equação 2.....	15
Figura 1.....	9
Figura 2.....	12
Figura 3.....	13
Figura 4.....	13
Figura 5.....	30
Figura 6.....	33
Figura 7.....	34



## Índice de Tabelas

	Página
Tabela 1.....	15
Tabela 2.....	16
Tabela 3.....	17
Tabela 4.....	19
Tabela 5.....	21
Tabela 6.....	22
Tabela 7.....	23
Tabela 8.....	23
Tabela 9.....	24
Tabela 10.....	25
Tabela 11.....	26
Tabela 12.....	27
Tabela 13.....	28
Tabela 14.....	29
Tabela 15.....	31
Tabela 16.....	32

## **Lista de Abreviaturas**

C – Comprimento (cm)

ICC – Índice de Condição Corporal

IH – Índice Hepatosomático

Kw – Teste estatístico Kruskal-Wallis

Mw – Teste estatístico Mann-Whitney

N – Número de amostras

OD – Oxigênio Dissolvido (mg/L)

P<sub>v</sub> – Peso vivo (g)

P-Value – Expressa o nível de significância na Análise Estatística

% - Valor percentual relativamente à análise efetuada

## Introdução

O Lagostim Vermelho do Louisiana, *Procambarus clarkii* (Girard 1982), é uma espécie natural da América do Norte, distribuindo-se do sul de Illinois à fronteira do México e para leste até à Florida ocorrendo ainda no Norte do México, da costa ocidental do Golfo da Califórnia até à costa do Atlântico (Laurent & Forest 1979).

Atualmente, como resultado de introduções por ação humana, pode encontrar-se em todos os continentes à exceção da Antártida (Huner & Avault 1979; Holdich 1987; Hobbs *et al.* 1989; Gherardi *et al.* 2002).

O primeiro registo de *P. clarkii* em Portugal ocorreu em 1979 no Rio Caia, na bacia hidrográfica do rio Guadiana (Ramos & Pereira 1981 in Anastácio 1993), desconhecendo-se a data exata e o objetivo da sua introdução, podendo ter ocorrido de uma infestação natural no território nacional após uma rápida expansão no sul de Espanha. Em 1986 já se encontrava amplamente distribuído no sul de Portugal, nomeadamente nas bacias hidrográficas de Guadiana, Tejo e Sado. Em 1987 foi detetado na região inferior do rio Mondego (Anastácio 1993) e em 1990-1991 foi considerado responsável por perdas significativas na produção de arroz, causado sobretudo por danos no sistema de irrigação devido ao comportamento de escavação da espécie (Gutiérrez-Yurrita *et al.* 1999; Ilhéu *et al.* 2003). A introdução desta espécie pode causar impacto sobre os ecossistemas (Fishar 2006), sendo inclusivamente considerado como uma das maiores ameaças para espécies indígenas (Gherardi & Holdich 1999). O seu potencial invasor depende de um conjunto de fatores biológicos, ecológicos e etológicos e relaciona-se com a sua capacidade para desenvolver populações em contextos ambientais muito diversos, grande plasticidade do seu ciclo biológico, maturação sexual precoce, rápida taxa de crescimento, elevada fecundidade e resistência a doenças (Gherardi *et al.* 1999; Lindqvist & Huner 1999; Aquiloni *et al.* 2005). Em Portugal, *P. clarkii* pode ser encontrado em ribeiras, rios, riachos e barragens. O estado de degradação dos habitats aquáticos, aparentemente não é um problema para o estabelecimento e desenvolvimento desta espécie, visto ter uma grande capacidade de resistência e adaptação (Ilhéu *et al.* 2003). De facto *P. clarkii* ocorre frequentemente em locais com grande disponibilidade de matéria orgânica, o que poderá estar associado ao seu comportamento detritofago (Ilhéu & Bernardo 1995).

A energia e os recursos obtidos do meio ambiente sob a forma de nutrientes são distribuídos entre manutenção, crescimento e reprodução (Tytler & Calow 1985). As taxas de crescimento e o esforço reprodutivo são sumariamente um resultado da quantidade de recursos que os organismos são capazes de distribuir para estes caminhos metabólicos após terem sido satisfeitas as necessidades básicas de manutenção. Geralmente, os organismos armazenam

recursos extra em tecidos específicos para serem utilizados posteriormente, quando as condições ambientais propiciarem tanto a reprodução como o crescimento. Nos crustáceos, a glândula digestiva ou hepatopâncreas serve como o principal órgão onde os recursos energéticos são armazenados (Jussila 1999). Segundo Mazlum (2005), o hepatopâncreas é o local chave para a reserva de energia no lagostim. Num lagostim saudável, o hepatopâncreas poderá representar cerca de 10-15% da biomassa corporal húmida (Huner *et al.* 1997). Os mesmos autores indicam que o lagostim reserva grandes quantidades de energia no seu hepatopâncreas para o desenvolvimento dos ovos e para a sua sobrevivência durante o período em que se encontram refugiados em tocas (Huner, 1989). Devido a esta razão, o teor húmido do hepatopâncreas tem sido utilizado como um bom indicador da condição corporal do indivíduo (Lindqvist & Louekari 1975; Huner *et al.* 1985; Lowery 1988; McClain 1995b; Jussila & Mannonen 1997; Mazlum, 2005). Alguns estudos (de lagostins e outras espécies) têm utilizado a avaliação da cor do hepatopâncreas como uma medida expedita para avaliar o conteúdo energético do mesmo e como tal útil para classificar a condição corporal de cada indivíduo. Para que esta avaliação seja possível, diversos autores têm tentando relacionar o teor húmido do hepatopâncreas com a sua coloração, utilizando para essa função, escalas de cor comparativas (Endo & Kadoya 1991; Hasek & Felder 2005, 2006; Van der Ham & Huner, 2006). Os resultados obtidos têm sugerido que a coloração do hepatopâncreas possa estar diretamente relacionada com fatores tais como o stress nutricional e a flutuação de alimento (Hasek & Felder 2005) e outros como diferenças na qualidade da água e dos sedimentos dos locais em que os indivíduos se encontram (Van der Ham & Huner, 2006). Contudo, ainda não existem padrões de cores definidos através dos quais se possa avaliar a condição do hepatopâncreas e respetivamente a sua condição corporal.

O objetivo principal deste trabalho consiste em verificar se existe uma relação entre a condição corporal e fisiológica do lagostim e as condições ambientais das massas de água e discutir posteriormente de forma preliminar, o potencial da espécie como bioindicador de degradação ambiental. Este trabalho é composto por duas fases distintas: uma fase experimental em que se realiza um ensaio em condições controladas de oxigénio, cujo objectivo consiste em avaliar as respostas eco-fisiológicas de *P. clarkii* sujeito a condições de hipoxia; a segunda fase deste trabalho, consiste na análise da condição corporal e hepatossomática de indivíduos provenientes de massas de água com diferentes condições ambientais, nomeadamente degradação. Os índices de condição corporal e hepatossomáticos serão testados como variáveis de resposta às condições ambientais.

# 1 Estado da arte

Esta revisão do Estado da arte foca-se não só em estudos realizados com *Procambarus clarkii* (Girard 1852), mas também em estudos no âmbito da qualidade ambiental dos meios aquáticos, com referência a outras espécies de crustáceos.

## 1.1 Avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos

Segundo Alba-Tercedor (1996), o termo qualidade, referindo-se a águas continentais, não é um conceito absoluto nem de fácil definição. Pelo contrário, é um conceito relativo que depende do destino final do recurso.

Ao avaliar a qualidade das águas mediante o estudo da composição e estrutura das comunidades de organismos, surge o termo qualidade ecológica. Considera-se que um meio aquático apresenta uma boa qualidade ecológica quando possui características naturais que permitem o desenvolvimento de comunidades de organismos que lhes são próprias (Alba-Tercedor 1996).

Os ecossistemas aquáticos têm sido alterados de maneira significativa devido a múltiplos impactos ambientais resultantes de atividades humanas relacionadas com a exploração mineira, a construção de barragens e represas, a retificação e desvio do curso natural dos rios, o lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, operações de limpeza das matas e uso inadequado do solo em regiões ripárias e planícies de inundação, exploração de recursos piscatórios e introdução de espécies exóticas (Goulart & Callisto 2003).

Os ecossistemas aquáticos recebem materiais, sedimentos e poluentes de toda a sua bacia de drenagem, refletindo a utilização e ocupação do solo nas áreas vizinhas. Os principais processos de degradação, resultantes das atividades humanas nas bacias de drenagem, causam o assoreamento e homogeneização do leito dos rios, diminuição da diversidade de habitats e micro habitats e eutrofização artificial (enriquecimento por aumento nas concentrações de fósforo e azoto e conseqüente perda de qualidade ambiental) (Callisto & Gonçalves 2002).

O resultado destas perturbações tem-se traduzido numa queda acentuada da biodiversidade aquática, em função da alteração do ambiente físico, químico e alterações na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (Callisto *et al.* 2001b). Tradicionalmente, a avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos tem sido realizada através da medição de alterações nas concentrações de variáveis físicas e químicas, principalmente através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, índices biológicos e multimétricos, tendo como base a sua resposta a alterações na qualidade de água e no habitat. (Barbour *et al.* 1999). Estes

sistemas de monitorização, juntamente com a avaliação de variáveis microbiológicas (coliformes totais e fecais), constitui-se como ferramenta fundamental na classificação e enquadramento das massas de água em classes de qualidade de água e padrões de potabilidade e qualidade das águas balneares (Goulart & Callisto 2003).

A monitorização de variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação dos impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, tais como: identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água; deteção precisa da variável modificada e determinação destas concentrações alteradas. Entretanto este sistema apresenta, algumas desvantagens, tais como a descontinuidade temporal e espacial das amostragens. A amostragem de variáveis físicas e químicas fornece somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (Whitfield 2001). Em função da autodepuração e do fluxo unidirecional de sistemas lóticos, os efluentes sólidos carregados por drenagens pluviais para o interior de ecossistemas aquáticos podem ser diluídos (dependendo das concentrações e tamanho do rio) antes da data da colheita das amostras ou causarem poucas modificações nos valores das variáveis. Além disso, a monitorização física e química da água é pouco eficiente na deteção de alterações na diversidade de habitats e micro-habitats e insuficiente na determinação das consequências da alteração da qualidade da água sobre as comunidades biológicas (Goulart & Callisto 2003).

Por outro lado, as comunidades biológicas refletem a integridade ecológica total dos ecossistemas (ex. integridade física, química e biológica), integrando os efeitos dos diferentes agentes e fornecendo uma medida agregada dos impactos (Barbour *et al.* 1999). As comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos são compostas por organismos que apresentam adaptações evolutivas a determinadas condições ambientais e apresentam limites de tolerância a diferentes alterações das mesmas (Alba-Tercedor 1996). Desta forma, a monitorização biológica, constitui-se como uma ferramenta na avaliação das respostas destas comunidades biológicas a modificações nas condições ambientais originais (Goulart & Callisto 2003).

Em consequência, a utilização de indicadores biológicos apresentam a vantagem de refletir as condições existentes num período anterior ao da amostragem, enquanto os métodos tradicionais oferecem apenas uma visão da situação pontual do estado das águas no momento da amostragem. Dito de outro modo, mediante as análises físico-químicas da água retirada de um determinado ponto obtém-se uma imagem fixa (fotografia) da situação existente no momento em que foi retirada a amostra; pelo contrário, através do estudo de bioindicadores pode-se obter uma imagem retrospectiva (filme) do que sucedeu num período anterior. Existem vantagens económicas, uma vez que prestando atenção à relação custo/benefício, estes métodos resultam ser altamente vantajosos (Ohio EPA 1987; Brinkhurst 1993, in Alba-Tercedor 1994).

## ***1.2 Utilização de bioindicadores***

Bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição, indicam a magnitude de impactos ambientais num ecossistema aquático e na sua bacia de drenagem (Callisto & Gonçalves 2002). A sua utilização permite a avaliação integrada dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição. Além disso, a utilização de bioindicadores é mais eficiente do que medidas instantâneas de parâmetros físicos e químicos (ex. temperatura, pH, nível de oxigénio dissolvido, teores totais e dissolvidos de nutrientes, etc.) que são normalmente medidos no campo e utilizados para avaliar a qualidade das águas. A Agência de Controlo Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency – USEPA) e a Directiva Quadro Água da União Europeia (2000/60/CE) recomendam a utilização de bioindicadores como complemento às informações sobre a qualidade das águas (Callisto *et al.* 2010).

Na vigilância e controlo da contaminação, com base em organismos bioindicadores, existe um grande número de metodologias que utilizam uma ampla variedade de organismos: bactérias, protozoários, algas, macrófitos, macroinvertebrados, peixes, entre outros (De Pauw *et al.* 1992, in Alba-Tercedor 1996). As espécies indicadoras da qualidade ambiental poderão ser bem sucedidas como espécies individuais ou através da associação de espécies (Cook 1976 e Cairns 1983, in Caro & O’Doherty 1999). Em ambos os casos é importante que se saiba informação suficiente acerca da sua história natural, particularmente os efeitos ecológicos que afetam as taxas de crescimento das suas populações, uma vez que as alterações nas populações necessitam estar relacionados com fatores ambientais específicos (Pearson & Cassola 1992 e Kremen 1992 in Caro & O’Doherty 1999). Siemann *et al.* (1996) indica inclusivamente que, as espécies mais pequenas são mais bem-sucedidas como indicadores de qualidade ambiental dado serem mais sensíveis a perturbações ambientais, do que espécies maiores. Além disso, as espécies mais pequenas vulgarmente têm gerações com durações mais curtas, um atributo que as torna mais sensíveis aos efeitos da poluição ou perturbações ambientais, uma vez que os ciclos de vida dos juvenis serão mais frequentemente sujeitos a agressões ambientais (Blus *et al.* 1974, in Caro & O’Doherty 1999). Espécies com ciclos reprodutivos e taxas de crescimento populacionais rápidos, poderão demonstrar uma resposta mais rápida a situações de stress ambiental do que espécies com ciclos reprodutivos mais lentos. Espécies com elevadas taxas metabólicas – usualmente de menores dimensões – incorporam poluentes ambientais mais rapidamente do que espécies com taxas metabólicas mais baixas (Walker 1983 in Caro & O’Doherty 1999). As espécies tornam-se mais fáceis de monitorizar se tiverem grandes populações. Se tiverem um amplo alcance geográfico, poderão fornecer dados de tendências populacionais ou de perturbação do habitat, uma vez que a sua sobrevivência e reprodução num local poderá ser

extrapolada ao longo de uma larga área geográfica (Pearson 1995). Se as espécies estiverem restringidas a determinados habitats, irão fornecer informação específica acerca das alterações ambientais nesse habitat (Caro & O'Doherty 1999).

### ***1.3 Utilização de espécies invasoras como bioindicadores***

As invasões biológicas em habitats dulciaquícolas ocorrem acidentalmente ou através da introdução deliberada de organismos associados a aquacultura, pesca desportiva, transporte passivo através de barcos, fins ornamentais e através de canais e corredores abertos por humanos (Vilà & Garcia-Berthou 2010). Nos habitats dulciaquícolas europeus, são dados como introduzidas cerca de 296 espécies de invertebrados exóticos, maioritariamente crustáceos, e cerca de 136 espécies de peixes exóticos (Gherardi *et al.* 2009).

Um dos desafios conceptuais do estudo das invasões biológicas, consiste em entender se as espécies invasoras são condutoras da diminuição de biodiversidade ou uma consequência de outros mecanismos de degradação ambiental tais como a degradação do habitat ou poluição (Didham *et al.* 2005 in Vilà & Garcia-Berthou 2010). Em termos práticos, contudo, ambos os casos são bons motivos para monitorizar as espécies exóticas. Um aumento na abundância e área de distribuição de espécies exóticas poderá estar associado à degradação ambiental (Kennard *et al.* 2005 in Vilà & Garcia-Berthou 2010). Outra boa razão para escolher as espécies exóticas como espécies alvo de monitorização, consiste no facto de que as populações introduzidas não possuem, geralmente, qualquer valor conservacionista, mas sim o oposto. Para estudar ou monitorizar substâncias químicas perigosas, tais como pesticidas, ou metais pesados, que é obrigatório de acordo com diversas leis europeias, os organismos dulçaquícolas (geralmente peixes) necessitam de ser sacrificados. Para este fim, torna-se eticamente menos preocupante e mais prático, a utilização de espécies exóticas ao invés das espécies nativas (Vilà & Garcia-Berthou 2010).

As espécies que podem atuar como indicadores do estado dos ecossistemas oferecem então uma ferramenta valiosa na gestão dos recursos naturais. Várias espécies foram estudadas e sugeridas como indicadores biológicos da qualidade da água em habitats lóticos.

Nas últimas décadas, cientistas e gestores ambientais da Europa, têm demonstrado especial interesse nas espécies de lagostim, parcialmente devido ao drástico declínio das populações de espécies nativas (Vigneux & Souty-Grosset 2000), mas também devido à sua importância social e económica em vários países (Reynolds & Souty-Grosset 2003). Várias espécies de lagostim têm sido sugeridos como bioindicadores da qualidade da água na Europa e pelo menos uma espécie (*Austropotamobius pallipes*) tem sido estudada para determinar a sua tolerância à poluição e o seu potencial como bioindicador (Gallagher 2002, Demers & Reynolds 2003, Lyons & Kelly-Quinn 2003 e Trouilhé *et al.* 2003 in Demers *et al.* 2006). A maioria dos estudos



de campo, envolvem a análise química do conteúdo de metais nos tecidos dos lagostins, fornecendo pouca informação acerca das patologias derivadas da exposição a metais pesados (Dickson *et al.* 1979, Finerty *et al.* 1990, King *et al.* 1999, MacFarlane *et al.* 2000 e Rowe *et al.* 2001 in Geiger *et al.* 2005). Rainbow & White (1989) e Geiger *et al.* (2005) referem que, de facto, o lagostim é capaz de regular eficazmente a concentração de metais pesados nos seus tecidos e de remover alguns contaminantes dos seus órgãos internos e músculos, dependendo das suas necessidades fisiológicas. Esta ação é conseguida através de excreção (fezes) e/ou armazenamento no hepatopâncreas – considerado o órgão de acumulação de metais e desintoxicação (Alikhan *et al.* 1990; Anderson *et al.* 1997a,b; Naqvi *et al.* 1998) – branquias e exosqueleto (Anderson & Brower 1978; Naqvi *et al.* 1990; Wright *et al.* 1991). Estudos anteriores têm abordado a acumulação de contaminantes em tecidos de variedades de lagostim com diferentes concentrações e tempos de exposição, tanto no campo (Anderson & Brower, 1978: Pb em *Orconectes virilis*; Roldan & Shiver, 1987: Fe, Pb em *Orconectes propinquus*; Alikhan *et al.* 1990: Cu, Ni em *Cambarus bartoni*; Keenan & Alikhan 1991: Pb and Cd em *Cambarus bartoni*; Khan *et al.* 1995: Pb, Cd, Cu, Zn, Co, Ni, Hg em *Orconectes virilis*; Currie *et al.* 1998: Cd em *Orconectes virilis*; Schilderman *et al.* 1999: PCBs, PAHs, Zn, Cu, Pb, Cd em *Orconectes limosus*) como no laboratório (Alikhan *et al.* 1990: Cu, Cd, Fe, Mn, Ni, Zn em *Cambarus bartoni*; Meyer *et al.* 1991: Cu em *Cherax destructor*).

*P. clarkii* foi utilizado como bioindicador de contaminantes orgânicos em experiências realizadas em condições laboratoriais (Foster & Crosby 1986, Blat *et al.* 1988 e Barron *et al.* 1991 in Alcorlo *et al.* 2006) e de poluição por metais devido à capacidade de acumular metais (ex. chumbo e cádmio) nos seus tecidos, refletindo níveis ambientais desses metais (Dias-Mayans *et al.* 1986; Pastor *et al.* 1988; Devi *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1997b; Bollinger *et al.* 1997; in Alcorlo *et al.* 2006). Outras características também contribuem para que *P. clarkii* seja uma espécie modelo indicador (ex. populações abundantes, distribuição vasta e um estilo de vida relativamente sedentário) (Sánchez-López *et al.* 2004). Alcorlo *et al.* (2006) propõem a implementação da utilização de *P. clarkii* como espécie sentinela para monitorizar a saúde ambiental nos rios e zonas húmidas Mediterrânicas.

Um estudo realizado por Elia *et al.* (2006) refere que os índices bioquímicos observados em indivíduos de ambos os sexos de *P. clarkii* recolhidos do lago Trasimeno, não se relacionam com a presença de qualquer metal pesado analisado no hepatopâncreas. Este estudo conclui que as variações bioquímicas podem estar relacionadas com alterações nos fatores ambientais e biológicos, tais como a reprodução, a temperatura da água e o nível de profundidade do lago. Estas alterações bioquímicas poderão fornecer informações importantes de suporte para a implementação de programas de monitorização com base em biomarcadores, utilizando esta espécie de lagostim.

Suárez-Serrano *et al.* (2010) indicaram que *P. clarkii* representa uma espécie chave em quase todos os ecossistemas onde foi introduzido, sendo capaz de tolerar ambientes extremos e poluídos, acumulando toxinas nos seus tecidos. A sua posição central na cadeia alimentar aquática, torna esta espécie um potencial vetor de contaminantes para níveis tróficos superiores (Gherardi 2006). Devido a estas razões, *P. clarkii* demonstra um forte potencial como um efetivo bioindicador de poluição, ocorrendo frequentemente associado a sistemas muito perturbados (Ilhéu & Bernardo, 1993). Possui uma elevada tolerância a longos períodos secos (Henttonen & Huner 1999), adaptando-se a condições de hipoxia moderada (Demers *et al.* 2006), o que lhe permite ocupar uma ampla variedade de habitats tais como pântanos, rios, reservatórios, sistemas de irrigação e arrozais (Fishar 2006) assim como outros sistemas com baixos níveis de oxigénio e temperaturas elevadas (Oliveira & Fabião 1998).

#### ***1.4 Índices de Condição Corporal e fisiológica***

Os índices de condição corporal têm sido utilizados em diversas espécies como forma de avaliar os tratamentos aplicados em regimes de aquacultura e também a condição das populações de lagostim existentes no meio selvagem (Soofiani & Hawkins 1985). Foi demonstrada a existência de uma correlação entre o teor de humidade dos tecidos e o conteúdo em energia em peixes (Hartman & Brant 1995) e posteriormente também em lagostins (Jussila & Mannonen 1997) indicando possibilidade de avaliar a condição corporal dos organismos através da utilização de índices de teor de humidade nos tecidos e de índices somáticos.

O lagostim armazena grandes quantidades de energia no hepatopâncreas para o desenvolvimento dos ovos e para assegurar a sobrevivência durante o período que se encontra refugiado em tocas (Huner 1989). Devido a esta razão, o teor de humidade do hepatopâncreas pode ser utilizado como um bom indicador da condição corporal do lagostim (Lindqvist & Louekari 1975; Huner *et al.* 1985; Lowery 1988; McClain 1995a; Mazlum & Eversole 2000; Mazlum 2005).

O estudo destes índices em lagostins não tem sofrido grandes desenvolvimentos, em parte devido à dificuldade de avaliar a qualidade dos tecidos *in situ* ou assegurar a sua expedita e rigorosa conservação até ao laboratório. Dadas estas adversidades, tem-se utilizado em alguns estudos o peso do hepatopâncreas e o seu teor de humidade (Huner *et al.* 1985, 1990; Jarboe & Romaine 1995; McClain 1995a,b; Mannonen & Henttonen 1995; Jussila 1997a, b).

Outros estudos têm-se focado nos conteúdos proteicos e lipídicos do hepatopâncreas (Shafer 1968; Vogt *et al.* 1985; Schirf *et al.* 1987; Ackefors *et al.* 1997). Estes parâmetros têm sido utilizados para explicar os efeitos ambientais nas populações de lagostim (Mannonen & Henttonen 1995), as diferenças devido aos regimes alimentares aplicados na produção (McClain 1995a,b), ou diferenças relacionadas com os sistemas de produção (Jussila 1997a,b).

Endo & Kadoya (1991) avaliaram através da cromatografia, a cor do hepatopâncreas da espécie *Euphasia superba*, por forma a expressar a cor quantitativamente e compará-la com os teores de pigmentos de plantas, tendo verificado que a coloração do hepatopâncreas foram úteis para caracterizar as condições de alimentação desta espécie.

### ***1.5 O hepatopâncreas como elemento de avaliação da condição fisiológica do lagostim***

O hepatopâncreas localiza-se no cefalotórax, ocupando a maior parte do seu espaço, acima do intestino médio (Holdich & Reeve 1988). É uma estrutura trilobada com dois lóbulos projetados frontalmente e um terceiro lóbulo projetado para a parte posterior da carapaça (Huner & Barr 1991). Este órgão está em contacto próximo com a hemolinfa e está envolvido na síntese e excreção de enzimas digestivas (proteínases, peptidases, lipases e amilases), no metabolismo de lípidos e carboidratos, e no armazenamento de cálcio e de alguns metais pesados. Está ligado ao trato digestivo através de canais que guiam nutrientes para o seu interior e enzimas para o seu exterior. Os canais abrem para o intestino médio e os nutrientes, após terem sido cuidadosamente processados e convertidos em partículas finas no complexo sistema gástrico, são transportados ativamente para o hepatopâncreas através da contração coordenada da rede de músculos que revestem o hepatopâncreas (Jussila 1999). Uma representação esquemática pode ser observada na Figura 1.

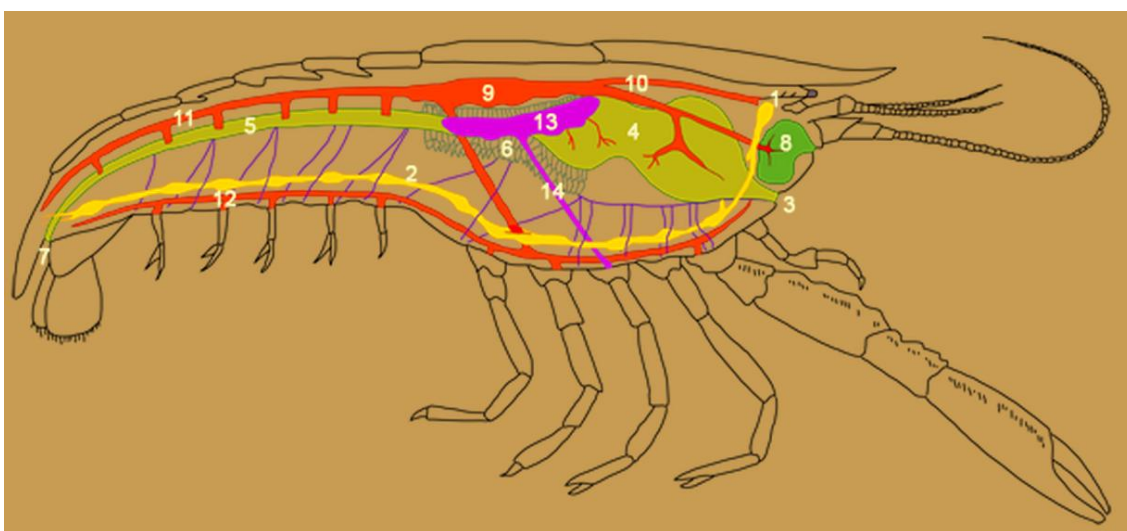


Figura 1 – Esquema morfológico interno de um Lagostim (Legenda: 1- Gânglio cefálico; 2- Nervo Central; 3 – Orifício bucal; 4. Estômago; 5 – Intestino; 6 – Hepatopâncreas; 7 – Orifício fecal; 8 – Glândula verde; 9 - Coração; 10 – Artérias anteriores; 11 – Artéria posterior; 12 – Artéria Ventral; 13 – Ovários; 14 – Oviduto). (Adaptado de Pârvulescu *et al.* 2009)

O hepatopâncreas é também a principal reserva energética no lagostim (Suprunovich *et al.* 1983; Huner *et al.* 1985) e foi demonstrado que as alterações no seu tamanho e teor de humidade são afetadas pela dieta alimentar (McClain 1995a, 199b). Mazlum (2005) observou que, à medida que as reservas energéticas dos tecidos do hepatopâncreas vão sendo esgotadas, os níveis de humidade nos tecidos aumenta. Num lagostim saudável, o hepatopâncreas pode ser responsável por 10-15% do teor de humidade da biomassa corporal (Mazlum 2005).

As concentrações lipídicas no hepatopâncreas de lagostins podem atingir 92% de matéria seca (Suprunovich *et al.* 1983), analogamente à gordura corporal nos insetos e ao tecido adiposo e fígado nos vertebrados (Ando *et al.* 1977). Num estudo realizado por Wen *et al.* (2007) em juvenis de *P. clarkii*, o índice hepatossomático decresceu significativamente após 50 dias de privação de alimento. A diminuição gradual do índice hepatossomático sugere que durante o período de privação de alimento, os lagostins utilizaram as reservas de gordura no hepatopâncreas e está em concordância com os trabalhos de Inui & Oshima (1966) e Steffens (1989). Neste mesmo estudo, durante o período de privação de alimento, as alterações nos lípidos e ácidos gordos no hepatopâncreas foram significativas, mas os lípidos e os ácidos gordos no músculo não sofreram alterações, o que indica que nos lagostins juvenis, o hepatopâncreas é o principal órgão responsável pelo metabolismo de ácidos gordos tal como sucede noutros crustáceos (Ando *et al.* 1977 e Wen *et al.* 2001 in Wen *et al.* 2007).

O ciclo anual do lagostim, crescimento e muda, pode ser caracterizado por alterações no conteúdo energético do hepatopâncreas (Speck & Urich 1969; Huner *et al.* 1990). Van der Ham & Huner (2006) verificaram que durante o período da Primavera, as fêmeas de *P. clarkii*, apresentam um aumento do conteúdo energético no hepatopâncreas, enquanto, que no final do Verão e durante o Outono, o conteúdo energético diminui.

Os índices hepatossomáticos têm sido utilizados com sucesso para estimar as diferenças nas taxas de crescimento nas populações de lagostas selvagens da costa oeste (*Jasus lalandii*) e para descrever as diferenças na condição corporal das populações de lagostas da rocha (*Jasus edwardsii*) sob diferentes regimes alimentares (Cockcroft 1997; Musgrove 1997). Em ambos os estudos, o índice hepatossomático e o teor de humidade do hepatopâncreas, analisados em conjunto, foram úteis para descrever a condição das lagostas.

O volume do hepatopâncreas, especialmente quando está relacionado com baixo teor de humidade no órgão, poderá ser tido em consideração como sendo um indicador do bom estado de condição corporal do lagostim. Vários estudos demonstraram que os índices hepatossomáticos podem ser úteis, se forem utilizados em conjunto (McClain, 1995a, b; Musgrove 1997). Além disso, os índices hepatossomáticos podem ser utilizados como índices de condição corporal de lagostins obtidos a partir do ambiente natural (Mannonen & Henttonen 1995) ou a partir de sistemas de aquacultura semi-intensivos (McClain 1995a, b) em que se realizam comparações entre grupos que habitam ambientes semelhantes (Jussila 1999).

## 2 Metodologia

Esta secção descreve os métodos desenvolvidos no presente estudo. Este trabalho é composto por duas fases distintas: uma fase experimental em que se realizou um ensaio laboratorial em condições controladas de oxigénio, por forma a avaliar as respostas eco-fisiológicas dos indivíduos com base nos índices de condição corporal e hepatossomáticos (teor de humidade e coloração do hepatopâncreas) quando sujeito a condições de hipoxia; a segunda fase deste trabalho consiste na análise da condição corporal e hepatossomática de indivíduos provenientes de massas de água com diferentes condições ambientais, nomeadamente degradação.

### *2.1 Ensaio laboratorial em condições controladas de oxigénio*

A primeira fase do estudo decorreu durante 60 dias, em sala de experimentação biológica, climatizada e com fotoperíodo (8 horas de luz). Foram utilizados 26 lagostins adultos, da espécie *Procambarus clarkii* (Girard 1852), em fase intermuda, repartidos entre 13 fêmeas e 13 machos (ver Tabela 1, capítulo 2.1.3), previamente coletados na Ribeira de Valverde e no Rio Guadiana, tendo sido aclimatados às condições experimentais, cerca de 2 meses antes da realização do estudo, por forma a evitar o efeito da origem de captura na resposta às condições experimentais.

Todos os indivíduos selecionados foram identificados individualmente com três marcas no cefalotórax, utilizando para o efeito vernizes de diferentes cores (Figura 2). Para cada indivíduo foi atribuída uma combinação de cores diferente, de forma a não haver repetições e facilitar a sua identificação visual.



Figura 2 – Exemplar identificado com as repectivas marcas no cefalotórax.

### **2.1.1 Desenho Experimental**

Para a realização da experiência, foi montado em laboratório um sistema com catorze réplicas, 7 réplicas de controlo (condições de oxigénio dissolvido – OD, dentro dos limites de conforto – aproximadamente entre 8 e 10 mg/L) e 7 réplicas de tratamento (condições de hipoxia moderada – aproximadamente entre 3 e 5 mg/L OD), devidamente preparados com substrato (cascalho). Cada aquário apresentava uma profundidade de aproximadamente 30 cm e 37 litros de volume de água, tendo sido isolado hermeticamente, com uma placa de esferovite, coberta por rede, na face de contacto com a água. Cada réplica estava provida de um orifício fechado com tampa de rosca, que era aberto para efeitos de alimentação e manipulação individual, e um outro orifício, devidamente isolado, sendo utilizado apenas para a colocação de difusores de oxigénio. Imagens do esquema de montagem descrito anteriormente podem ser observadas nas figuras 3 e 4.





Figura 3 – Imagem de umas das réplicas (neste caso do grupo de controlo)

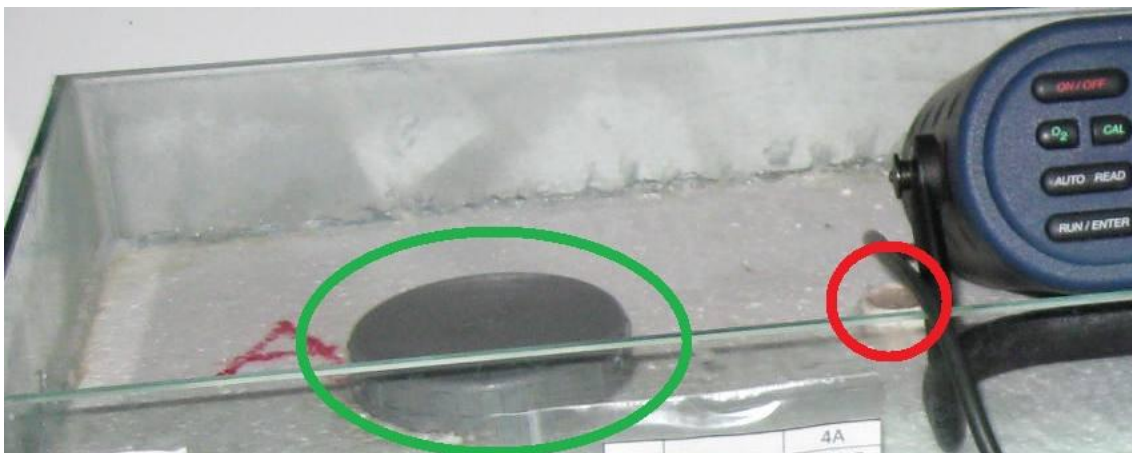


Figura 4 – Imagem da tampa dos aquários com a identificação dos respectivos orifícios: a verde o orifício para efeitos de alimentação e manipulação individual; a vermelho o orifício utilizado para a colocação dos difusores de oxigénio.

Os indivíduos foram distribuídos pelos aquários, tendo-se mantido constante a biomassa animal por réplica (biomassa média de aprox. 60g) e entre os grupos de controlo (Normoxia) e tratamento (Hipoxia) (ver Tabela 1, capítulo 2.1.3). O comprimento e peso médio de machos e fêmeas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de normoxia e hipoxia. Considerou-se também o sexo e a origem de cada indivíduo, pelo que, em cada réplica,

agrupou-se um macho e uma fêmea, de modo a que, o “sex-ratio” fosse igual em todas as réplicas, ou seja, razão de 1:1.

Todos os indivíduos foram alimentados *ad libitum* intercalando-se a distribuição de cenoura e pota, e removendo o excedente, não consumido, de 3 em 3 dias.

## **2.1.2 Monitorização dos parâmetros ambientais**

Seguindo um protocolo de monitorização, de 12 em 12 horas foram efetuadas medições diárias dos níveis de oxigénio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) com o auxílio de um oxímetro, do modelo Profiline Oxi 197 da marca WTW, cuja sonda é do modelo Cellox325 da marca WTW. Durante o decorrer da experiência, registaram-se valores de temperatura da água com um mínimo de 15,6°C e um máximo de 17,1°C.

Nas réplicas do grupo de hipoxia, a entrada de oxigénio era controlada de forma a manter condições hipoxia moderada, acima dos níveis críticos de sobrevivência. A manutenção destes valores, foi realizada através de monitorização horária dos níveis de oxigénio dissolvido. A quantidade de oxigénio disponibilizado ao longo da experiência manteve-se relativamente constante ao longo da experiência; no grupo de normoxia, os valores de OD variaram entre 8,5mg/L (mínimo disponível por dia) e 9,85 mg/L (máximo disponível por dia) e no grupo de hipoxia variaram entre os 3,18 mg/L (mínimo disponível por dia) e 4,65 mg/L (máximo disponível por dia). Nos últimos 3 dias da realização da experiência, os indivíduos do grupo de hipoxia foram submetidos a concentrações de oxigénio inferiores a 1,5 mg/L, por um período de 48 horas, por forma a avaliar o padrão de sobrevivência em condições de hipoxia extrema.

Os valores de pH, temperatura, condutividade, amónia e nitritos foram idênticos entre réplicas e constantes ao longo do período de estudo, tendo sido monitorizados semanalmente durante o decorrer da experiência.

Os níveis de pH foram obtidos com o auxílio do aparelho medidor universal modelo MultiLine P4 da marca WTW, com as sondas modelo pH-Electrode Sem Tix 41, da marca WTW. A condutividade foi medida com a sonda do modelo Tetracon®325, da marca WTW. Os valores de pH variaram entre 6,1 e 8,4 e para a condutividade registaram-se valores entre os 210 e os 370 µS/cm.

O teor de amónia e nitritos foram determinados através de kits de teste de amónia e nitritos da marca Waterlife. A amplitude do kit de amónia é de 0 a 10 mg/L, sendo que se o valor fosse igual ou superior 2mg/L efetuava-se a mudança de água do aquário. A amplitude do teste de nitritos é de 0 a 15 mg/L, quando o valor fosse igual ou superior a 5mg/L realizava-se a mudança da água, tendo o cuidado em repor rapidamente os níveis de oxigénio de acordo o desenho da experiência.



### 2.1.3 Parâmetros biológicos

No início e no final do ensaio, os indivíduos foram pesados e medidos. As pesagens realizaram-se com o auxílio da balança Spider 1-6 da marca Mettler Toledo. A medição do comprimento foi realizada com o auxílio de uma craveira. Esta medição foi realizada desde o acúmen do rostro até ao final do telson.

Tabela 1 - Caracterização dos parâmetros biológicos nos grupos de hipoxia e normoxia no início do ensaio (Med - média, DP – Desvio Padrão, Min - mínimo, Max - máximo)

Grupo	Sexo	Comprimento (cm)				Peso (g)			
		Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max
Hipoxia	M	9,20	0,75	8,2	10,2	26,28	7,55	17,0	37,0
	F	10,29	1,32	8,2	12,0	33,93	13,88	16,0	53,5
Normoxia	M	9,54	0,69	8,2	10,3	31,93	6,93	22,5	42,5
	F	9,50	1,12	8,5	10,9	27,14	10,46	11,5	42,5

Com base nestes parâmetros foi calculado o incremento de comprimento e peso dos indivíduos assim como o índice de condição corporal, utilizando para tal o seguinte algoritmo:

$$ICC = (P_v / C^3) \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde ICC = índice de condição corporal;  $P_v$  = Peso vivo (g); C = Comprimento total (cm)

Após o término da experiência sacrificaram-se todos os indivíduos em estudo. Verificou-se qual o estado de maturação sexual das fêmeas e procedeu-se à extração do hepatopâncreas de todos os indivíduos. Após a extração do hepatopâncreas de cada indivíduo de acordo com o protocolo experimental definido para o efeito (ver anexos), este órgão, foi posteriormente pesado em fresco com o auxílio de balança de precisão (Precisa 40SM-200A). O peso seco do hepatopâncreas foi obtido através da secagem em estufa a 60° C durante 24 horas. O índice hepatossomático foi calculado através do seguinte algoritmo:

$$IH = [(P_{hst} / 1000) / P_v] \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde IH = Índice hepatossomático;  $P_{hst}$  = Peso do hepatopâncreas seco total;  $P_v$  = Peso vivo (g)

Ainda em fresco, procedeu-se à avaliação da cor deste órgão, tendo como base comparativa a carta de cores de solos de Munsell (Macbeth 1992). Esta última avaliação consiste na

comparação de três parâmetros: a cor, o valor e o chroma. Verificaram-se três Siglas diferentes: 2.5Y, 5Y e 10YR, cada uma com os correspondentes chromas e cores. Dada a elevada variabilidade da coloração observada nos hepatopâncreas do lagostim (Tabela 2), tornou-se necessário uniformizar o sistema de cor de forma a facilitar a análise deste parâmetro. Foi criada uma escala de cor com 4 classes de tonalidade de cor (Tabela 2 e 3), que variou de 1 (mais claro) para 4 (mais escuro)

Tabela 2 – Gama de cores observadas de acordo com a escala de Munsell e a respectiva classe atribuída

Cor	Sigla	Chroma	Classe
Yellow	2.5Y	8./6	1
Yellow		8./8	2
Yellow		7./6	1
Yellow		7./8	2
Olive Yellow		6./6	3
Olive Yellow		6./8	3
Olive Brown		4./4	4
Olive Yellow	5Y	8./6	1
Yellow		7./6	2
Pale Yellow		7./4	1
Olive Yellow		6./6	3
Pale Olive		6./4	3
Olive		5./6	4
Olive		5./4	4
Olive	4./4	4	
Very Pale Brown	10YR	8./4	1
Yellow		8./6	1
Yellow		8./8	2
Very Pale Brown		7./4	2
Yellow		7./6	2
Yellow		7./8	2
Brownish Yellow		6./8	3

Tabela 3 – Sistema de Classificação da coloração do hepatopâncreas de lagostim

Classe	Designação
1	Yellow
2	Olive yellow
3	Brownish yellow
4	Very pale brown

## ***2.2 Condição corporal e hepatossomática de lagostins provenientes de diferentes massas de água***

A segunda fase consistiu no processamento e análise, em laboratório, de indivíduos oriundos de diversos sistemas aquáticos com diferentes condições ambientais, particularmente em termos de degradação.

### **2.2.1 Área de estudo**

Nesta fase do estudo foram selecionados 12 massas de água (rios e canais) das Bacias Hidrográficas dos rios Tejo, Sado e Guadiana com diferentes níveis de pressão ambiental, de forma a tentar obter uma elevada variabilidade relativamente às condições de degradação ambiental.

As capturas foram realizadas durante a Primavera, entre Abril e Maio de 2010, tendo o número de indivíduos viáveis capturados para o presente estudo, sido variável consoante a população existente em cada local, resultando num total de 91 indivíduos, dos quais 39 eram machos e 52 eram fêmeas.

Aplicaram-se três técnicas de recolha, de acordo com as características dos locais. Nos locais menos profundos utilizou-se a técnica de pesca elétrica e arrasto com camaroeiro. Em locais mais profundos, nos quais se regista baixa eficácia das técnicas anteriormente referidas, optou-se pela colocação de armadilhas do tipo covo. Uma imagem do tipo de armadilha utilizado pode ser observada na Figura 4.



Figura 4 – Imagem das armadilhas do tipo covo, utilizadas para a captura de lagostins.

Após a sua recolha, os indivíduos foram imediatamente colocados em malas térmicas com gelo picado, de forma a baixar o metabolismo dos animais e a conservá-los em bom estado durante o transporte até ao laboratório, onde eram imediatamente processados.

### **2.2.2 Parâmetros ambientais**

Em todos os locais de amostragem procedeu-se à medição e registo dos parâmetros físico-químicos: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH, oxigénio dissolvido ( $\text{mg/L}$ ), condutividade ( $\mu\text{S/m}$ ) e disco de Secchi ( $\text{cm}$ ).

A avaliação das pressões antropogénicas foi realizada em cada local e de acordo as seguintes variáveis: Uso do solo, Área Urbana, Zona Ripária, Carga de Sedimento, Regime Hidrológico, Acidificação e Toxicidade, Condição Morfológica, Contaminação Orgânica/Nutrientes, Massas de água lânticas/artificiais. Todas as variáveis foram pontuadas numa escala de classes entre 1 e 5 (1 – pouco ou nada perturbado; 5 – muito perturbado), sendo a pressão total o somatório das pontuações atribuídas a cada variável, que irá traduzir o nível global de perturbação antropogénica de cada local. Posteriormente, com base nestas variáveis e nos parâmetros físico-químicos, sobretudo oxigénio dissolvido e condutividade, com base na classificação da qualidade da água para usos múltiplos pelo Instituto Nacional da Água (<http://snirh.inag.pt>) foi atribuída um nível final de degradação a cada local, baseado em 4 classes (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação do nível de degradação ambiental dos locais de estudo

<b>Classe de degradação ambiental</b>	<b>Designação do estado</b>
1	Bom
2	Moderado
3	Medíocre
4	Mau

Complementarmente, as variáveis de habitat foram obtidas *in situ* durante o período de amostragem, nas quais se incluem: Largura média do troço (m), profundidade média da água, velocidade da corrente média e máxima ( $m.s^{-1}$ ), transparência da água, avaliada através do Disco de Secchi, substrato dominante (adotando a escala Wentworth – Giller & Malmqvist, 1998: 1- vasa; 2- areia; 3- cascalho; 4- pedras; 5- blocos e lajes), tipo de vegetação aquática (hidrófitas, helófitas e briófitas) (%), disponibilidade de detritos (%) ensombramento (%) e proporção dos vários tipos de meso-habitat (*pool*, *riffle* e *run*). O comprimento do troço amostrado foi definido como 20 vezes a largura média do curso, num máximo de 150 m.

### **2.2.3 Parâmetros biológicos**

Os Indivíduos capturados foram medidos e pesados individualmente e foi determinado o respetivo género. Dada a presença considerável de fêmeas capturadas, assinalou-se também a presença de fêmeas ovigeras. As pesagens realizaram-se com o auxílio da balança Spider 1-6 da marca Mettler Toledo. A medição do comprimento foi realizada com o auxílio de uma craveira. Esta medição foi realizada desde o acúmen do rostró até fim do télson. Com base nestes parâmetros foi também calculado o índice de condição corporal, utilizando para tal a Equação 1. Logo após o registo dos parâmetros anteriormente descritos, procedeu-se à extração do hepatopâncreas de cada indivíduo de acordo com o protocolo experimental definido para o efeito (ver anexos). Cada órgão foi posteriormente pesado em fresco com o auxílio de balança de precisão (Precisa 40SM-200A). Posteriormente estimou-se o peso seco de cada órgão através do processo de liofilização, com o auxílio do Liofilizador (Edwards Freeze Dryer Modulyo), no qual as amostras permaneceram 72 horas até estarem completamente liofilizadas. O índice hepatossomático foi calculado com base na Equação 2.

A avaliação da cor do hepatopâncreas de lagostim foi realizada utilizando o método descrito na primeira fase deste estudo.

### ***2.3 Tratamento de dados e análise estatística***

Para testar diferenças entre os grupos de indivíduos provenientes de diferentes tratamentos e locais, efetuaram-se testes estatísticos não paramétricos. Os testes estatísticos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para testar diferenças entre grupos de indivíduos dos vários locais relativamente aos parâmetros: peso, comprimento, índice de condição corporal, índice hepatossomático, O teste de Friedman foi utilizado para testar diferenças nas gamas de cor do hepatopâncreas. Foi ainda realizada análise de correlação de Spearman entre os diferentes índices biológicos e estes e as variáveis ambientais. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ . Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do “software” Statistica 7.0.

## 3 Resultados

### 3.1 Ensaio em condições ambientais controladas

#### 3.1.1 Sobrevivência, crescimento e resposta fisiológica do Lagostim em condições de hipoxia

Ao longo de toda a experiência e à exceção de um indivíduo, cuja causa de morte se associou a interações agressivas entre indivíduos, apenas se observou mortalidade no final do ensaio quando, durante os últimos 3 dias do período experimental, os valores de oxigénio foram mantidos abaixo de 1,5 mg/L, tendo-se registado uma taxa sobrevivência zero apenas quando a concentração de OD foi inferior a 0,2 mg/L. Não se observaram diferenças no padrão de mortalidade de fêmeas e machos.

Apesar de, no início da experiência, não se registar diferenças significativas no comprimento e peso inicial para indivíduos do mesmo género entre os grupos hipoxia e normoxia, o comprimento médio final dos indivíduos do grupo de hipoxia foi significativamente ( $P \leq 0,05$ ) superior ao comprimento médio do grupo de normoxia (Tabela 5). O grupo de indivíduos do controlo registou também o menor valor de comprimento mínimo (8,05 cm), enquanto o grupo de tratamento registou o valor mais elevado de comprimento (12,6 cm). O peso médio final dos indivíduos do grupo de tratamento foi também superior ao peso médio do grupo de controlo, embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ).

Tabela 5 – Caracterização biométrica dos indivíduos nos grupos de hipoxia e normoxia após o término do ensaio (Med – média, DP – desvio padrão, Min – Mínimo, Max – máximo, n.a – não se aplica)

Grupo	Sexo	Comprimento (cm)				Peso (g)				% Fêmeas Ovíferas
		Med	DP	Min	Max	Med	DP	Min	Max	
Hipoxia	M	10,0	1,33	8,2	12,0	35,2	10,4	23,5	53,5	n.a
	F	10,8	1,29	8,7	12,6	36,9	12,1	14,3	55,6	80%
Normoxia	M	9,6	0,84	8,0	10,9	30,1	9,0	11,5	42,5	n.a
	F	9,8	0,82	8,1	10,8	30,1	8,0	16,8	44,5	60%

No grupo normoxia, os indivíduos apresentaram um incremento de peso de 9,52 % ( $\pm 0,21$  DP) relativamente aos valores inicialmente registados, enquanto que o incremento no grupo hipoxia foi de 6,54 % ( $\pm 0,81$  DP), embora não se tenham evidenciado diferenças

estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). No grupo normoxia, as fêmeas apresentaram um incremento médio de peso significativamente maior ( $P < 0,001$ ) que os machos, não se tendo registado o mesmo no grupo hipoxia.

Dado no término deste ensaio se ter verificado a ocorrência de fêmeas ovígeras, registou-se também este parâmetro que, como se poderá observar na tabela 5, foi bastante elevado em ambos os grupos, com particular destaque para o grupo de tratamento.

O índice de condição corporal (ICC) do grupo normoxia foi o que apresentou maiores variações entre indivíduos tendo-se registado um valor médio mais elevado relativamente ao grupo de hipoxia (Tabela 6) embora sem diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Relativamente ao índice hepatossomático, registou-se elevada variabilidade tanto entre indivíduos do mesmo grupo como entre tratamentos. O valor médio mais elevado deste índice foi observado no grupo de hipoxia, embora sem diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). Não se observou qualquer correlação significativas entre o índice hepatossomático e o índice de condição corporal quer para a totalidade dos indivíduos quer dentro dos grupos.

Tabela 6 – Índice corporal (ICC) e índice hepatossomático (IH) dos indivíduos nos grupos hipoxia e normoxia (Med – média, DP – desvio padrão)

Grupo	ICC		IH	
	Med	DP	Médio	Desvio Padrão
Hipoxia	2,85	0,46	4,28	1,01
Normoxia	3,15	0,60	4,06	1,28

Relativamente ao parâmetro coloração do hepatopâncreas (Tabela 7) observou-se uma grande variabilidade de cores. As cores da sigla 2.5Y foram observadas em 12% do total dos indivíduos do estudo. A cor que mais se verificou foi Olive Yellow (chroma 6/8) observada em 8% dos indivíduos, sendo representada pela classe 3. As cores da sigla 5Y foram observadas em 88% do total dos indivíduos do estudo. A cor predominante desta sigla foi Olive Yellow (6/6), observada em 40% da amostra. Relativamente à classificação de cor atribuída, esta sigla registou cores de todas as classes. Observando a Tabela 7, pode-se verificar que a coloração do hepatopâncreas dos indivíduos em estudo, distribuíram-se essencialmente pelas classes 3 e 4 (76%).



Tabela 7 – Caracterização do parâmetro cor na totalidade dos indivíduos em ensaio

Cor	Sigla	Chroma	N	%	Código de Cor Atribuído (1 -mais claro; 4 - mais escuro)
Olive Brown	2.5Y	4/4	1	4%	4
Olive Yellow	2.5Y	6/8	2	8%	3
Olive	5Y	4/4	2	8%	4
Olive	5Y	5/4	1	4%	4
Olive	5Y	5/6	3	12%	3
Pale Olive	5Y	6/4	1	4%	2
Olive Yellow	5Y	6/6	10	40%	3
Olive Yellow	5Y	6/8	1	4%	1
Pale Yellow	5Y	7/4	1	4%	2
Yellow	5Y	7/6	3	12%	1

A coloração do hepatopâncreas apresentou-se distribuída de um modo desigual entre tratamentos (Tabela 8). Os indivíduos do grupo normoxia apresentaram predominantemente a classe 3 e uma maior heterogeneidade de classes relativamente aos indivíduos submetidos a hipoxia, embora sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ). Verificou-se que os indivíduos que apresentaram maiores índices corporais, apresentam classes de cor tendencialmente mais claras, e as mais escuras, corresponderam a situações inversas.

Tabela 8 – Coloração do hepatopâncreas observada em indivíduos de ambos os grupos normoxia e hipoxia

Grupo	Classe de Cor (1 -mais claro; 4 - mais escuro)	N	%
Normoxia	1	2	15,4%
	2	2	15,4%
	3	6	46,1%
	4	3	23,1%
Hipoxia	1	2	16,7%
	2	0	0%
	3	9	75%
	4	1	8,3%

## ***3.2 Condição corporal e hepatossomática do Lagostim em massas de água com diferentes condições ambientais***

### **3.2.1 Caracterização ambiental das massas de água**

#### **3.2.1.1 Parâmetros morfométricos e biofísicos**

Das massas de água em estudo, 5 pertenciam à bacia hidrográfica do Rio Sado (Peramanca jusante, Ponte do Galo, Ribeira das Alcáçovas jusante, Ribeira de Valverde, Rio Xarrama), 4 pertencem à bacia hidrográfica do Rio Guadiana (Herdade da Negaça, Machede, Pecena e Ribeira de Borba montante) e 3 pertencem à bacia hidrográfica do Rio Tejo (Almansor, Ribeira de Almadafe e Paúl de Magos) (Tabela 9). Todos os locais à exceção do Paúl de Magos, são cursos de água. O Paúl de Magos constitui uma vala de arrozal, representando uma massa de água com um elevado grau de artificialização, embora com características próximas dos sistemas lóticos.

Tabela 9 – Rede hídrica das estações amostradas e respetiva bacia

<b>Código de Estação</b>	<b>Estação</b>	<b>Bacia</b>
R.FRE	Ribeira do Freixo	Guadiana
R.MAC	Ribeira de Machede	Guadiana
R.PEC	Ribeira Pecena	Guadiana
R.BOR	Ribeira de Borba	Guadiana
R.PER	Ribeira de Peramanca	Sado
R.ALC1	Ribeira das Alcáçovas1	Sado
R.ALC2	Ribeira das Alcáçovas2	Sado
R.VAL	Ribeira de S. Brissos	Sado
R.XAR	Rio Xarrama	Sado
R.ALM	Rio Almansor	Tejo
R.ALF	Ribeira de Almadafe	Tejo
PMAG	Paúl de Magos	Tejo

Relativamente à caracterização física das estações representada na Tabela 10, a estação Rio Xarrama (R.XAR) foi a que apresentou a maior largura de curso e a Ribeira do Freixo (R.FRE) a menor. A estação rio Xarrama (R.XAR) apresentou também a maior profundidade média e máxima. A velocidade de corrente, foi nula nas estações Ribeira do Freixo (R.FRE), Machede

(R.MAC) e Paúl de Magos (PMAG) e os valores mais elevados observaram-se nas estações Ribeira das Alcáçovas (R.ALC1 e R.ALC2). O tipo de substrato dominante foi da classe 1 e 2 (vasa e areia) na generalidade das estações, tendo a Ribeira de Borba (R.BOR), Valverde (R.VAL) e Almadafe (R.ALF) apresentado substratos de maior granulometria (Tabela 10). A percentagem de pedras revelou-se bastante elevada no troço da Ribeira de Almadafe (R.ALF) (90%) e bastante baixa no troço da Ribeira de Machede (R.MAC) (5%); as estações que apresentam maior percentagem de habitat de tipo Pool (corrente zero) foram as estações Ribeira do Freixo (R.FRE), Paúl de Magos (PMAG) e Ribeira de Valverde (R.VAL), tendo as restantes apresentado dominância de habitat com corrente.

Tabela 10 – Características morfométricas e de habitat das estações amostradas  
(Classificação do substrato dominante: 1- vasa; 2- areia; 3- cascalho; 4- pedras; 5- blocos e lajes)

Estação	Largura média do troço (m)	Profundidade (m)		Vel. Corrente (m/s)		Substrato dominante	Pedras %	Tipo de mesohabitat		
		Média (m)	Máxima (m)	Média (m/s)	Máxima (m/s)			Pool %	Run %	Riffle %
R.FRE	3	0,3	0,4	0	0	2	30	100	0	0
R.MAC	2,5	0,3	0,5	0	0	2	5	5	60	35
R.PEC	5	0,5	1,2	0,5	0,74	2	40	10	80	10
R.BOR	3	0,5	1	0,2	0,4	3	20	20	5	75
R.PER	3,5	0,3	0,6	0,14	0,25	2	10	10	30	60
R.ALC1	9	0,7	1,2	0,8	1,2	1	40	5	60	35
R.ALC2	9	0,7	1,2	0,8	1,2	1	40	5	60	35
R.VAL	4	0,3	0,6	0,17	0,50	4	40	60	20	20
R.XAR	25	1,2	2,5	0,45	0,8	1	20	10	75	15
R.ALM	4	0,4	0,9	0,2	0,4	2	40	20	60	20
R.ALF	4	0,7	1,5	0,2	0,5	5	90	0	100	0
PMAG	1	0,15	0,4	0	0	1	30	100	0	0

No que respeita às características relacionadas com a vegetação aquática (Tabela 11) verifica-se que as Estações Valverde (R.VAL) e Paúl de Magos (PMAG) são os locais onde esta componente tem menor expressão. As restantes estações apresentaram, níveis intermédios de vegetação, destacando-se as Ribeiras de Peramanca (R.PER) e de Almadafe (R.ALF) por terem sido as estações que apresentaram mais vegetação e com maior variedade. Quanto à presença de hidrófitas, observou-se maior ocorrência nas estações Ribeira de Borba (R.BOR), Peramanca (R.PER), Valverde (R.VAL), Xarrama (R.XAR), Almansor (R.ALM) e Almadafe (R.ALF). A presença de Helófitas revelou-se mais abundante na Ribeira de Almadafe (R.ALF). A presença de detritos lenhosos revelou-se mais abundante nas Ribeiras de Machede (R.MAC) e de Peramanca (R.PER).

Ao nível do ensombramento, este revelou-se nulo nas estações Almadafe (R.ALF) e Paúl de Magos (PMAG) e os valores mais elevados foram verificados nas Ribeiras de Machede (R.MAC) e Alcáçovas (R.ALC1 e E.ALC2).

Tabela 11 – Características biofísicas as estações amostradas

Estação	Hidrófitas		Helófitas	Detritos lenhosos	Ensombramento %
	Abundância	Tipo			
R.FRE	Intermédias	Plantas Superiores	Esparsa	Ausentes	60
R.MAC	Ausentes	-	Esparsas	Abundantes	30-60
R.PEC	Ausentes	-	Esparsas	Esparsas	40
R.BOR	Intermédias	Algas filamentosas	Esparsas	Esparsas	20
R.PER	Intermédias	Algas filamentosas; Briófitos; Plantas superiores	Intermédias	Abundantes	10
R.ALC1	Esparsas	Plantas superiores	Esparsas	Intermédias	30-60
R.ALC2	Esparsas	Plantas superiores	Esparsas	Intermédias	> 60
R.VAL	Esparsas	Algas filamentosas; Musgos; Fanerogâmicas	Esparsas	Intermédias	<30
R.XAR	Esparsas	Algas filamentosas	Intermédias	Ausentes	<30
R.ALM	Abundantes	Algas filamentosas; Musgos	Esparsas	Intermédias	30-60
R.ALF	Intermédias	Algas filamentosas; Briófitos; Plantas superiores	Abundantes	Esparsas	0
PMAG	Ausentes	-	Ausentes	Ausentes	0

### 3.2.1.2 Parâmetros físico-químicos

Verificou-se uma grande variabilidade nos valores de temperatura entre as várias estações (Tabela 12). A estação que apresenta o valor de temperatura mais baixo é a estação Ribeira de Borba (15°C) e a estação que apresenta o valor de temperatura mais elevado é a estação Ribeira do Freixo (26,1°C). No geral, as estações que apresentam temperaturas mais elevadas, são também as que apresentam valores de condutividade mais elevados, à exceção das estações Ribeira de Borba (Temperatura 15°C; Condutividade 734µs/cm) e Ribeira de Almadafe (Temperatura 19,5°C; Condutividade 1150µs/cm). Relativamente aos valores de oxigénio dissolvido (OD), verifica-se que os valores mais elevados se observam nas estações com menores valores de temperatura e condutividade i.e. Pecena, Peramanca e Valverde. Contudo o inverso não se verifica, uma vez que as estações com valores de temperatura mais elevados não apresentam os menores valores na concentração de OD. Salienta-se a estação Paúl de Magos como aquela que apresenta condições de hipoxia apresentando um valor muito baixo de OD (2,8 mg/L). O mesmo sucede com os valores de pH, em que a estação Paúl de Magos apresenta também um valor muito baixo (Tabela 12). As restantes estações apresentam valores de pH entre os 7,3 e 8,7, sendo que as estações Ribeira do Freixo, Ribeira de Borba e Ribeira de Almadafe, são as únicas que apresentam valores superiores a 8. Relativamente ao grau de transparência da água, avaliada através do disco de Secchi, a generalidade das estações apresentou valores relativamente baixos neste parâmetro, indicando baixa transparência da água.

Tabela 12 – Temperatura (°C), oxigénio dissolvido - OD (mg/L), pH, condutividade (µs/cm) e disco de secchi (cm) das estações amostradas

Estação	T (°C)	OD (mg/L)	pH	Cond. (µs/cm)	Secchi (cm)
R.FRE	26,1	7,4	8,7	761	0,3
R.MAC	20,1	6,9	7,3	645	0,25
R.PEC	18,5	12,9	7,3	342	0,4
R.BOR	15,0	9,5	8,2	734	0,1
R.PER	19,0	13,4	7,7	362	0,2
R.ALC1	16,5	8,9	7,6	278	0,3
R.ALC2	17,1	9,1	7,4	285	0,2
R.VAL	17,1	11,8	7,5	320	0,3
R.XAR	19,5	8,5	7,3	445	0,4
R.ALM	17,8	10,7	7,3	419	0,3
R.ALF	19,5	8,3	8,0	1150	0,1
PMAG	24,1	2,8	6,6	580	0,15

Relativamente aos parâmetros da Tabela 12, pode-se verificar que as estações que apresentam percentagens de ensombramento elevadas (ver Tabela 11), refletem valores de temperatura mais

baixos, à exceção da estação Ribeira do Freixo. As estações caracterizadas por tipos de meso habitat com água corrente e velocidade de corrente mais elevada (ver Tabela 10), apresentam, consequentemente, valores de OD mais elevados.

### 3.2.1.3 Pressão Antropogénica

Tal como se pode observar na Tabela 13, também nas pressões antropogénicas se verifica uma grande variabilidade entre estações. Analisando a pontuação obtida em cada uma das variáveis de pressão, destacam-se as estações Alcáçovas1 (R.ALC1) e Paúl de Magos (PMAG) como as que atingem os valores mais elevados em todas as variáveis, representando as estações sujeitas a maiores pressões antropogénicas. As estações com menores pressões globais foram as Ribeiras de Valverde (R.VAL), Peramanca (R.PER) e Pecena (R.PEC). As restantes estações apresentaram valores de pressão moderada a elevada.

Tabela 13 – Pontuação individual para cada estação segundo as Variáveis do Projecto FAME (FAME, 2004) (Legenda: US – Uso de solo; AU – Área Urbana; ZR – Zona riparia; CM – Condição morfológica; CS – Carga sedimento; CO – Contaminação orgânica e enriquecimento em nutrientes; RH – Regime hidrológico; ML – Massas de água lênticas; AT – Acid Toxicidade; PT – Pressão total; ND – Nível de degradação)

Estação	US	AU	ZR	CM	CS	CO	RH	ML	AT	PT	ND
R.FRE	3	2	3	3	3	2	3	3	1	23	2
R.MAC	4	1	4	2	4	4	1	1	1	22	3
R.PEC	3	1	3	2	3	3	1	1	1	18	1
R.BOR	4	1	4	1	3	4	1	1	1	20	2
R.PER	3	1	3	1	4	3	1	1	1	18	1
R.ALC1	5	1	4	4	5	4	4	4	1	32	2
R.ALC2	3	1	1	4	4	3	4	4	1	25	1
R.VAL	3	1	2	1	3	3	2	1	1	16	1
R.XAR	4	2	4	2	5	5	3	1	1	27	3
R.ALM	4	2	2	1	4	4	2	1	1	21	2
R.ALF	4	1	3	1	4	5	1	1	1	21	3
PMAG	5	1	5	5	5	2	5	5	3	31	4

No que respeita ao Nível de Degradação verifica-se que as estações com menores pressões globais foram também as que apresentaram parâmetros físico-químicos dentro dos intervalos de conforto para a generalidade da fauna aquática, tais como valores de temperatura da água entre 17-19°C e concentração de OD mais elevados (Tabela 12), daí terem a classificação de nível1 (Bom estado). Contudo verificou-se também que algumas estações que obtiveram pontuações finais de pressão relativamente baixas apresentaram parâmetros físico-químicos, como a

condutividade correspondentes a níveis de degradação relativamente elevados, como é o caso das ribeiras de Machede (R.MAC) e Almadafe (R.ALF) e daí terem ambas sido classificadas com Moderado nível de degradação (nível 3). De todas as estações observadas, a de Paúl de Magos (PMAG) foi a que apresentou no conjunto de todos os fatores a pior classificação no que diz respeito ao nível de degradação (Mau estado, nível 4), uma vez que demonstrou ser a estação mais afetada por pressões antropogénicas (Tabela 13), apresentando também parâmetros físico-químicos com valores extremos, tais como temperatura elevada e baixo valor de OD (Tabela 12).

### 3.2.2 Parâmetros biométricos e índices de condição corporal e hepatossomático

O número de indivíduos capturados em cada local foi muito variável (Tabela 14), apesar do esforço de amostragem ter sido aproximadamente o mesmo em todas as estações. O maior número de indivíduos capturados ocorreu na estação Ribeira de Borba (R.BOR) e o inverso ocorreu nas estações Almansor (R.ALM) e Alcáçovas1 (R.ALC1). Relativamente ao “sex-ratio”, também se registou elevada variabilidade entre as estações, contudo não se evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ). A estação Ribeira de Valverde (R.VAL) foi a única estação em que apenas se capturaram fêmeas. A estação Rio Xarrama (R.XAR) foi a registou o maior número de machos capturados.

Tabela 14 – Caracterização morfométrica dos indivíduos capturados em cada troço

Estação	N	Sex Ratio (M: F)	Comprimento (cm)				Peso (g)				% Fêmeas ovadas
			Méd	DP	Mín	Máx	Méd	DP	Mín	Máx	
R.FRE	5	3: 2	8,9	1,54	7,2	10,8	20,80	12,72	8,59	37,10	0,0%
R.MAC	6	2: 4	8,6	1	7,3	9,5	14,40	5,00	7,76	18,98	0,0%
R.PEC	7	3: 4	7,9	0,76	7,2	9,2	12,43	5,81	7,08	24,02	0,0%
R.BOR	19	7: 12	8,3	0,99	7,0	10,1	16,80	8,73	8,03	35,03	25,0%
R.PER	5	2: 3	8,7	0,65	8,0	9,4	16,54	4,45	12,70	22,34	0,0%
R.ALC1	3	2: 1	9,5	0,98	8,7	10,6	23,33	9,42	17,75	34,21	0,0%
R.ALC2	10	7: 3	8,4	0,98	7,2	10,5	15,25	6,33	8,35	30,34	66,7%
R.VAL	4	0: 4	8,4	1,14	7,2	9,8	14,57	6,82	7,98	23,40	0,0%
R.XAR	13	8: 5	8,8	1,11	7,3	10,5	20,15	10,89	9,21	42,99	40,0%
R.ALM	3	2: 1	8,5	0,76	7,6	9,0	16,14	5,60	10,78	21,96	0,0%
R.ALF	6	1: 5	8,1	0,61	7,4	8,8	14,86	5,06	8,63	20,67	20,0%
PMAG	10	2: 8	10,3	0,79	9,0	11,3	30,28	6,88	21,11	41,47	37,5%

Paúl de Magos apresentou indivíduos com comprimento médio significativamente superior ( $P < 0,001$ ) relativamente às outras estações (Figura 5), não tendo estas apresentado diferenças estatisticamente significativas entre si.

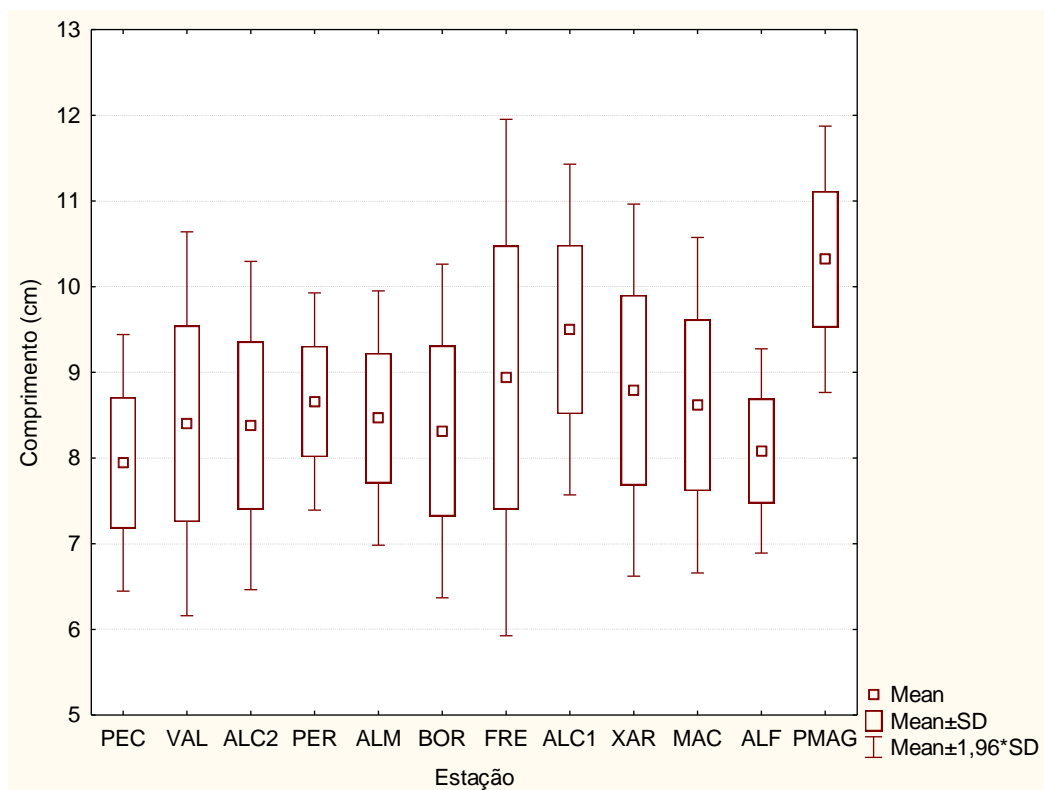


Figura 5 – Comprimento médio dos indivíduos nas estações amostradas.

O peso dos indivíduos seguiu o mesmo padrão que o comprimento, destacando-se novamente a estação de Paúl de Magos que apresentou indivíduos com peso médio significativamente maior ( $P < 0,01$ ) relativamente aos indivíduos das outras estações.

Registou-se também a ocorrência de fêmeas ovigeras em 5 estações (Tabela 14), tendo a sua proporção nas estações onde foram detetadas variado entre 20 e 66,7%.

O valor médio do Índice de Condição Corporal por estação variou entre 2,72 e 2,16 (Tabela 15). Os valores mais elevados foram registados nas estações Ribeira de Almadafe (R.ALF) e Paúl de Magos (PMAG) (Tabela 15), tendo apenas esta última apresentado indivíduos com condição corporal significativamente superior ( $P < 0,001$ ) aos das restantes estações, o que acompanha a tendência verificada no comprimento e peso médios dos indivíduos. A Ribeira de Machede (R.MAC) apresentou indivíduos com Índice de Condição corporal significativamente menor ( $P \leq 0,05$ ) que as restantes estações.



Tabela 15 – Valores médios (Med) e desvio padrão (DP) do Índice de Condição Corporal e Índice Hepatosomático em cada estação amostrada

Estação	Índice de Condição Corporal		Índice Hepatosomático	
	Med	DP	MED	DP
R.FRE	2,60	0,35	1,8	0,94
R.MAC	2,16	0,18	0,5	0,28
R.PEC	2,35	0,40	2,0	0,68
R.BOR	2,69	0,51	2,5	1,50
R.PER	2,50	0,13	1,8	0,63
R.ALC1	2,63	0,28	2,3	0,09
R.ALC2	2,48	0,25	2,4	0,75
R.VAL	2,31	0,15	1,1	0,66
R.XAR	2,70	0,53	1,9	0,51
R.ALM	2,59	0,37	2,0	0,52
R.ALF	2,72	0,39	1,6	0,46
PMAG	2,72	0,22	2,3	0,79

O valor médio do Índice Hepatosomático de cada estação variou entre 0,5 e 2,5 (Tabela 15), registando-se o valor mais elevado na estação Ribeira de Borba e o mais baixo na estação Machede. A estação Machede (R.MAC) apresentou indivíduos com índice hepatossomático significativamente inferior às restantes estações ( $P < 0,01$ ). A estação Ribeira de Valverde (R.VAL) apresentou indivíduos com índice hepatossomático significativamente inferior ( $P \leq 0,05$ ) às estações da Ribeira das Alcaçovas (R.ALC1 e R.ALC2) e de Borba (R.BOR). As estações Ribeira das Alcáçovas (1 e 2) apresentaram indivíduos com índice hepatossomático significativamente superior ( $P \leq 0,05$ ) respetivamente às estações Peramanca (R.PER) e Almadafe (R.ALF), e Almansor (R.ALM). Verificou-se ainda que os indivíduos da estação Paúl de Magos apresentaram um valor médio no índice hepatossomático significativamente superior ( $P \leq 0,05$ ) às estações Valverde (R.VAL) e Almadafe (R.ALF). O índice de condição corporal apresentou-se correlacionado positivamente com o índice hepatossomático ( $P \leq 0,05$ ;  $R=0,30$ ).

Os padrões coloração do hepatopâncreas dos indivíduos apresentaram grande dispersão dentro e entre estações (Tabela 16), não se observando diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre estações. As estações da Ribeira das Alcáçovas (1 e 2), Xarrama (R.XAR), Almansor (R.ALM), Almadafe (R.ALF) e Paúl de Magos (PMAG) são as que apresentam maioritariamente classes de coloração mais clara. Não existe nenhuma estação em que se tenha verificado a classe 4, correspondente a coloração mais escura. A classe 2 foi a que mais se verificou entre todas as estações (Tabela 16). A coloração do hepatopâncreas apenas apresentou uma correlação negativa significativa com o índice hepatossomático ( $P \leq 0,05$ ;  $R=-0,30$ ), significando que quanto melhor é a condição do hepatopâncreas, mais clara é a sua coloração

Tabela 16 – Padrão de coloração do hepatopâncreas em cada estação de amostragem

Local	Cor	Sigla	Chroma	Código de cor atribuído (1 -mais claro; 4 - mais escuro)									
				1		2		3		4			
				N	%	N	%	N	%	N	%		
RFRE	Yellow	2.5Y	7./8			3	60%						
	Olive Yellow		6./6					1	20%				
	Olive Yellow		6./8					1	20%				
RMAC	Yellow	2.5Y	7./8			1	16,7%						
	Olive Yellow		6./6					1	16,7%				
	Olive Yellow	5Y	6./6					1	16,7%				
	Very Pale Brown		8./4	1	16,7%								
	Yellow	10YR	7./8			1	16,7%						
	Brownish Yellow		6./8					1	16,7%				
RPEC	Olive Yellow	2.5Y	6./8					1	14,3%				
	Yellow	10YR	8./8			1	14,3%						
	Very Pale Brown		7./4			1	14,3%						
	Yellow		7./8			3	42,9%						
	Brownish Yellow		6./8					1	14,3%				
RBOR	Yellow	2.5Y	7./8			12	63%						
	Olive Yellow		6./8					3	16%				
	Yellow	10YR	7./8			4	21%						
RPER	Yellow	2.5Y	7./8			1	20%						
	Olive Yellow		6./8					1	20%				
	Yellow	10YR	8./8			2	40%						
	Yellow		7./8			1	20%						
RALC 1	Yellow	10Y R	8./8			1	33%						
	Yellow		7./8			2	67%						

Local	Cor	Sigla	Chroma	Código de cor atribuído (1 -mais claro; 4 - mais escuro)									
				1		2		3		4			
				N	%	N	%	N	%	N	%		
RALC 2	Yellow	2.5Y	8./6	3	30%								
	Yellow	10YR	8./6	2	20%								
	Yellow		7./6			1	10%						
	Yellow		7./8			4	40%						
RVAL	Yellow	10YR	8./8			1	25%						
	Yellow		7./8			2	50%						
	Brownish Yellow		6./8					1	25%				
RXAR	Yellow	2.5y	8./6	1	7,7%								
	Yellow		7./6	1	7,7%								
	Yellow	10YR	7./8			4	30,8%						
	Yellow		7./6			1	7,7%						
RALM	Yellow	10YR	8./8			1	33%						
	Yellow		7./8			2	67%						
RALF	Yellow	2.5Y	7./6	1	17%								
	Yellow		7./8			2	33%						
	Yellow	10YR	7./8			3	50%						
PMAG	Yellow	2.5Y	8./6	1	10%								
	Yellow		8./8			3	30%						
	Olive Yellow		6./6					1	10%				
	Yellow	10YR	8./6	1	10%								
	Yellow		8./8			3	30%						
	Yellow		7./6			1	10%						

### 3.2.3 Relação entre os parâmetros biológicos e ambientais

Relativamente ao comprimento e ao peso dos indivíduos de todas as estações, verifica-se que, em ambos, os indivíduos das estações que correspondem ao nível de degradação 1 (Bom estado), apresentam comprimentos e pesos significativamente inferiores ( $P < 0,01$ ) aos indivíduos cujas estações correspondem ao nível 4 de degradação (Mau estado), registando uma correlação significativa entre a dimensão dos indivíduos e a degradação do meio ( $P < 0,01$ ,  $R = -0,35$ ). A dimensão dos indivíduos apresentou-se negativamente correlacionada com a profundidade da água ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,25$ ) e a velocidade da corrente ( $P \leq 0,05$ ,  $R = -0,22$ ) assim como com a granulometria do substrato ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,33$ ). Verificou-se ainda uma correlação positiva entre o aumento do peso e tamanho dos indivíduos e a percentagem de pools ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,25$ ). Verifica-se também que os indivíduos das estações correspondentes a menor nível de degradação ambiental, apresentam índices de condição corporal significativamente inferiores ( $P \leq 0,05$ ) aos dos indivíduos de estações com níveis de degradação ambiental mais elevados (Figura 6), observando-se também correlação positiva entre a condição corporal e o nível de degradação ambiental ( $P \leq 0,05$ ,  $R = 0,63$ ). A condição corporal dos indivíduos apresentou-se ainda correlacionada positivamente com o uso de solo ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,61$ ), a condutividade da água ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,29$ ) e a pressão total humana ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,25$ ). Não se observou qualquer correlação entre a condição corporal e as variáveis de habitat consideradas.

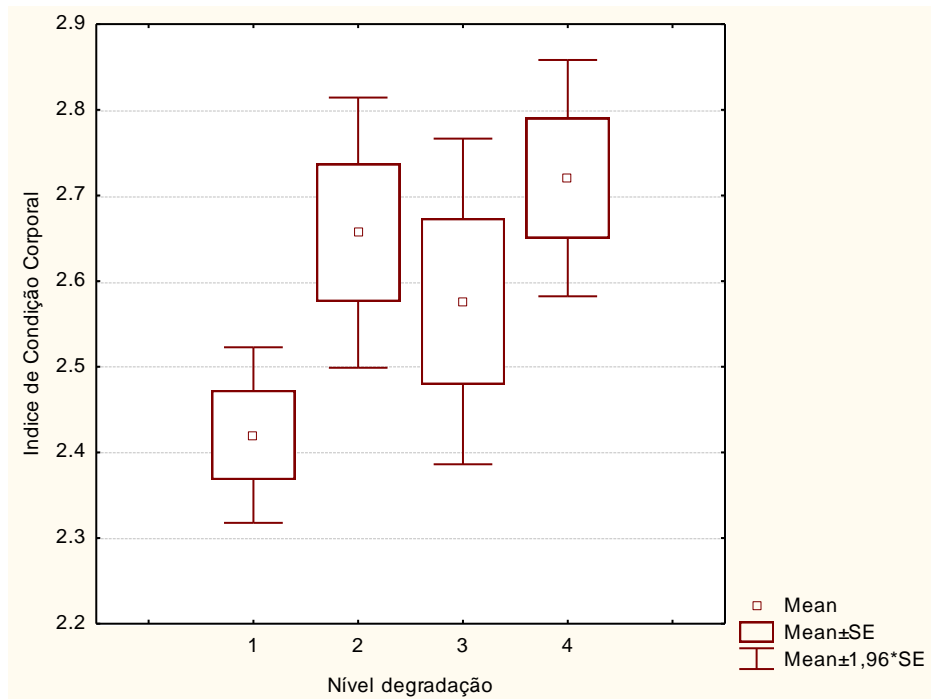


Figura 6 – Índice de Condição Corporal médio de *P. clarkii* dos locais com diferentes níveis de degradação.

Relativamente ao índice hepatossomático, não se observa um padrão significativo de associação com o nível de degradação. O índice hepatossomático apresentou correlação positiva com a concentração de oxigénio dissolvido ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,30$ ), regime hidrológico ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,33$ ) e condição morfológica ( $P \leq 0,05$ ;  $R = 0,23$ ). Não se observou qualquer correlação entre o índice hepatossomático e as variáveis de habitat consideradas.

Ao nível da coloração do hepatopâncreas, não se verificaram diferenças significativas entre os vários níveis de degradação ambiental, no entanto observou-se correlação negativa significativa entre a classe de cor do hepatopâncreas e o regime hidrológico ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,26$ ) e a pressão total humana ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,22$ ) (Figura 7), i.e. quanto maiores as alterações hidrológicas e pressão total, mais clara se apresenta a cor do hepatopâncreas. Este parâmetro apresentou-se negativamente correlacionado com a profundidade ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,28$ ) e velocidade da corrente ( $P \leq 0,05$ ;  $R = -0,26$ ) da água.

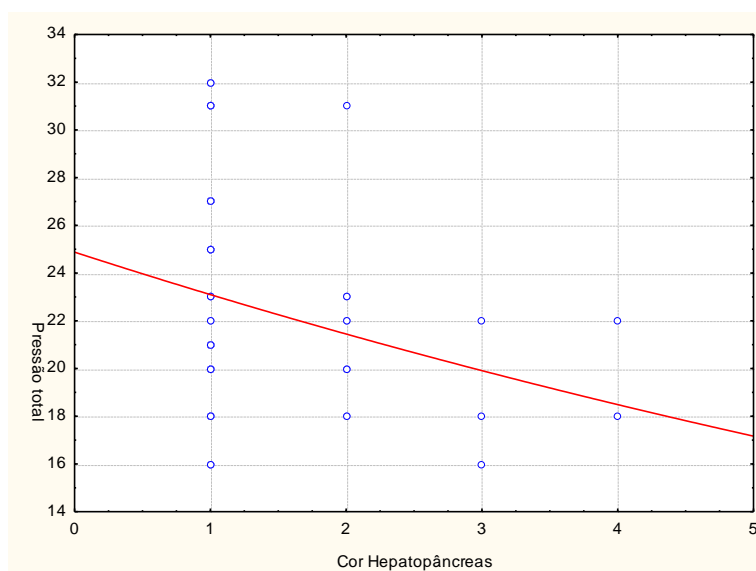


Figura 7 – Relação entre a Pressão Total do meio e a Cor do Hepatopâncreas de *P. clarkii*.

## 4 Discussão

### 4.1 *Influência dos fatores ambientais*

Vários autores, revelam que variações em fatores tais como temperatura da água (Holdich & Lowery 1988; Huner & Lindqvist 1988; Huner *et al.* 1993; Mills *et al.* 1994), de amônia e nitritos (Ackefors *et al.* 1994), pH (Aiken & Waddy 1992), geralmente utilizados para avaliar a qualidade da água, podem ser responsáveis por alterações no crescimento, reprodução e inclusivamente poderão condicionar a sobrevivência do lagostim. Relativamente à experiência levada a cabo neste trabalho, os valores de pH, condutividade, nitritos, amônia e temperatura, foram semelhantes nos dois grupos em estudo (normoxia e hipoxia), o que permitiu isolar o efeito de carência de oxigénio como a principal variável que pudesse influenciar as respostas fisiológicas dos lagostins. Os valores de oxigénio dissolvido disponíveis, no grupo de normoxia encontraram-se dentro dos limites de conforto da generalidade das espécies aquáticas e de acordo com os valores registados na grande maioria dos ecossistemas onde *P. clarkii* geralmente pode ser encontrado. Opostamente, no grupo de hipoxia, foram mantidas condições ambientais com valores médios de OD que se enquadram na situação de hipoxia (3-5mg/l), o que para um grande número de espécies aquáticas é considerado crítico ou mesmo letal para várias espécies (Alabaster & Loyd 1980; Menezes 2000; Ilhéu 2004). A taxa de crescimento, expressa em comprimento e peso não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos do estudo, verificando-se inclusivamente maiores diferenças entre indivíduos do mesmo grupo (neste caso de normoxia) do que propriamente com o grupo de hipoxia. Outra situação registada foi a elevada taxa de maturação sexual das fêmeas em ambos os grupos. Este sexo apresentou inclusive, maiores aumentos de peso comparativamente aos machos, em ambos os grupos, podendo estes resultados estar associados à elevada competitividade das fêmeas, sendo frequente as fêmeas maduras apresentarem os comportamentos mais agressivos entre indivíduos do mesmo aquário (Figler *et al.* 1994). A ocorrência deste tipo de interação poderá ser menor à medida que a disponibilidade de OD diminui (Fidalgo, 1983) devido à regulação do seu metabolismo em função das condições ambientais. A ausência de mortalidade em situação de hipoxia moderada associada a performances biológicas idênticas ao grupo de normoxia, permite evidenciar a elevada resistência e capacidade de adaptação desta espécie a condições desfavoráveis à maior parte das espécies, em concordância com os resultados obtidos por outros autores (e.g. Morrissy *et al.* 1984; Demers *et al.*, 2006). Contudo, tal como o autor McClain

(1999) refere, os mecanismos através dos quais os lagostins podem lidar com sucesso aos efeitos de hipoxia prolongada não são totalmente claros e deverão ser foco de futuras investigações.

Os locais com condições ambientais mais degradadas apresentaram de forma geral indivíduos maiores e com melhor condição corporal. Um exemplo disso é o caso da Estação Paúl de Magos que apresentou elevado grau de perturbação com baixa concentração de OD (2,8 mg/L), tendo sido a estação onde se registaram os valores de comprimento médio (10,3 cm  $\pm$  0,79 DP) e peso médio (30,28g  $\pm$  6,88 DP) mais elevados, uma percentagem de 37,5% de fêmeas ovígeras e com índices de condição corporal e hepatossomático elevados comparativamente com a generalidade das outras estações. Esta estação apresenta características muito distintas das restantes, dado tratar-se de um sistema artificial, onde as condições hidro-morfológicas típicas de canais parecem beneficiar esta espécie.

O índice hepatossomático apresentou-se correlacionado com perturbações no regime hidrológico e condição morfológica. Aparentemente, quanto maior é o grau de alteração hidro-morfológica dos sistemas aquáticos, melhor é a condição hepatossomática desta espécie. Embora *P. clarkii* possa beneficiar de condições particulares de habitat, nomeadamente a elevada disponibilidade de habitats sem corrente e com deposição de detritos (Ilhéu *et al.* 2003) não se observou qualquer relação entre as variáveis de habitat, convencionalmente avaliadas em rios, e os índices de condição corporal e fisiológica. No entanto observou-se um aumento da dimensão dos indivíduos em habitats de deposição (vasosos), com baixa profundidade e sem corrente.

## **4.2 Interpretação de Índices**

Os índices hepatossomáticos têm sido utilizados como índices de condição, se o lagostim for obtido do meio natural (Mannonen & Henttonen 1995) ou criados em sistemas semi-intensivos (McClain 1995a, 1995b) e podem ser feitas comparações entre grupos que habitam ambientes semelhantes. Relativamente aos resultados obtidos neste trabalho, o índice de condição corporal apresenta-se correlacionado com o índice hepatossomático. No entanto, a condição corporal foi o índice que apresentou maior responsividade à degradação ambiental, expressa sobretudo em função da condutividade da água e das alterações nos usos decorrentes da atividade humana. O índice hepatossomático não apresentou potencialidade para discriminar indivíduos provenientes de massas de água com diferentes níveis de degradação global, mas mostrou-se responsivo a pressões do tipo hidro-morfológico, tendo-se observado índices hepatossomáticos mais elevados em locais com elevada perturbação nas condições hidrológicas e morfológicas, o mesmo se tendo observado com a coloração do hepatopâncreas. Jussila (1997b) sugere que a combinação

dos índices de crescimento e condição poderão fornecer uma base mais fiável para a condição geral ou para estimar as performances, do que cada índice individualmente. Neste estudo verifica-se que a aplicação do índice hepatossomático pode ser complementar para diagnosticar pressões de tipo específico, em particular hidro-morfológicas. Huner *et al.* (1990) demonstraram que na espécie *Astacus astacus* (Linnaeus 1758) a maturação sexual e o ciclo reprodutivo também afetam os índices hepatossomáticos. Estudos realizados por Huner *et al.* (1985) verificaram também que não haveria diferenças significativas no peso relativo do hepatopâncreas entre machos e fêmeas. Contudo, num estudo realizado por Jussila (1997b), com a espécie *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912), o mesmo não encontrou diferenças entre sexos, relativamente aos índices hepatossomáticos. Já Lucic & Erben (2005) indicam que os machos e as fêmeas, da espécie *Australopotamobius torrentium* (Schrank 1803), diferem significativamente no teor de humidade do hepatopâncreas e no peso relativo das gónadas, verificando-se também diferenças sazonais nos índices hepatossomático e gonadosomático, o que confirma as diferentes necessidades energéticas da oogénese e da espermatogénese (Gherardi, 2002). No decorrer deste trabalho apenas se observou na fase laboratorial que o índice hepatossomático das fêmeas foi significativamente maior que o dos machos, em ambos os grupos, normoxia e hipoxia. Contudo, não foi possível estabelecer uma relação conclusiva relativamente ao índice hepatossomático obtido entre machos e fêmeas.

### **4.3 Interpretação da cor do hepatopâncreas**

A cor do hepatopâncreas foi determinada através da comparação visual do material dissecado com a carta de solos de Munsell (Gretag-Macbeth, New Windsor, NY, USA). Um estudo realizado por Hasek & Felder (2006) em indivíduos das espécies *Uca longisignalis* e *Uca nr. minax*, foi utilizado o sistema de correspondência de cores Pantone (Pantone Inc., Carlstadt, New Jersey, 07072 USA) para classificar a coloração dos ovários e do hepatopâncreas. Num outro estudo realizado por Van der Ham & Huner (2006), os autores investigaram a relação entre o teor de humidade do hepatopâncreas de fêmeas, individuais, de *P. clarkii* e a cor deste órgão, com base numa escala de cores padrão, comparando também eles, com a carta de solos de Munsell (Gretag-Macbeth, New Windsor, NY, USA). Embora qualquer um destes tipos de cartas não fossem concebidas para esta função específica, fornecem uma vasta gama de cores que poderá ser utilizada para avaliar outros aspectos biológicos tais como pele, cabelo, e a cor dos olhos. Esta comparação visual permite um agrupamento padronizado das cores observadas. Relativamente ao estudo de Hasek & Felder (2006) o hepatopâncreas foi classificado numa de quatro classes de cores: i) castanho (419CV), em que a cor do hepatopâncreas variou desde castanho-escuro amarelado a castanho-preto com áreas pretas ou castanhas ao longo dos

túbulos; ii) amarelo ocre (145CV), na qual a cor do hepatopâncreas variou desde um uniforme amarelo acastanhado ou amarelo escuro, por vezes com partes castanhas ao longo dos túbulos; iii) amarelo limão (129CV), em que a cor do hepatopâncreas e os túbulos tinham um amarelo uniforme; e iv) amarelo cádmio (102CV), em que o hepatopâncreas e os túbulos tinham um amarelo com elevada intensidade uniforme até ao amarelo-alaranjado. Já os autores Van der Ham & Huner (2006), tendo em conta a avaliação visual da cor do hepatopâncreas, agruparam as cores, baseadas nas cartas de cores de Munsell, em seis: yellow, brownish-yellow, yellowish-brown, olive yellow, dark yellowish-brown e strong-brown; as cores que foram verificadas em menor frequência foram agrupadas com a cor mais semelhante. Neste trabalho, agruparam-se as cores observadas em 4 classes com base na tonalidade mais clara para mais escura: yellow (classe 1), olive yellow (classe 2), brownish yellow (classe 3) e very pale brown (classe 4).

Com base no ensaio em condições de hipoxia, verificou-se uma tendência acentuada para todos os indivíduos apresentarem uma coloração do hepatopâncreas predominantemente escura (classe 4). No entanto, os dois grupos, normoxia e hipoxia, apresentaram uma elevada variabilidade no padrão de cores, mas não se observaram diferenças significativas entre tratamentos. A avaliação da cor do hepatopâncreas em indivíduos provenientes de diferentes massas de água, permitiu identificar uma correlação negativa significativa entre a classe de cor do hepatopâncreas e o regime hidrológico e a pressão total humana; i.e. quanto maiores as alterações hidrológicas e pressão total, mais clara se apresenta a cor do hepatopâncreas, mas dado o seu carácter preditivo ser pouco potente, não é fiável a sua utilização como índice biológico. Estes resultados levantam a hipótese de que a degradação ambiental não deverá ser considerada como um fator unicamente responsável pela degradação do hepatopâncreas. Van der Ham & Huner (2006) levantaram a hipótese de que a variação observada entre as diferentes populações poderá ser resultado de várias influências, tais como flutuações na disponibilidade de alimentos, ou as diferenças ambientais tais como diferenças na qualidade da água e dos sedimentos. Os resultados deste estudo, corroboram esta hipótese, dado que se verificou intensificação da cor do hepatopâncreas do lagostim em habitats com baixa profundidade e velocidade de corrente, assim como um aumento do índice hepatossomático com a disponibilidade de substrato vasoso.

No estudo de Hasek & Felder (2006), foi verificado que a cor do hepatopâncreas da espécie *U. longisignalis* não variou na maioria dos índices estudados, à exceção do índice da glândula digestiva dos machos, em que os indivíduos cujos hepatopâncreas apresentavam coloração castanha ou amarelo ocre possuíam valores inferiores deste índice comparativamente com indivíduos cujos hepatopâncreas apresentavam colorações amarelo limão ou amarelo cádmio. Nos indivíduos da espécie *U. nr. minax*, também não se verificaram relações suficientes entre a cor do hepatopâncreas e os índices estudados, excepto o tamanho e o peso húmido corporal. Hasek & Felder (2005) observaram um padrão de correlação entre a concentração de água no



hepatopâncreas e a cor do hepatopâncreas. Para a espécie *S. nr. reticulatum*, a concentração de água diminuiu ao longo de uma continuação de coloração do hepatopâncreas de castanho (com a maior concentração de água) para amarelo cádmio (com a menor concentração de água). Este facto sugere que a coloração do hepatopâncreas está relacionada com o estado nutricional. Durante períodos sem alimento ou períodos de stress nutricional, a concentração de água no hepatopâncreas aumenta (Dall 1974; Trendall & Prescott 1989). Durante o período de stress nutricional, verifica-se, no hepatopâncreas, a diminuição dos níveis de concentração de Carbono enquanto que a concentração de azoto aumenta (Trendall & Prescott 1989). Este representa o mesmo padrão verificado por Hasek & Felder (2005) para os hepatopâncreas cuja coloração apresenta variação de castanho a amarelo cádmio. O aumento das concentrações de água e de azoto juntamente com a diminuição da concentração de carbono (verificado durante o período de stress nutricional) poderá também explicar as diferenças bioquímicas em hepatopâncreas de colorações diferentes (Hasek & Felder 2005).

Hasek & Felder (2006) referem que outra explicação possível para as diferentes cores e conteúdo lipídico será as flutuações nas fontes de alimento. Referem também que estes caranguejos intertidais ocupam habitats em fluxo constante, ao contrário de muitos outros crustáceos cujos conteúdos lipídicos foram estudados. Durante a maturação dos ovários, o hepatopâncreas do género *Carcinus* adquire uma cor pálida comparativamente com o normal castanho amarelado ou laranja (Goodwin, 1960). A coloração normal do hepatopâncreas pode ser restaurada, alimentando o caranguejo com uma dieta rica em carotenóides (Goodwin, 1960). A cor do hepatopâncreas pode flutuar em caranguejos capturados da natureza devido à presença de carotenóides na dieta e pelo modo como estes pigmentos são metabolizados. Em alguns crustáceos, os carotenóides são mobilizados do hepatopâncreas para as gónadas (Goodwin, 1950). O hepatopâncreas da espécie *Clibabarius erythropus* Latreille, quando os indivíduos são alimentados em laboratório com dietas ricas em astaxantina, adquire a coloração rosa claro; para os indivíduos alimentados com dietas ricas em  $\beta$ -carotenos e cantaxantina, torna-se visualmente incolor (Castillo e Negre-Sadargues 1995).

## 5 Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo permitem demonstrar a elevada tolerância de *P.clarkii* a condições ambientais de elevado constrangimento, bem como a associação desta espécie a condições ambientais degradadas.

Este estudo demonstra que condições de hipoxia moderada (3-5mg/L) não afetam a taxa de sobrevivência, o crescimento e a condição corporal e hepatossomática de *P.clarkii*.

Quando se relacionou os parâmetros biológicos com os parâmetros ambientais dos vários locais assinalados no estudo, foi possível observar que indivíduos provenientes de massas de água com elevada degradação apresentam significativamente maior dimensão e condição corporal.

Verificou-se também que o Índice hepatossomático assim como a cor do hepatopâncreas apresentam correlação com modificações hidro-morfológicas causadas por ação humana.

Estes resultados, demonstram que os fatores ambientais constrangedores não representam um efeito nefasto à boa condição corporal dos indivíduos, contudo, as correlações positivas existentes, demonstram a necessidade de desenvolver trabalho nesta área de forma a poder utilizar com maior precisão as potencialidades de *P.clarkii* como bioindicador para a avaliação da degradação ambiental do meio.

## Referências Bibliográficas

Ackefors, H.; Huner, J. & Konikoff M. (1994). Introduction to the general principles of aquaculture. Food Production Press, New York, USA.

Ackefors, H.; Castell, D. & Örde-Öström, I-L. (1997). Preliminary results on the fatty acid composition of freshwater crayfish, *Astacus astacus* and *Pacifastacus leniusculus*, held in captivity. Journal of the World Aquaculture Society 28:97-105.

Aiken, D.; Waddy, S. (1992). The growth process in crayfish. Reviews in Aquatic Science 6: 335-81.

Alabaster, J. & Loyd, R. (1980). Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths, Boston.

Alba-Tercedor, J. (1994). El entomólogo y los problemas de degradación de los sistemas acuáticos. En: *Environmental Management and Arthropod Conservation* (Eds. R. Jiménez-Peydró & M. A. Marcos-García): 131-138. Asociación Española de Entomología. 179 p. Valencia.

Alba-Tercedor, J. (1996). Macroinvertebrados Acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. IV Simposio del Agua en Andalucía (SIAGA), Almería, vol. II, 203-213.

Alcorlo, P.; Otero, M.; Crehuet, M.; Baltanás, A. & Montes, C. (2006). The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). Science of the Total Environment 366, 380-390.

Alikhan, M.; Bagatto, G. & Zia, S. (1990). The crayfish as a “biological indicator” of aquatic contamination by heavy metals. Water Research; 24:1069-76.

Anderson, R.; Brower, J. (1978). Patterns of trace metal accumulation in crayfish population. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 20:120-7.

Anderson, M.; Reddy, P.; Preslan, J.; Fingerman, M.; Bollinger, J. & Jolibois, L. (1997a). Metal accumulation in crayfish (*Procambarus clarkii*) exposed to a petroleum-contaminated bayou in Louisiana. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (37):267–72.

Anderson, M.; Preslan, J.; Jolibois, L.; Bollinger, J. & George, W. (1997b). Bioaccumulation of lead nitrate in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *J Hazard Mater* (54):15–26.

Ando, T.; Kanazawa & Teshima, S. (1977). Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn. *Bulletn of Japanese Society of Scientific Fisheries* **43** (12): 1 445-1 449.

Anastácio, P. (1993). Ciclo biológico e produção do lagostim vermelho da Luisiana (*Procambarus clarkii*, Girard) no Baixo Mondego. MSc. Thesis, University of Coimbra, Portugal. 119 pp.

Aquiloni, L.; Ilhéu, M. & Gherardi, F. (2005). Habitat use and dispersal of the invasive crayfish *Procambarus clarkia* in ephemeral water bodies of Portugal. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 1-12.

Barbour, M.; Gerritsen, J.; Snyder, B. & Stribling, J. (1999). Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2<sup>a</sup>ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.

Callisto, M.; Moretti, M. & Goulart, M. (2001). Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 6 (1) 71-82.

Callisto, M., Goncalves, J. (2002). A vida nas águas das montanhas. *Ciência Hoje* 31 (182): 68 – 71.

Callisto, M.; Gonçalves Jr, J. & Moreno, P. (2010). Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Ecologia de Bentos, CP, 485, CEP. 30. 161-970.

Castillo, R. & Négre-Sadargues, G. (1995). Effect of different dietary carotenoids on the pigmented pattern of the hermit crab *Clibanarius erythropus* Latreille (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology* Vol, 111<sup>a</sup>, No. 4, 533-538.

Caro, T. & O'Doherty, G. (1999), On the Use of Surrogate Species in Conservation Biology. *Conservation Biology*, 13: 805–814

Cockcroft, A. (1997). Biochemical composition as a growth predictor in West Coast rock lobster (*Jasus lalandii*). In: Programme and Abstracts, The Fifth International Conference and Workshop on Lobster Biology and Management. Queenstown, New Zealand, February. pp. 24.

Currie, R.; Muir, D.; Fairchild, W.; Holoka, M. & Hecky, R. (1998). Influence of nutrient additions on cadmium bioaccumulation by aquatic invertebrates in littoral enclosures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:2435–43.

Dall, W. (1974). Indices of nutritional state in the western rock lobster, *Panulirus longipes* (Milne Edwards). I. Blood and tissue constituents and water content. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 16:167-180.

Demers, A.; Souty-Grosset, C.; Trouilhé, M.; Fureder, L.; Renai, B. & Gherardi, F. (2006). Tolerance of three European native species of crayfish to hypoxia. *Hydrobiologia*, 560, 425-432.

Elia, A.; Dorr, A.; Mastrangelo, C.; Prearo, M. & Abete, M. (2006). Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1982) of Lake Trasimeno (Italy). *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture* 380-382, 1351-1361.

Endo, Y. & Kadoya, N. (1991). Colorimetry of the hepatopancreas in Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Polar Biology*, 11, 135-137.

FAME (2004) Development, Evaluation & Implementation of a Standardised Fish-based Assessment Method for the Ecological Status of European Rivers - A Contribution to the Water Framework Directive. Final Report, scientific achievements (Sections 5 & 6) (Co-ordinator: Stefan Schmutz). Institute for Hydrobiology and Aquatic Ecosystem Management, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, 41 pp

Fidalgo, M. (1983). Oxygen consumption in *Atyaephyra desmaresti* Millet (*Crustacea, Decapoda, Natantia*); Instituto de Zoologia Dr. Augusto Nobre; Faculdade de Ciência do Porto N°176.

Figler, M.; Twum, M.; Finkelstein, J. & Peeke, H. (1994). Maternal aggression en red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852): The relation between reproductive status and outcome of aggressive encounters with male and female conspecifics; Behavior n°132, Issue 1-2, 107-125.

Fishar, M. (2006). Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkia*) in River Nile, Egypt. Case Study, Egypt, 32 pp.

Geiger, W.; Alcorlo, P.; Baltanás, A. & Montes, M. (2005). Impact of an introduced Crustacean on the trophic webs of Mediterranean wetlands. Biology Invasions, 7, 49-73.

Gherardi, F.; Baldaccini, G.; Barbaresi, S.; Ercolini, P.; De Luise, G.; Mazzoni, D. & Mori, M. (1999). Alien crayfish in Europe: the situation in Italy. In: Gherardi F, Holdich DM (eds), Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation? A.A. Balkema, Rotterdam, pp 107-128.

Gherardi, F. & Holdich, D. (1999) Crayfish in Europe as Alien Species. Crustacean Issues 11. A.A. Balkema, Rotterdam, pp 299.

Gherardi F.; Barbaresi, S.; Vaselli, O.; Bencini, A. (2002). A comparison of trace metal accumulation in indigenous and alien freshwater macro-decapods. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 35: 179-188.

Gherardi, F. (2002). Behaviour. in D. M. Holdich, editor. Biology of Freshwater crayfish. Blackwell, Oxford, UK. Pages 258-290.

Gherardi, F. (2006). Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 39 (3):175–191.

Gherardi, F.; Gollasch, S.; Minchin, D.; Olenin, S. & Panov, V. (2009). Alien invertebrates and fish in European inland waters. In: DAISIE (eds) Handbook of alien species in Europe. Springer, Dordrecht, pp 93–104.

Giller, P. & Malmqvist, B. (1998). *The Biology of Streams and Rivers*. Oxford University Press, Oxford.

Goodwin, T. (1950). Carotenoids and reproduction. *Biological review Cambridge Philosophical Society* 25, 391–413.

Goodwin, T. (1960). Biochemistry of Pigments. In: T.H. Waterman (ed.), *The Physiology of Crustacea*, Academic Press, New York. pp. 101-140.

Goulart, M., Callisto, M. (2003). Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, ano 2, nº1.

Gutiérrez-Yurrita, P.; Martínez, J.; Bravo-Utrera, M.; Montes, C.; Ilhéu, M. & Bernardo, J. (1999). The status of crayfish populations in Spain and Portugal. In: Gherardi F, Holdich DM, editors. *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* A.A. Balkema, Rotterdam. pp 161–192.

Hartman, K.J. & Brant, S.B., (1995). Estimating energy density in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124: 347-355.

Hasek, B. & Felder, D. (2005). Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. Reticulatum* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 140, 455-463.

Hasek, B. & Felder, D. (2006). Biochemical contents of the ovary and hepatopancreas of *Uca longisignalis* and *Uca nr. Minax*. *Sciencia Marina*, 70 (3), 505-517.

Henttonen P. & Huner J. (1999). The Introduction of alien species of crayfish in Europe: A historical introduction. *Crustacean Issues* 11: 13–22.

Hobbs, H.; Pass, J. & Huner, J. (1989). A review of global crayfish introductions with particular emphasis on two North American species (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*, 56 (3), 299-316.

Holdich, D. (1987). The dangers of introducing alien animals with particular reference to crayfish. *Freshwater crayfish VII. Papers from the seventh international symposium of Astacology*, Pierre Goeldlin de Tifenau, ed, Musée Zoologique Cantonal. Não pag.

Holdich, D. & Lowery, R. (1988). *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. 1<sup>st</sup> ed. D.M. Holdich and R.S. Lowery, ed, Croom Helm. London & Sidney, 498.

Holdich, D. & Reeve, I. (1988). Functional morphology and anatomy. In: Freshwater Crayfish: Biology, Management, and Exploitation. 1<sup>st</sup> ed. D.M. Holdich and R.S. Lowery, ed, Croom Helm. London & Sidney, pp. 11–51.

Huner, J. & Avault Jr, J. (1979). Introductions of *Procambarus spp.* – A report to the introductions committee of the international Association of Astacology, fourth biennial meeting Thonon-les-Bains, France, 28-31 August 1978. In Freshwater crayfish IV. Papers from the fourth international symposium on freshwater crayfish, Pierre-J. Laurent, ed., Institut National de la Recherche Agronomique, 191-194.

Huner, J., Lindqvist, O. & Kononen, H. (1985). Effects of olding temperature on body conditions of starved adult noble crayfish, *Astacus astacus linne* (Decapoda, Astacidae), from central Finland. Department of Applied Zoology, University of Kuopio. 107-114.

Huner J. & Lindqvist, O. (1988). A stunted crayfish *Astacus astacus* population in Central Finland. Freshwater Crayfish 7: 156-165.

Huner, J. (1989). Overview of international and domestic freshwater crayfish production. J. Shellfish Research, 8, 259-265.

Huner, J.; Kononen H. & Lindqvist O. (1990). Variation in body composition and exoskeleton mineralisation as functions of the molt and reproductive cycles of the noble crayfish, *Astacus astacus* (Astacidae, Decapoda), from a pond in central Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96A (1), 235-240.

Huner, J. & Barr, J. (1991). Red swamp crawfish: Biology and exploitation. The Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.

Huner, J.; Henttonen, P. & Lindqvist, O. (1993). Effects of bilateral eyestalk ablation on juvenile noble crayfish, *Astacus astacus* (L.), in Central Finland. Freshwater Crayfish 9: 477-483.

Huner, J. (Ed.) (1994). Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation, Croom Helm Ltd, 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE.



- Huner, J.; Shelds, T.; Bohannon, J.; Konikoff, K., & Guilent, D. (1997). Reproduction in two species of Procambarid crawfishes, *Procambarus clarkia* (Girard, 1852) and *Procambarus zonangulus* (Hobbs and Hobbs 1990) in simulated burrows. *J. Shellfish. Research*, pp. 16: 318
- Ilhéu, M. & Bernardo J. (1993). Experimental evaluation of food preference of red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*: Vegetal versus animal; *Freshwater Crayfish* n°9.
- Ilhéu, M. & Bernardo, J. (1995). Trophic ecology of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) – Preferences and digestibility of plant foods. *Freshwater Crayfish* 10, 132-139.
- Ilhéu, M.; Acquistapace, P.; Benvenuto, C. & Gherardi, F.( 2003). Shelter use of the red-swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in a dry-season stream of South Portugal. *Arch. Hydrobiology* 157:535–546.
- Ilhéu, M. (2004). Patterns of fish habitat use in Mediterranean streams-type. PhD Thesis. University of Évora. Évora.
- Inui, Y. & Oshima, Y. (1966). Effect of starvation on metabolism and chemical composition of eels. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 32: 492-501.
- Jarboe, H. & Romaine, R. (1995). Effects of density reduction and supplemental feeding on stunted crayfish *Procambarus clarkii* populations in earthen ponds. *Journal of the World Aquaculture Society* 26:29-37.
- Jussila, J. & Mannonen, A. (1997). Marron (*Cherax tenuimanus*) and noble crayfish (*Astacus astacus*) hepatopancreas energy and its relation to moisture content, *Aquaculture*, 149, 157-161.
- Jussila, J. (1997a). Carapace mineralization and hepatopancreatic indices in natural and farmed populations of marron (*Cherax tenuimanus*) in Western Australia. *Marine and Freshwater Research*, **48**(1), 67–72.
- Jussila, J. (1997b). Physiological Responses of Astacid and Parastacid Crayfishes (Crustacea: Decapoda) to Conditions of Intensive Culture. Doctoral Dissertation. Kuopio University Publications, C. Natural and Environmental Sciences 67. Kuopio University Printing Office, Kuopio, Finland.

Jussila, J. (1999). Comparisson of Selected Condition Indices Between Intermolt and Post-Molt Marron, *Cherax tenuimanus*, of Different Feeding Status Raised Under Intensive Culture Conditions. *Journal of Applied Aquaculture*, 9:3, 57-66.

Khan, A.; Forester, D. & Mileke, H. (1995). Heavy metal concentrations in two populations of crayfish. *Veterinary and Human Toxicology* 37(5):426–8.

Keenan, S. & Alikhan, M. (1991). Comparative study of cadmium and lead accumulations in *Cambarus bartoni* (Fabricius) (Decapoda, Crustacea) from an acidic and a neutral lake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 47:91–6.

Laurent, P. & Forest, J. (1979).Donnes sur les écrevisses qu'on peu recontrer en France. *La Pisciculture Française* 15(56): 25-37.

Lindqvist, O. & Louekari, K. (1975). Muscle and hepatopâncreas weight in *Astacus astacus* L. (Crustacea, Astacidae) in the trapping season in Finland. *Annales Zoologici Fennici*, 12: 237-243.

Lindqvist, O. & Huner, J. (1999). Life history characteristics of crayfish: What makes some of them good colonizers? In: Gherardi F, Holdich DM, editors. *Crayfish in Europe as an Alien Species. How Make the Best in a Bad Situation?* AA Balkema, Rotterdam. pp 23–30.

Lowery, R.(1988). Growth Molting and Reproduction, In (D.M. Holdich and R.S. Lowery Eds.) *Freshw. Crayfish: Biol., Manag. Exploit.*, Timberpress, Portland, OR., pp: 83.113.

Lucic, A. & Erben, R. (2005). Seasonal Changes of the Condition Indices and heamocyte counts of the *Austropotamobius torrentium* population in Kraljevec stream, Croatia. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 376-377, 687-697.

Macbeth (1992). Musell soil color carts; Division of Kollmorgen Intruments corp

Mannonen, A. & Henttonen, P. (1995). Some observations on the condition of crayfish (*Astacus astacus* (L.) in a river affected by peat mining in central Finland. *Freshwater Crayfish*, 10, 274-281.

Mazlum, Y. & Eversole, A. (2000). Effects of flooding dates pn population dynamics in South Carolina ponds. *J. Applied. Aquaculture*, 10: 17-28.

- Mazlum, Y. (2005). Reproduction of Eastern White River Crayfish, *Procambarus acutus acutus* (Girard, 1852), in Two Different Habitats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(11), 933-936.
- McClain, W. (1995a). Effects of population density and feeding rate on growth and feeding consumption of red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. *Journal World Aquaculture Society*, 26 (1), 14-22.
- McClain, W. (1995b). Growth of crawfish *Procambarus clarkii* as a function of density and food resources. *Journal World Aquaculture Society*, 26(1), 24-28.
- McClain, W. (1999). *Effects of hypoxia on growth and survival of the crayfish Procambarus clarkii*. *Freshwater Crayfish* 12:121-133.
- Menezes, J. (2000). *Manual sobre doenças de peixes ósseos*. Publicações Avulsas do IPIMAR 3, Lisboa.
- Meyer, W.; Kretschmer, M.; Hoffmann, A. & Harisch, G. (1991). Biochemical and histochemical observations on effects of low level heavy metal load (lead, cadmium) in different organ systems of the freshwater crayfish, *Astacus astacus L.* (Crustacea: Decapoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21:137-56.
- Mills, B.; Morrissy, N. & Huner, J. (1994). Cultivation of freshwater crayfish in Australia. In: *Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe, and Australia*. Families Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae, pp. 217-291. Ed. J V Huner. Food Products Press: New York.
- Morrissy, N.; Caputi, N. & House, R. (1984). Tolerance of Marron (*Cherax Tenuimanus*) to hypoxia in relation to aquaculture; *Aquaculture* n°41; Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Musgrove, R. (1997). The effect of food availability on condition in juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. In: *Programme and Abstracts, The Fifth International Conference and Workshop on Lobster Biology and Management*. Queenstown, New Zealand, February. pp. 57.

Naqvi, S.; Flagge, C. & Hawkins, R. (1990). Arsenic uptake and depuration by red crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to various concentrations of monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45: 94–100.

Naqvi, S.; Devalraju, N. & Naqvi, N. (1998). Copper bioaccumulation and depuration by red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61: 65–71.

Ohio Environmental Protection Agency (Ohio EPA). (1987). *Biological criteria for the protection of aquatic life: volumes I-III*. Ohio Environmental Protection Agency, Columbus, Ohio.

Oliveira, J, & Fabião, A, (1998). Growth responses of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard 1852), to several diets under controlled conditions, *Aquaculture Research*.

Parvulescu, L.; Palos, C. & Molnar, P. (2009). First record of the spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817) (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) in Romania. *North-Western Journal of Zoology* Volume: 5 Issue: 2 Pages: 424-428.

Pearson, D. (1995). Selecting Indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 345: 75-79.

Rainbow, P. & White, S.L. (1989). Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, Cu and cadmium in decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174: 245–262.

Reynolds, J. D. & C. Souty-Grosset, (2003). CRAYNET: programme and potential. In Holdich, D. M. & P. Sibley (eds), *Management and Conservation of Crayfish*. Proceedings of a conference held on 7th November, 2002. Environment Agency, Bristol, 2–14.

Roldan, B. & Shivers, R. (1987). The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish (*Orconectes propinquus*) hepatopancreas and antennal gland. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86C:201–14.

- Sánchez-López, F.; Gil, M.; Martínez, J.; Aquilera, P. & Garrido, P. (2004). Assessment of metal contamination in Doñana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environ Monitoring and Assessment* 93:17–29.
- Schafer, H. (1968). Storage materials utilized by starved pink shrimp *P. duorarum* Burkenroad. *FAO Fisheries Report* 57:393-403.
- Schilderman, P.; Moonen, E.; Maas, L.; Welle, I. & Kleinjans, J. (1999). Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of the River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44:241–52.
- Schrif, V.; Turner, P.; Selby, L.; Hannapel, C.; De La Cruz, P. & Dehn, P. (1987). Nutritional status and energy metabolism of crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852) muscle and hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology* 88A (3), 383–386.
- Siemann, E.; Tilman, D.; & Haarstad, J. (1996). Insect species diversity, abundance and body size relationships. *Nature-London*. 380: 704-706.
- Soofiani, N. & Hawkins, A. (1985). Field studies on energy budgets. *in* P. Tyler and P. Calow, eds. *Fish Energetics: New Perspectives*. Croom Helm, London. 283-308.
- Speck, U. & Urich, K. (1969). Consumption of body constituents during starvation in the crayfish *Orconectes limosus*. *Z vergl Physiol* 63: 410-414.
- Steffens, W. (1989). *Principles of Fish Nutrition*. Ellis Horwood, New York, P. 139-145.
- Suárez-Serrano, A.; Alcaraz, C.; Ibáñez, C.; Trobajo, R. & Barata, C. (2010). *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 280-286.
- Suprunovich, A.; Kadriuk, R.; Petkevich, T.; Stepaniuk, I.; Lisovskaya, W. & Antsupova, L. (1983). Biochemical characteristics of the Dniester long-clawed crayfish of Astacidae family. *Freshwater Crayfish* 5: 490-533.
- Trendall, J. & Prescott, J. (1989). Severe physiological stress associated with the annual breeding emigration of *Panulirus ornatus* in the Torres Strait. *Marine Ecology Progress Series*, 58: 29-39.

Trouilhé, M.; Ricard, F.; Parinet, B.; Grandjean, F. & Souty-Grosset, C. (2003). Management of the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) in Western France: abiotic and biotic factors study. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 370-371: 97–114.

Tytler, P. & Calow, P. (1985). *Fish energetic: new perspectives*. Taylor & Francis (ed.). 349 pp.

Van der Ham, J. & Huner, J. (2006). Variation in Color of the Hepatopancreas of Mature Female Red Swamp Crawfish, *Procambarus clarkia*, As It Relates to the Physiological Condition of This Organ. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 37, No. 1, 132-135

Vilá, M. & Garcia-Berthou, E. (2010). Monitoring Biological Invasions in Freshwater Habitats. *Conservation Monitoring in Freshwater Habitats, Part 2*, 91-100.

Vigneux, E. & Souty-Grosset, C. (2000). Préface. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 356(1): 1–2.

Vogt, G.; Storch, V.; Quintinio, E. & Pascual, F. (1985). Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48:1-12.

Wen, X.; Chen, L.; Ai, C.; Zhou, Z. & Jiang, H. (2001). Variation in lipid composition of Chinese mitten-handede crab, *Eriocheir sinensis* during ovarian maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130B: 95-104.

Wen, X.; Yaomei, K. & Kaiya, Z. (2007). Starvation on changes in growth and fatty acid composition of juvenile red swamp crawfish, *Procambarus clarkia*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, Vol. 25, No.1, 97-105.

Whitfield, J. (2001). Vital signs. *Nature*, 411 (28): 989-990.

Wright, D.; Welbourn, P. & Martin, A. (1991). Inorganic and organic mercury uptake and loss by the crayfish *Orconectes propinquus*. *Water, Air, and Soil Pollution* 56: 697–707.

# **Anexos**

|

# **Protocolo laboratorial**

## **Material**

- Luvas de latex;
- Bata;
- Tábua para processamento das amostras;
- Mala térmica;
- Gelo;
- Máquina Fotográfica;
- Réguas plásticas (mínimo 15 cm);
- Balança de precisão;
- Folhas de alumínio individuais devidamente identificadas para colocação das amostras;
- Eppendorfs devidamente identificados para colocação das amostras;
- Kit de dissecação (tesoura, bisturi e pinça);
- Escala de Munsell;
- Recipiente com azoto líquido para armazenar as amostras;
- Lápis;
- Etiquetas;
- Panos;
- Sacos de plástico;
- Água destilada;
- Caixa de Primeiros Socorros;



## **Procedimento**

### ***Preparação do Material***

Identificar dois eppendorfs e quatro folhas de alumínio (duas folhas para colocar respetivamente o hepatopâncreas e uma amostra de tecido muscular e duas folhas para envolver dois eppendorfs contendo respetivamente uma amostra de hepatopâncreas e uma amostra de tecido muscular) por cada indivíduo a dissecar, com os respetivos dados:

- Nome da espécie;

- Número de identificação do indivíduo;

- Identificação do tipo de amostra:

HEP para *hepatopâncreas*, num eppendorf e em duas folhas de alumínio (uma para o hepatopâncreas e outra para envolver o eppendorf);

M para *tecido muscular*, noutra eppendorf e em duas folhas de alumínio (uma para a amostra de tecido muscular e outra para envolver o eppendorf);

- Data da recolha;

Pesar as folhas de alumínio, antes de colocar o hepatopâncreas e a amostra de tecido muscular, de forma a retirar o valor da tara de cada folha;

### ***Preparação dos indivíduos***

Retirar cada indivíduo separadamente, de cada réplica em estudo, identificar o número do indivíduo, pesar, medir e registar os dados obtidos;

Preencher metade da caixa térmica com gelo, de forma que o fundo fique coberto de forma uniforme;

Colocar o indivíduo no interior da caixa, tapando posteriormente com o restante gelo e selar a caixa;

Aguardar entre uma a duas horas e retirar cada indivíduo da mala térmica de forma a proceder-se à sua dissecação e correspondente recolha de amostras;

Remover uma pinça de cada indivíduo, colocar num saco de plástico individual com uma etiqueta com a corresponde identificação descrita anteriormente;

### ***Método de Remoção do hepatopâncreas***

Remover o hepatopâncreas abrindo a parte dorsal do exosqueleto que cobre o cefalotórax, utilizando uma tesoura;

Com uma pinça, remover cuidadosamente o músculo e restante tecido que cobre o hepatopâncreas e, finalmente, remova o hepatopâncreas para uma folha de alumínio devidamente identificada;

#### ***Método de Remoção de tecido muscular***

Remover o músculo abdominal através de um corte inicial das membranas que ligam o abdômen e o cefalotórax, utilizando uma tesoura;

Remover cuidadosamente o abdômen com o tecido muscular que se estende até ao cefalotórax incluído, através do corte da membrana ventral abdominal, colocando-o posteriormente numa folha de alumínio devidamente identificada;

#### ***Pesagem das amostras***

Colocar cada folha de alumínio individualmente, na balança de precisão, retirar respetivamente o valor correspondente ao peso obtido do hepatopâncreas e do tecido muscular;

Remover uma amostra do hepatopâncreas recolhido para o interior de um eppendorf, utilizando uma pinça;

Remover uma amostra do tecido muscular recolhido para o interior de um eppendorf, utilizando uma pinça;

Pesar novamente a folha contendo o hepatopâncreas e a folha contendo o tecido muscular, de forma a verificar qual a quantidade de amostra que foi retirada;

#### ***Classificação de acordo com a escala de Munsell***

Observação das amostras para num local com boa iluminação natural. Caso não seja possível, recorrer a iluminação artificial, (luz branca).

Registar os dados da coloração relativos à observação efetuada;

#### ***Armazenamento das amostras***

Armazenar, em azoto líquido, as amostras obtidas, de acordo com a seguinte distribuição:

- Separador Branco: amostras de tecido muscular;
- Separador Azul: pinças;
- Separador Laranja: amostras de hepatopâncreas;

Após efetuar todos estes procedimentos, efetuar a respectiva limpeza e desinfeção do material utilizado e da área de trabalho.

## Ficha Laboratorial

Identificação do Local de Processamento			
Local:		Responsável:	
Data:		Hora Processamento:	
Caracterização do Indivíduo			
Indivíduo nº:	Género: M ___ F ___	Peso vivo(g):	Tamanho (cm):
Caracterização hepatopâncreas			
Tara (mg):		Peso <sub>hep.total</sub> (mg):	
Peso <sub>hep.DNA</sub> (mg):		Peso <sub>hep.húmido</sub> (mg):	
COR:		SIGLA:	VALUE/CHROMA:
Caracterização tecido muscular			
Tara (mg):		Peso <sub>t.musc.total</sub> (mg):	
Peso <sub>t.musc.DNA</sub> (mg):		Peso <sub>t.musc.húmido</sub> (mg):	

Identificação do Local de Processamento			
Local:		Responsável:	
Data:		Hora Processamento:	
Caracterização do Indivíduo			
Indivíduo nº:	Género: M ___ F ___	Peso vivo(g):	Tamanho (cm):
Caracterização hepatopâncreas			
Tara (mg):		Peso <sub>hep.total</sub> (mg):	
Peso <sub>hep.DNA</sub> (mg):		Peso <sub>hep.húmido</sub> (mg):	
COR:		SIGLA:	VALUE/CHROMA:
Caracterização tecido muscular			
Tara (mg):		Peso <sub>t.musc.total</sub> (mg):	
Peso <sub>t.musc.DNA</sub> (mg):		Peso <sub>t.musc.húmido</sub> (mg):	

Identificação do Local de Processamento			
Local:		Responsável:	
Data:		Hora Processamento:	
Caracterização do Indivíduo			
Indivíduo nº:	Género: M ___ F ___	Peso vivo(g):	Tamanho (cm):
Caracterização hepatopâncreas			
Tara (mg):		Peso <sub>hep.total</sub> (mg):	
Peso <sub>amostra</sub> (mg):		Peso <sub>hep.húmido</sub> (mg):	
COR:		SIGLA:	VALUE/CHROMA:
Caracterização tecido muscular			
Tara (mg):		Peso <sub>t.musc.total</sub> (mg):	
Peso <sub>amostra</sub> (mg):		Peso <sub>t.musc.húmido</sub> (mg):	