



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR - LABOMAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

TEREZA EMANUELLE DA SILVA COSTA

**CICLO REPRODUTIVO DE *Eudistoma vannamei* MILLAR, 1977 (ASCIDIACEA:
POLYCITORIDAE) E SUA INFLUÊNCIA NO METABOLISMO PRIMÁRIO**

FORTALEZA

2011

TEREZA EMANUELLE DA SILVA COSTA

**CICLO REPRODUTIVO DE *Eudistoma vannamei* MILLAR, 1977 (ASCIDIACEA:
POLYCITORIDAE) E SUA INFLUÊNCIA NO METABOLISMO PRIMÁRIO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, LABOMAR – Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de MESTRE em Ciências Marinhas Tropicais. Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientador: Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

FORTALEZA

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

C876c Costa, Tereza Emanuelle da Silva.

Ciclo produtivo de *Eudistoma Vannamei* Millar, 1977 (ASCIDIACEA: POLYCITORIDAE) e sua influência no metabolismo primário / Tereza Emanuelle da Silva Costa. – 2013.
70 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.
Orientação: Prof^o. Dr^o. Tito Monteiro da Cruz Lotufo.

1. Ascídia - Fisiologia. 2. Ácidos graxos. 3. Espectrometria de massas. I. Título.

CDD 596.2

TEREZA EMANUELLE DA SILVA COSTA

CICLO REPRODUTIVO DE *Eudistoma vannamei* MILLAR, 1977 (TUNICATA,
ASCIDIACEA) E SUA INFLUÊNCIA NO METABOLISMO PRIMÁRIO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, LABOMAR – Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, área de concentração em Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gustavo Muniz Dias

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Profa. Dra. Helena Matthews Cascon

Universidade Federal do Ceará – UFC

À minha melhor amiga, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me mostrar que fé não se resume a uma única palavra, mas sim a um conjunto de sentimentos e ações que se renovam a cada dia, não me deixando desistir da batalha.

À minha mãe, hoje e sempre, por me mostrar diariamente através de sua história de vida, princípios e valores que a transformaram na grande mulher que é. Uma vencedora.

Ao prof. Dr. Tito Lotufo por não ser apenas um orientador, mas um mentor que está presente de uma forma não obstrutiva: para esclarecer, assistir e encorajar, permitindo que se aprenda a lição mediante cada desafio.

Ao prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela oportunidade concedida no estágio realizado no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), em Ribeirão Preto (SP). Agradeço por me permitir realizar parte dos experimentos em seu laboratório, um período de grande aprendizagem.

À Cristina, técnica do laboratório de Química Orgânica de Ribeirão, por toda atenção, ensinamentos e amizade durante o estágio.

Ao técnico Tomás, também pertencente ao laboratório de Química Orgânica de Ribeirão, homem de grande coração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), órgão financiador da bolsa concedida durante estes dois anos de estudos.

Ao Instituto de Ciências do Mar e a todos que o fazem.

A todos os amigos e amigas que passaram pelo LECA, e aos que atualmente o fazem proporcionando um ambiente de trabalho harmonioso.

A todos os amigos e amigas dos laboratórios Equal (Efluentes e Qualidade de Água) e Ecotox (Ecotoxicologia Marinha), sob orientação das professoras Sandra Santaella e Leticia Costa-Lotufo, respectivamente.

Ao amigo Luiz Bezerra (Buda) pela produção do mapa da área de estudo, e amizade.

Ao amigo Elton Luz, do laboratório de química da UFC, por ajudar com minhas tantas dúvidas sobre espectrometria e ácidos graxos.

Ao amigo Raimundo Júnior, especialmente sua mãe Vanda e sua irmã Paula, por me receberem sempre em suas casas durante minhas coletas. Serei eternamente grata.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

“Para cultivar a sabedoria é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.” (Dalai Lama)

RESUMO

A espécie de ascídia *Eudistoma vannamei* é endêmica do nordeste brasileiro, sendo encontrada na zona entremarés dos recifes costeiros, uma das espécies mais abundantes da fauna incrustante. No presente trabalho foi estudado o período reprodutivo desta espécie, procurando-se ainda relacionar variações nos teores de ácidos graxos com os eventos do ciclo reprodutivo. Para tal foram realizadas coletas bimensais na praia de Flecheiras, no Município de Trairi, Ceará, desde dezembro de 2007 até junho de 2010. Em cada coleta eram retiradas 10 colônias, num total de 200 colônias obtidas ao final do período estudado. Das primeiras 120 colônias coletadas, parte do material seguiu um processo de extração química em metanol e posterior partição em hexano. Todas as colônias foram examinadas quanto ao seu estado reprodutivo a partir da remoção de 10 zoóides, classificados quanto ao desenvolvimento das gônadas e presença de ovos ou larvas incubados na cavidade atrial. As partições hexânicas dos extratos da ascídia seguiram para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para determinação da composição dos ácidos graxos. Os resultados obtidos indicaram que a avaliação do desenvolvimento gonadal não foi um bom indicativo do esforço reprodutivo. A presença de ovos e larvas na cavidade atrial, por outro lado, foi um indicador mais confiável revelando um período reprodutivo contínuo, com maior intensidade nos meses de dezembro a abril, coincidindo com a estação chuvosa da região. Quanto aos ácidos graxos, foram identificadas 32 tipos, dentre os quais os ácidos mirístico, palmítico, margárico, esteárico, palmitoléico, oléico e gondóico foram os componentes majoritários. Uma análise utilizando um modelo linear generalizado indicou uma correlação entre os ácidos mirístico e esteárico com o número de zoóides apresentando larvas ou ovos incubados na cavidade atrial.

Palavras-chave: Ascídia - Fisiologia. Ácidos graxos. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

The ascidian *Eudistoma vannahmei* is endemic to the Brazilian Northeast region, where it is found in the intertidal areas of coastal reefs, is considered one of the most abundant species of the encrusting fauna. This work presents data on the reproductive period of the species, also aiming to relate variations in the fatty acid composition to events on the reproductive cycle. For this study 10 colonies of the species were collected bimonthly at Flecheiras beach, Trairi city, Ceara state, from December 2007 to June 2010. A total of 200 colonies were collected, preserved and taken to the laboratory. For the study of the reproductive period 10 zooids were dissected from each colony and classified according to the development of the gonads and the presence of larvae or eggs in the atrial cavity. From the first 120 samples, part of the colony was separated and submitted to extraction in methanol, with a later partition in hexane. The hexanic partition was analyzed through gas chromatography coupled to mass spectrometry for determination of the fatty acid composition. The analysis of gonadal development was not a good indicator for reproductive effort. On the other hand, the presence of larvae or eggs was a more reliable marker, showing a continuous reproduction for the species, with a peak of effort between December and April, coinciding with the rainy season for the region. As to the fatty acids, a total of 32 different types were identified, out of which the miristic, palmitic, margaric, stearic, palmitoleic, oleic and gondoic acids were the major components. The analysis with a generalized linear model indicated a correlation for the miristic and stearic acids with the number of zooids with larvae or eggs in the atrial cavity.

Keywords: Ascidian. Physiology. Fatty acids. Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diferença estrutural em ascídias. A: anatomia interna de uma ascídia solitária (Fonte: Brusca; Brusca, 2003); B – arranjo dos zoóides em uma ascídia colonial (Fonte: Monniot; Monniot; Laboute, 1991)	15
Figura 2 – Área de estudo: Praia de Flecheiras, Trairi, Ceará, Brasil.....	23
Figura 3 – Local de amostragem durante as baixamares de sizígia.....	24
Figura 4 – Morfologia externa de <i>Eudistoma vannamei</i> (Foto: Acervo pessoal).....	25
Figura 5 – Coleta de <i>E. vannamei</i> durante a maré baixa; A) Localização das colônias; B) Disposição da colônia no substrato; C- D) Processo de triagem e retirada de epibiontes.....	25
Figura 6 – Esquema do procedimento utilizado durante separação de material para análise biológica e química.....	26
Figura 7 – Esquema dos procedimentos utilizados para a extração química dos metabólitos.....	28
Figura 8 – Esquema indicando os procedimentos utilizados no tratamento inicial dos extratos hexânicos.....	30
Figura 9 – Percentuais relativos aos estágios de maturação do total de zoóides observados em cada mês de coleta, indicando a ocorrência de gônadas maduras (GM), gônadas imaturas (GIM) e gônadas ausentes (GA).....	33
Figura 10 – Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) com gônadas ausentes durante o período observado.....	34
Figura 11 – Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando gônadas imaturas durante o período observado.....	35
Figura 12 – Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando gônadas maduras durante o período observado.....	36
Figura 13 – Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando larvas e ovos durante o período observado.....	37
Figura 14 – Variação apresentada pelo ácido mirístico C14:0 para o período amostrado.....	43
Figura 15 – Variação apresentada pelo ácido palmítico C16:0 para o período amostrado.....	44
Figura 16 – Variação apresentada pelo ácido margárico C17:0 para o período amostrado.....	45
Figura 17 – Variação apresentada pelo ácido esteárico C18:0 para o período amostrado.....	46
Figura 18 – Variação apresentada pelo ácido palmitoléico C16:1 para o período amostrado.....	47
Figura 19 – Variação apresentada pelo ácido oléico C18:1 para o período amostrado.....	48
Figura 20 – Variação apresentada pelo ácido gondóico C20:1 para o período amostrado.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de ácidos graxos encontrados em <i>Eudistoma vannamei</i> , indicando a nomenclatura utilizada, número de átomos de carbono, duplas ligações e ramificações para cada ácido graxo.....	38
Tabela 2 – Resultados da análise pelo Modelo Linear Generalizado (GLZ), para a relação com o número de zoóides portando larvas ou ovos. Em negrito os valores significativos.....	50

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ω	Omega
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
AG	Ácido graxo
CG	Cromatografia gasosa
cm	Centímetro
EM	Espectrometria de massas
eV	Elétron-volt
km	Quilômetro
M	Molar
m	Metro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/v	Massa/volume
m/z	Massa/carga
MeOH	Álcool metílico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
TR	Tempo de retenção
X	Vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. As Ascídias.....	15
1.2. Processo Reprodutivo.....	17
1.3. Compostos lipídicos.....	19
2. OBJETIVO	22
2.1. Geral.....	22
2.2. Específicos.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Área de Estudo.....	23
3.2. Coleta dos exemplares.....	24
3.3. Análise biológica.....	26
3.4. Análise química.....	27
3.4.1. Obtenção dos extratos.....	27
3.5. Análise dos compostos lipídicos.....	28
3.5.1. Tratamento inicial dos extratos hexânicos.....	28
3.5.2. Análise Cromatográfica.....	30
3.5.3. Identificação dos ácidos graxos.....	31
3.6. Análise dos dados.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Ciclo Reprodutivo.....	33
4.2. Composição lipídica: Ácidos graxos.....	37
4.3. Ácidos graxos e ciclo reprodutivo.....	49
5. DISCUSSÃO.....	51
5.1. Aspectos Reprodutivos.....	51
5.2. Ácidos graxos.....	52
5.3. Reprodução e Ácidos Graxos.....	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. APÊNDICE.....	62
8.1. APÊNDICE A – Periodicidade das coletas em função da variação das marés.....	62
8.2. APÊNDICE B – Número de zoóides identificados quanto ao estágio de maturação gonadal em cada amostra. AG: ausência de gônadas; GIM: gônadas em início de maturação; GM: gônadas maduras; LV/OV: larvas e ovos; – ausência de análise biológica.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Ascídias

As ascídias constituem um grupo importante de invertebrados marinhos, sendo encontradas amplamente em todos os oceanos. Todas possuem hábito bentônico, vivendo fixadas a diferentes tipos de substrato, passando despercebidas ou evidenciando colorações exuberantes (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). Ascidiacea é o táxon mais representativo de Tunicata, composto por aproximadamente 3000 espécies (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991; LAMBERT, 2005b).

Seus representantes podem ser distinguidos por duas formas estruturais: ascídias solitárias, consistindo em um único indivíduo revestido por uma túnica, e ascídias coloniais, em que vários indivíduos, denominados zoóides, compartilham uma túnica comum (Figura 1A e B). Ambas apresentam um sifão oral ou branquial, responsável por receber um fluxo contínuo de água contendo partículas alimentares, detritos e oxigênio, e um sifão atrial, responsável pela saída de água junto a fezes e detritos não assimiláveis. A cavidade atrial por vezes é utilizada como câmara incubadora no processo reprodutivo.

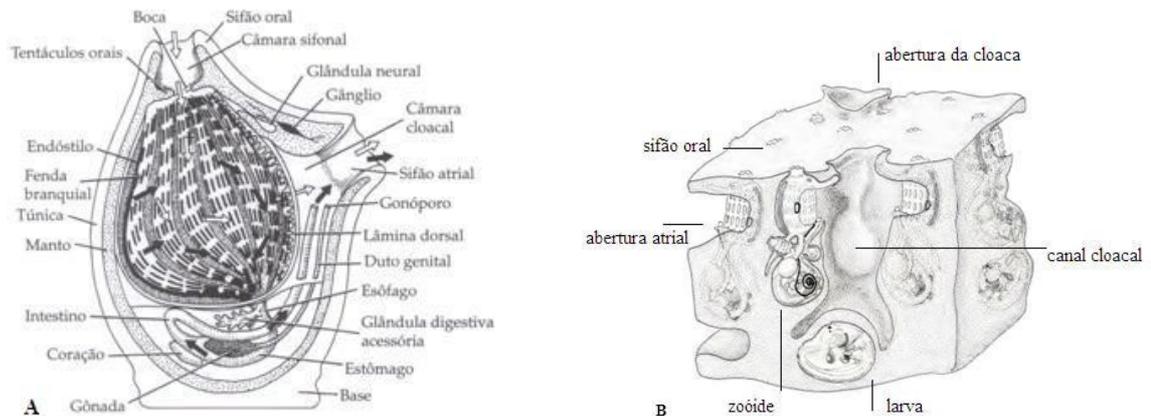


Figura 1– Diferença estrutural em ascídias. A: anatomia interna de uma ascídia solitária (Fonte: Brusca; Brusca, 2003); B – arranjo dos zoóides em uma ascídia colonial (Fonte: Monniot; Monniot; Laboute, 1991).

Na última década o número de pesquisas sobre o táxon ganhou maiores proporções, inclusive com a realização de reuniões científicas exclusivamente sobre o grupo. A primeira delas culminou com uma série de artigos reunida sob a forma de um livro, destacando diferentes aspectos utilizados para compreensão da biologia das ascídias (SAWADA; YOKOSAWA; LAMBERT, 2001). Outros pesquisadores, no entanto, abordaram revisões sobre os protocordados expondo antigas discussões, e realçando a importância ecológica dos Ascidiacea (LAMBERT, 2005a; LAMBERT, 2005b).

No Brasil, Rodrigues (1964) já fazia referência ao pouco conhecimento das ascídias encontradas em nosso litoral, visto que os trabalhos existentes eram essencialmente de cunho taxonômico. Aspectos mais ecológicos foram destacados por Rocha (1988; 1991; 1993), Lotufo (1997), Rocha, Lotufo, Rodrigues (1999), Dias (2004; 2008), Gama (2006), Oliveira (2007; 2010), e Rocha *et al.* (2009).

A presença da família Polycitoridae tem sido evidenciada em vários locais do litoral brasileiro, com grande participação de espécies do gênero *Eudistoma*, bastante comum em regiões tropicais. Dentre os estudos que abordam este gênero há levantamentos de espécies e distribuição (MILLAR, 1977; ROCHA, 1993; RODRIGUES; ROCHA; LOTUFO, 1998; LOTUFO, 2002; ROCHA; FARIA, 2005; ROCHA; MORENO; METRI, 2005; LOTUFO; SILVA, 2006; ROCHA; METRI; OMURO, 2006; OLIVEIRA-FILHO, 2010), estudos comportamentais e de recrutamento (ROCHA, 1993; GAMA *et al.*, 2006) e outros abordando aspectos pouco conhecidos sobre composição química (JIMENEZ *et al.*, 2003; JIMENEZ, 2004; TAKEARA, 2006; JIMENEZ *et al.*, 2008).

O gênero é composto por espécies coloniais cujos zoóides apresentam tórax curto com três fileiras de fendas e um longo pedúnculo esofágico-retal. As colônias apresentam diferenças em sua forma e estrutura, fator que tem recebido maior atenção dos taxonomistas durante a identificação das espécies (VAN NAME, 1945; KOTT, 1990; LOTUFO, 2002).

A espécie *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 é endêmica do litoral nordestino brasileiro, sendo um dos organismos mais abundantes nos afloramentos rochosos do litoral cearense (LOTUFO; SILVA, 2006). As colônias são formadas por várias cabeças pedunculadas (cormídios), unidas por uma base comum aderida ao substrato (MILLAR, 1977). Em trabalhos de bioprospecção, a espécie tem apresentado metabólitos com atividade citotóxica (JIMENEZ *et al.*, 2003; JIMENEZ, 2004; TAKEARA, 2006; JIMENEZ *et al.*, 2008).

1.2. Processo Reprodutivo

A reprodução é um dos processos biológicos mais importantes para a manutenção e crescimento de uma determinada população, podendo ser condicionada por uma reprodução sexuada, estimulando a variabilidade genética, ou por uma reprodução assexuada em que a variabilidade genética torna-se reduzida ou ausente (LEVINTON, 2001).

Nas ascídias, a reprodução pode ocorrer assexuadamente por brotamento ou fissão de colônias, e sexuadamente com a liberação dos gametas, fecundação interna e incubação do embrião até a formação completa da larva. Essa última forma ocorre para todo o táxon, enquanto que as duas primeiras estão restritas a algumas famílias ou a poucas espécies, respectivamente (MILLAR, 1971). A fecundação interna ocorre em algumas espécies solitárias, porém a grande maioria libera os gametas na água para fecundação externa. Já as formas coloniais se utilizam de diferentes estratégias de incubação, utilizando a cavidade atrial, bolsas especializadas ou a própria túnica. A fertilização cruzada é típica, mas em alguns casos também pode ocorrer autofertilização (KOTT, 1990).

As ascídias são hermafroditas, com raras exceções, apresentando órgãos sexuais com formato e localização distintos entre os sexos. Nas ascídias coloniais da família Polycitoridae, as gônadas estão situadas no abdome, junto à alça intestinal, e tanto o espermiduto quanto o ouviduto acompanham o intestino abrindo-se na cavidade atrial, próximos ao ânus. Em outras espécies coloniais, as gônadas podem ser encontradas dentro de uma bolsa ou fazendo parte de um pós-abdome, enquanto que nas formas solitárias, elas normalmente estão junto à face interna da parede do corpo (VAN NAME, 1945; MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991).

A formação de uma larva girinóide demonstra o processo de desenvolvimento indireto das ascídias. A forma larval é livre-natante, lecitotrófica, e somente nelas estão presentes algumas das sinapomorfias dos cordados: notocorda, tubo nervoso dorsal e cauda pós-anal. A cauda, juntamente com a notocorda, é perdida durante o processo de metamorfose, enquanto que o tubo nervoso é reduzido a um pequeno gânglio situado na porção anterior entre os sifões, e as poucas fendas faríngeas da larva tornam-se uma ampla faringe perfurada, denominada saco ou cesta branquial (MONNIOT; MONNIOT; LABOUTE, 1991). Nas espécies coloniais a liberação das larvas pode ocorrer de diferentes maneiras, de acordo com o tipo de incubação. Normalmente, o desenvolvimento dos embriões está restrito à região do tórax, mais precisamente na cavidade atrial, onde a larva completamente formada irá sair através do sifão atrial ou da cavidade cloacal comum (MILLAR, 1971).

A densidade de larvas disponibilizada pela colônia e a capacidade de cada uma em localizar e conseguir espaço disponível sobre um determinado substrato são fatores que garantirão o sucesso reprodutivo, assim como a colonização de uma nova área. Após o assentamento, a larva sofrerá um processo de metamorfose que a transformará numa forma adulta, sexualmente madura (HURLBUT, 1992). O tempo de natação das larvas até sua fixação é bastante variável, podendo durar desde alguns minutos a alguns dias. Num primeiro momento ocorre fototaxia positiva, mas esta é logo substituída por uma fototaxia negativa, havendo mudanças de direção e busca por locais mais sombreados para a fixação. Experimentos para avaliar as diferenças de desempenho das larvas de ascídias foram feitas por McHenry (2005).

Com intuito de se compreender melhor sua biologia, pesquisadores passaram a observar o ciclo reprodutivo das ascídias em diferentes localidades. Dentro dessa abordagem pode-se citar os trabalhos de Millar (1952; 1954; 1958b; 1971; 1974), Goodybody (1961), Yamaguchi (1975), Turon (1988), Turon e Becerro (1992), Durante e Sebens (1994), López-Legentil *et al.* (2005), Lambert (2005a), Lambert (2005b), Hirose *et al.* (2007) e Epelbaum *et al.* (2009). No Brasil, o tema foi abordado inicialmente por Rocha (1988; 1991), relatando aspectos ecológicos de espécies coletadas em São Sebastião (SP). Posteriormente, vieram os trabalhos com *Phallusia nigra* (ROCHA; LOTUFO; RODRIGUES, 1999) para a mesma região, e com *Didemnum rodriguesi* (RITZMANN; ROCHA; ROPER, 2009), coletada na ilha do Arvoredo (SC).

Diferentes fatores ambientais podem influenciar a reprodução desses organismos, mas a temperatura parece ser o principal deles (MILLAR, 1971; YAMAGUCHI, 1975; TURON, 1988; ROCHA, 1991). A sazonalidade da reprodução sexual foi acompanhada em três espécies coloniais de *Trididemnum* em águas subtropicais do Japão. Os resultados mostraram ausência de gônadas ou embriões durante a estação fria, enquanto que para a estação mais quente as gônadas foram encontradas em vários meses, exibindo picos reprodutivos diferentes entre as espécies. A disponibilidade de alimento pareceu não ser um fator crítico, confirmando a temperatura como principal fator atuante na sazonalidade reprodutiva das espécies (HIROSE *et al.*, 2007).

Na América do Norte, Epelbaum *et al.* (2009) mostraram que a temperatura e a salinidade afetam não só a reprodução, mas também o crescimento, a sobrevivência e a distribuição de ascídias coloniais do gênero *Botryllus*, não nativas de Colúmbia Britânica, Canadá. Foi observado que as espécies invasoras *Botryllus schlosseri* e *Botryllus violaceus* apresentaram uma ampla tolerância a variações de temperatura e salinidade, aumentando a

capacidade delas em habitar novas áreas. A reprodução em *Botryllus schlosseri* ocorreu em intervalos de temperatura entre 20 e 25° C e salinidade entre 20 e 28, com máxima atividade sexual em 25°C e salinidade 26.

Dentre os membros da família Polycitoridae, *Cystodytes* é o gênero que tem tido maior atenção quanto ao ciclo reprodutivo. Na região do Mediterrâneo, *Cystodytes* spp., representada por dois morfotipos (azul e lilás), apresentou zoóides com gônadas durante todo o ano, mas exibindo uma certa tendência sazonal. A fase de reprodução sexual com liberação de larvas ocorreu principalmente durante a primavera e verão, sendo posteriormente substituída por uma fase de crescimento assexuado, composta por fusões e fissões (LÓPEZ-LEGENTIL *et al.*, 2005).

Em regiões mais quentes, tem sido evidenciada reprodução ao longo de todo o ano, com maior esforço em períodos com variações bruscas de sazonalidade (MILLAR, 1971; ROCHA, 1991). No Brasil, as regiões Sudeste e Sul apresentam uma variação climática decorrente das estações do ano bem mais evidente do que as regiões Norte e Nordeste, que por sua vez diferenciam eventos ecológicos com base nas estações secas e chuvosas. O ciclo de vida da espécie colonial *Didemnum rodriguesi*, coletada no estado de Santa Catarina (região sul do país), tem indicado alternâncias entre uma reprodução sexuada no verão (dezembro-março), e uma reprodução assexuada no inverno (junho-setembro). A fase assexuada, composta por fragmentações e fissões, promoveu um incremento das taxas de crescimento e sobrevivência dos zoóides (RITZMANN; ROCHA; ROPER, 2009).

1.3. Compostos lipídios

Nas últimas décadas, a análise de compostos lipídicos presentes em organismos marinhos ganhou maior atenção dos pesquisadores. Os ácidos graxos tornaram-se excelentes ferramentas investigativas em estudos de metabolismo primário, indicando não só aspectos ligados à fisiologia dos animais, mas também às preferências tróficas de cada grupo, como bem visto para crustáceos de regiões polares (GRAEVE; KATTNER; PIEPENBURG, 1997; GRAEVE; DAUBY; SCAILTEUR, 2001; AUDEL *et al.*, 2002; STUBING; HAGEN; SCHMIDT, 2003; JU; HARVEY, 2004).

Espécies de diferentes táxons coletadas na região Ártica foram analisadas para identificação dos compostos lipídicos, mostrando variações na composição de ácidos e alcoóis graxos entre os táxons e dentro das mesmas espécies, como visto para o ofiuróide *Ophiopleura borealis*, coletado em duas regiões distintas e em tempos diferentes. A

composição dos AG de todos os grupos observados foi destacada pelo ácido graxo saturado 16:0 (palmítico) e pelos ácidos graxos poliinsaturados 20:5 ω -3 (eicosapentaenóico- EPA) e 22:6 ω -3 (docosahexaenóico- DHA), todos comuns em organismos marinhos (GRAEVE; KATTNER; PIEPENBURG, 1997).

Os esteróis marinhos são outra classe de compostos lipídicos bastante utilizados em estudos de ecologia química. Desempenham diferentes funções no organismo, garantindo a fluidez das membranas celulares e atuando como precursores de outras classes de esteróis, principalmente polihidroxilados (KERR; BAKER, 1991). A presença de esteróis é bastante conhecida em poríferos, a exemplo das esponjas calcárias, que apresentam grande diversidade de estruturas utilizadas atualmente como marcadores quimiotaxonômicos, resolvendo questões filogenéticas existentes no táxon (KERR; BAKER, 1991; HAGEMANN *et al.*, 2008).

Estudos de composição lipídica têm sido reportados para os tunicados, proporcionando maior discussão sobre aspectos ainda poucos conhecidos (DEIBEL *et al.*, 1992; PALERMO *et al.*, 1996; SANINA; KOSTETSKY, 2001; SLANTCHEV *et al.*, 2002; VIRACAOUNDIN *et al.*, 2003; PUCCIA *et al.*, 2005; TAKEARA, 2006; MAYZAUD *et al.*, 2007; TAKEARA *et al.*, 2007; DAGORN *et al.*, 2010). Em ascídias, alguns estudos já mostraram que o componente lipídico majoritário é uma mistura com colesterol (PALERMO *et al.*, 1996; SLANTCHEV *et al.*, 2002; TAKEARA *et al.*, 2007). Palermo *et al.* (1996) mostraram que a ascídia patagônica *Polyzoa opuntia* possui uma composição altamente complexa de esteróis, tendo sido identificados 24 compostos. Slantchev *et al.* (2002) mostraram diferenças importantes na composição de extratos lipofílicos entre as espécies *Styela* sp. e *Phallusia* sp., sendo identificados ao todo, 16 misturas de esteróis, 34 compostos voláteis, além da composição de ácidos graxos. Já na ascídia colonial *Didemnum psammatoedes*, coletada no litoral cearense, os principais constituintes químicos identificados foram os esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol (TAKEARA *et al.*, 2007).

Modificações no comportamento termotrópico e na composição das cadeias de ácidos graxos fosfolipídicos em diferentes épocas do ano foram demonstradas para a ascídia *Halocynthia aurantium*, coletada durante o verão e o inverno, e isolados dos músculos, gônadas, glândulas digestivas e cesta branquial (SANINA; KOSTETSKY, 2001). Dagorn *et al.* (2010) analisaram a distribuição fosfolipídica nas espécies tropicais *Eudistoma* sp. e *Leptoclinides uniorbis*. Dentre as principais classes lipídicas encontradas, as fosfatidilcolinas foram as mais representativas em *Eudistoma* sp. (70.3%), enquanto que *L. uniorbis* foi melhor representada pelas fosfatidilserinas (59.1%). Quanto à composição de ácidos graxos

fosfolipídicos, foram identificados 38 ácidos graxos para *Eudistoma sp.* e 35 para *L. uniobis*. Takeara (2006) identificou diferentes compostos a partir do extrato metanólico de *Eudistoma vannamei*, sendo eles: cinco ácidos graxos metilados (miristato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, palmitoleato de metila e oleato de metila); dois esteróides (colestanona e colesterol); cinco ácidos graxos (ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico) e dois nucleosídeos (guanosina e adenosina).

O metabolismo dos animais sofre alterações constantes ao longo do ciclo de vida, parte delas relacionadas a eventos reprodutivos, que podem ser analisadas a partir dos teores de AG e outros lipídios. Saito (2004) observou diferenças nas concentrações de componentes químicos presentes nos tecidos da ostra *Pinctada fucata martensii* antes e após a estação reprodutiva, sugerindo certa influência da maturação sobre a composição de ácidos graxos. O mesmo aconteceu para *Crassostrea gigas*, quando se comparou os lipídios de espécimes em fase reprodutiva sob condições naturais e experimentais. Nessa espécie, foi observado um expressivo conteúdo lipídico nas ostras (sob condição natural) durante a fase reprodutiva. Os dados de fecundidade (29.6×10^6 ovos/ fêmea) sugeriram que os espécimes continham gônadas em estágio de maturação avançado, realçando o estoque lipídico.

Tais características evidenciam a importância de continuar os estudos de ecologia química em ascídias, não apenas para identificar os constituintes químicos presentes, como também para evidenciar possíveis relações entre o ciclo reprodutivo e o conteúdo lipídico.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

-Descrever o ciclo reprodutivo da ascídia *Eudistoma vannamei* e verificar seus reflexos no metabolismo primário.

2.2. Específicos

-Indicar o período reprodutivo da espécie.

-Descrever a composição lipídica da espécie e sua variação intraespecífica.

-Relacionar variações nos teores de ácidos graxos com as fases do ciclo reprodutivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

O litoral cearense apresenta uma extensa faixa de praias arenosas, ocasionalmente interrompidas por recifes de praia, ou “beach rocks”, que ocorrem predominantemente na região entremarés (SMITH; MORAES, 1984). Esses afloramentos rochosos abrigam uma diversidade de organismos maior do que áreas essencialmente arenosas, e parte do que se conhece sobre a composição faunística desses ambientes está disponível no volume organizado por Matthews-Cascon e Lotufo (2006).

A praia de Flecheiras ($03^{\circ}13'3,6''S$; $039^{\circ}15'57,2''W$) está situada no litoral oeste do estado do Ceará, a 130 km de Fortaleza, pertencendo ao município de Trairi (Figura 2). A região representa uma das maiores plataformas de recife de praia do litoral cearense, formada por um complexo arenítico capaz de abrigar grande diversidade de algas, fauna bentônica, dentre outros grupos taxonômicos como peixes, crustáceos e moluscos.

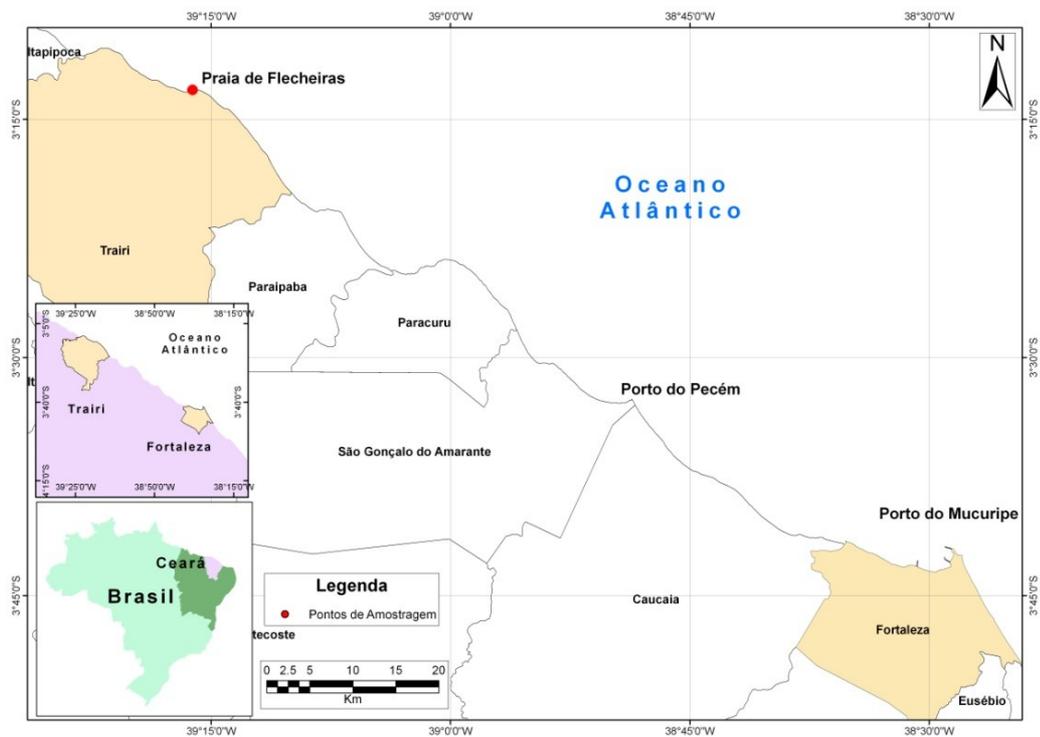


Figura 2– Área de estudo: Praia de Flecheiras, Trairi, Ceará, Brasil.

A área escolhida para a realização da pesquisa apresenta locais propícios ao desenvolvimento das ascídias. Durante a maré baixa, a faixa entremarés é descoberta (Figura 3), podendo chegar a extensões de aproximadamente 120m, exibindo as zonas do médio litoral superior, médio e inferior (MATTHEWS-CASCON; LOTUFO, 2006).



Figura 3– Local de amostragem durante as baixamares de sizígia.

A fauna de Ascidiacea presente em Flecheiras foi destacada nos levantamentos realizados por Lotufo (2002) e Lotufo e Silva (2006), destacando a riqueza e diversidade encontradas, ampliando o que havia sido relatado por Millar (1977) para o litoral nortenordeste brasileiro.

3.2. Coleta dos exemplares

A espécie *Eudistoma vannamei* foi coletada na região entremarés durante as baixamares de sizígia, em intervalos bimensais entre os anos de 2006 a 2010, totalizando 20 coletas que possibilitaram a observação e análise de 200 amostras (Apêndice A).

As colônias foram facilmente identificadas durante as coletas por meio de suas características morfológicas (Figura 4).



Figura 4– Morfologia externa de *Eudistoma vannamei* (Foto: Acervo pessoal).

Em cada coleta foram obtidas 10 amostras de colônias com o auxílio de um pequeno raspador de coco (Figura 5A). Paralelamente foram observados alguns caracteres como tamanho dos exemplares, coloração, posição em relação ao substrato e presença de fauna acompanhante (Figura 5B). Após as observações, cada amostra foi devidamente etiquetada, colocada dentro de saco plástico com água do mar, e posteriormente triada para retirada de organismos incrustantes (Figura 5C-D).



Figura 5– Coleta de *E. vannamei* durante a maré baixa; A) Localização das colônias; B) Disposição da colônia no substrato; C- D) Processo de triagem e retirada de epibiontes.

No período de dezembro de 2006 a agosto de 2008 os exemplares foram coletados, triados e levados para o Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR – UFC).

Em laboratório, cada amostra recebeu procedimentos distintos. Uma porção menor da colônia foi separada para análise biológica, onde se verificou o estágio gonadal dos zoóides, enquanto que a porção maior foi destinada à análise química para extração dos metabólitos e caracterização lipídica, como esquematizada na figura 6.

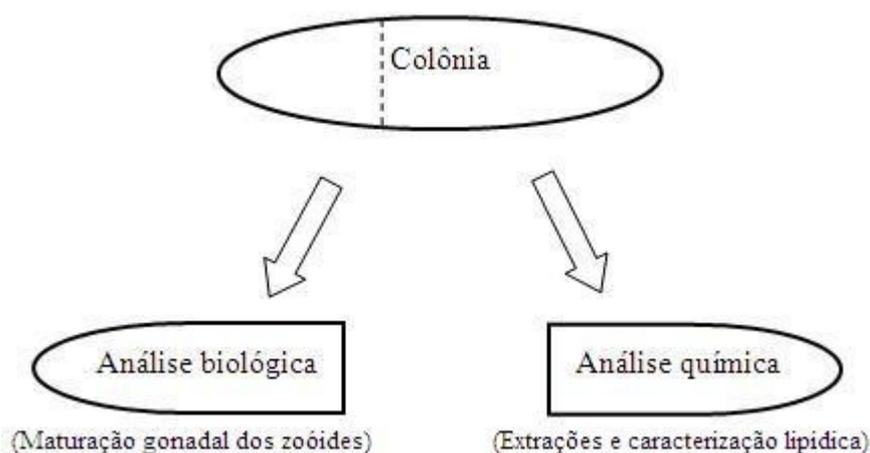


Figura 6 – Esquema do procedimento utilizado durante separação de material para análise biológica e química.

No período de fevereiro de 2009 a junho de 2010 foi feita apenas a análise biológica dos espécimes. Durante o procedimento de triagem em campo, cada exemplar foi anestesiado com Metanosulfonato de triclaína, depois fixado em formol salino 4% e levado para o Laboratório de Ecologia Animal do Instituto de Ciências do Mar.

3.3. Análise biológica

Todos os exemplares destinados à análise biológica permaneceram fixados em formol salino a 4% por pelo menos 72h, sendo posteriormente conservados em etanol 70%. Em duas coletas os dados de maturação não puderam ser analisados devido a problemas durante a fixação (coleta 01, vide Apêndice A) e à disponibilidade de amostras com quantidade suficiente para análise biológica, tendo sido utilizadas apenas na extração química (coleta 12, vide Apêndice A).

A análise de maturação gonadal consistiu na retirada de 10 zoóides por colônia, utilizando-se pinças de pontas finas, sendo então observados sob microscópio estereoscópico. Para melhor visualização das estruturas reprodutivas em organismos com pouco contraste foram utilizados o corante Hemalum de Masson (LOTUFO, 2002) e glicerina. Durante o estudo, os indivíduos foram classificados quanto à maturação das gônadas em: gônadas ausentes, gônadas imaturas e gônadas maduras. Os critérios utilizados para classificar os zoóides foram os seguintes:

- Gônadas ausentes: As gônadas não podiam ser visualizadas no zoóide.
- Gônadas imaturas: As gônadas estavam presentes, mas com folículos testiculares pequenos e em menor número (<10). Ovário, se visível, apenas com ovócitos pouco desenvolvidos.
- Gônadas maduras: Testículos e ovários presentes, folículos testiculares bem desenvolvidos e em grande número (>10). Ovócitos bem desenvolvidos.

Larvas e ovos também foram registrados e guardados em tubos do tipo Eppendorf juntamente com os exemplares analisados. Outras informações, a exemplo da localização, formato e número de testículos auxiliaram na caracterização dos exemplares.

3.4. Análise química

Para cada amostra, a porção maior da colônia foi inicialmente pesada em balança analítica, acondicionada em frasco de 100 mL e, em seguida, adicionado metanol para imersão completa do exemplar. As amostras permaneceram armazenadas sob refrigeração até a realização das extrações.

3.4.1. Obtenção dos extratos

A extração química dos metabólitos foi realizada para cada amostra de acordo com os seguintes procedimentos: utilizou-se metanol para homogeneizar a colônia, numa proporção de 1:3 (m/v) do peso úmido, aproveitando o metanol de imersão. Esse processo foi feito com auxílio de um liquidificador. A solução foi filtrada, concentrada a vácuo e posteriormente secada em estufa (temperatura máxima de 60°C) para obtenção do extrato bruto. Em seguida, o extrato bruto foi ressuscitado em 50 mL de metanol, formando um precipitado que foi separado. O extrato metanólico foi particionado com 25 mL de hexano por

três vezes formando uma fase metanólica e outra hexânica. Ambas foram secas novamente em estufa. A fase hexânica seguiu para as etapas experimentais posteriores enquanto que a fase metanólica foi estocada novamente sob refrigeração. A figura 7 mostra de forma resumida os procedimentos utilizados para obtenção dos extratos.

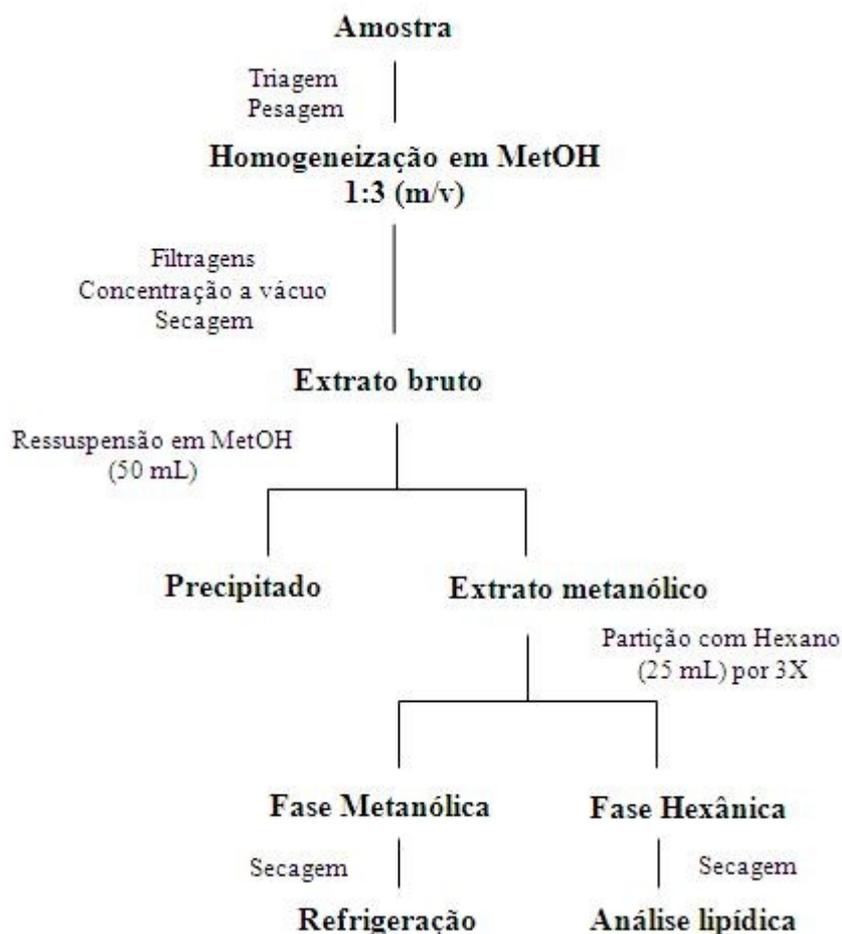


Figura 7– Esquema dos procedimentos utilizados para a extração química dos metabólitos.

3.5. Análise dos compostos lipídicos

Esta etapa experimental ocorreu no laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP- USP), onde foram realizadas as análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para a caracterização dos ácidos graxos.

3.5.1. Tratamento inicial dos extratos hexânicos

Inicialmente, cada amostra passou por um pré-tratamento antes de ser injetada no cromatógrafo. A cada extrato hexânico seco foram adicionados 3,00 mL de metóxido de sódio 1,0 M. A solução foi submetida ao tratamento de ultrassom com tempo de sonicação de 3 minutos (não realizada nas primeiras 40 amostras) e mantida em banho a 65°C com agitação ocasional durante 15 min. Após resfriar, foram acrescentados 1,0 mL de água e três alíquotas de 1,0 mL de clorofórmio, sendo uma alíquota por vez. Em cada adição agitou-se por 2 minutos e centrifugou-se a 3.000 rpm por aproximadamente 3 minutos para a extração dos metil-ésteres de ácidos graxos. A fase de clorofórmio (3,0 mL) foi separada e o solvente foi evaporado utilizando gás nitrogênio. O material foi ressuscendido em 1,0 mL de acetato de etila, adicionando sulfato de sódio anidro para remover a água residual, e então a amostra foi novamente centrifugada a 3.000 rpm por mais 5 min. O sobrenadante foi separado e o solvente foi evaporado utilizando gás nitrogênio. As amostras foram ressuscendidas em 100 µL de acetato de etila e transferidas para os inserts para serem analisadas. A figura 8 mostra de forma resumida os procedimentos utilizados no tratamento inicial dos extratos hexânicos.

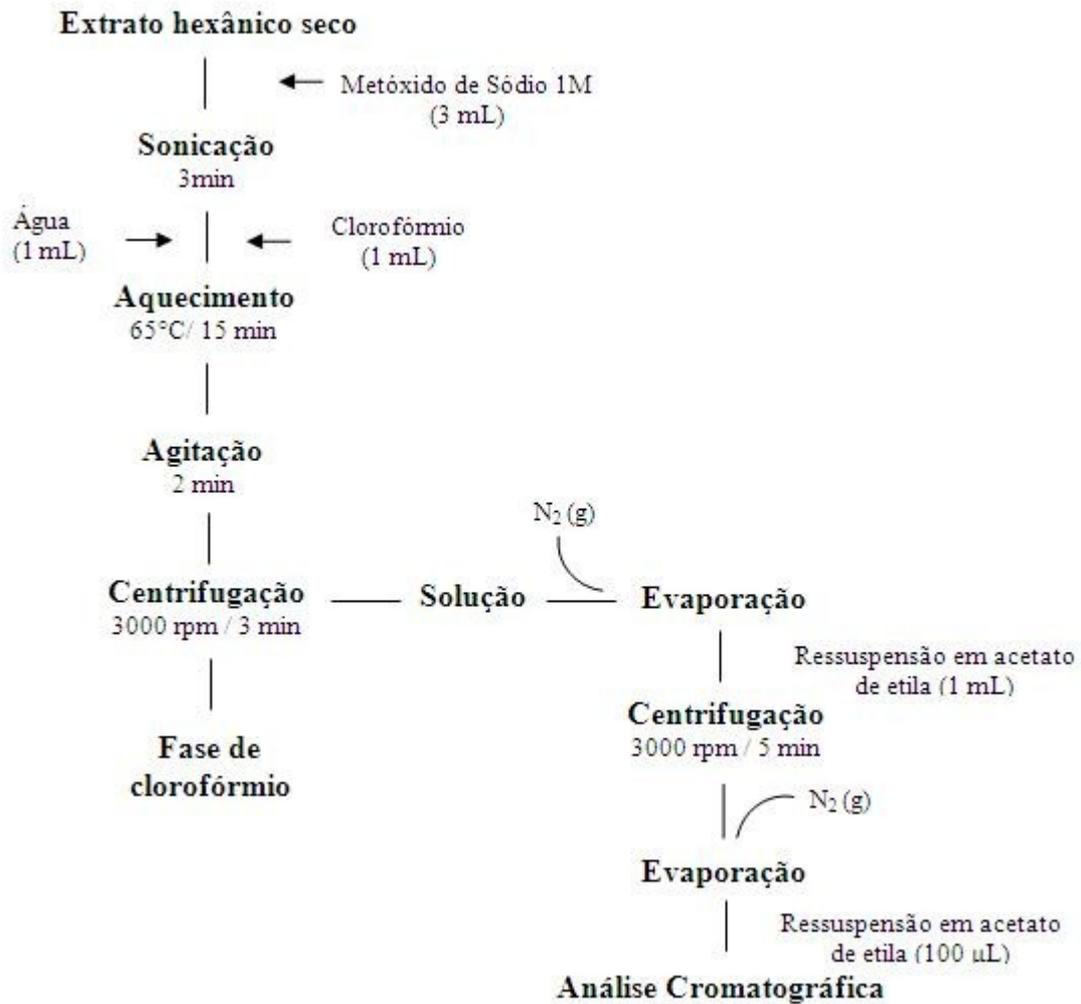


Figura 8– Esquema indicando os procedimentos utilizados no tratamento inicial dos extratos hexânicos.

3.5.2. Análise Cromatográfica

As amostras foram analisadas por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas) no equipamento da empresa Shimadzu, modelo QP - 2010 com fonte de ionização de 70 eV e fragmentação por impacto eletrônico (IE). O volume de injeção foi de 1,0 μL para cada amostra e a temperatura de injeção foi 220°C. A coluna utilizada foi DB-WAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) da empresa Agilent. As análises ocorreram no modo split, com taxa de 10, o fluxo da coluna foi de 1,3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a velocidade linear de 41.4 $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ e o scan foi realizado de m/z 40 à m/z 500. A temperatura do forno começou em 50°C, aumentando 20°C $\cdot \text{min}^{-1}$ até 200°C, sendo mantida nessa temperatura por 5 minutos, então aumentando 5°C $\cdot \text{min}^{-1}$ até 230°C e conservada por 30 minutos nessa temperatura.

3.5.3. Identificação dos ácidos graxos

A identificação dos ácidos graxos presentes em cada amostra foi feita a partir da análise dos cromatogramas, espectros de massa, pesos moleculares e tempos de retenção para cada pico referente a um determinado ácido graxo.

Os compostos foram analisados após a integração dos picos, e os tempos de retenção ao serem determinados auxiliavam como ferramenta inicial de identificação, sabendo-se que as substâncias encontravam-se em intervalos já conhecidos. No entanto, o tempo de retenção para um mesmo AG variou entre as amostras sendo necessário observar os espectros de massas de cada um, identificando os íons moleculares formados pelas fragmentações das estruturas.

As bases de dados WILEY7 (Wiley Mass Spectral Database), e NIST12/ NIST62 (Mass Spectral Library - National Institute of Standards and Technology) proporcionaram por meio de similaridade, a comparação dos compostos da amostra com a base de dados de ácidos graxos existente em cada biblioteca. Foram utilizados também padrões de ácidos graxos existentes no laboratório, que possibilitaram a comparação dos tempos de retenção da amostra com os tempos dos padrões. Mesmo a biblioteca indicando a posição das metilas e das duplas ligações, não foi possível afirmar que a indicação esteja correta devido ao grau de similaridade entre os isômeros tanto na fragmentação das estruturas quanto na similaridade obtida pela biblioteca. Apenas os ácidos graxos comparados com os padrões podem ser identificados com 100% de certeza. As bibliotecas e os padrões de ácidos graxos são disponibilizados comercialmente em mídia eletrônica. Para auxiliar na confirmação de alguns compostos em que havia incerteza quanto a identificação em relação ao tempo de retenção, foram utilizados padrões de ácidos graxos poliinsaturados de origem marinha da Supelco Sigma (PUFA nº1, código 47033).

3.6. Análise dos dados

Com uso do aplicativo Statistica 8.0 foram gerados gráficos de médias para verificar a distribuição dos estágios de maturação e teores de ácidos graxos durante o período

de amostragem e utilizados os desvios padrão como medida de dispersão para avaliar o grau de variabilidade dos valores em torno de cada média.

Os valores correspondentes às áreas integradas dos picos de ácidos graxos majoritários foram inicialmente transformados por \log_{10} .

Ainda utilizando o aplicativo Statistica 8.0 foi realizada uma análise com um Modelo Linear Generalizado (GLZ), para descrever a relação entre o número de zoóides incubando ovos ou larvas e os ácidos graxos majoritários. Para tal foi considerada a distribuição de Poisson para os dados reprodutivos.

4. RESULTADOS

4.1. Ciclo Reprodutivo

A análise dos zoóides quanto ao seu estágio reprodutivo indicou que os animais reproduzem sexuadamente durante todo o ano, entretanto o esforço reprodutivo não foi homogêneo, com números distintos de zoóides maduros durante o ano e entre os anos (Figura 14), não havendo uma sazonalidade marcada, com os percentuais variando entre os mesmos períodos de anos diferentes. No ano de 2007 ocorreu no primeiro semestre um maior número de zoóides maduros, mas o mesmo não ocorreu em anos subsequentes. Em 2008 foi observado um predomínio de zoóides com gônadas imaturas, enquanto entre 2009 e 2010 os zoóides sem gônadas foram mais frequentes.

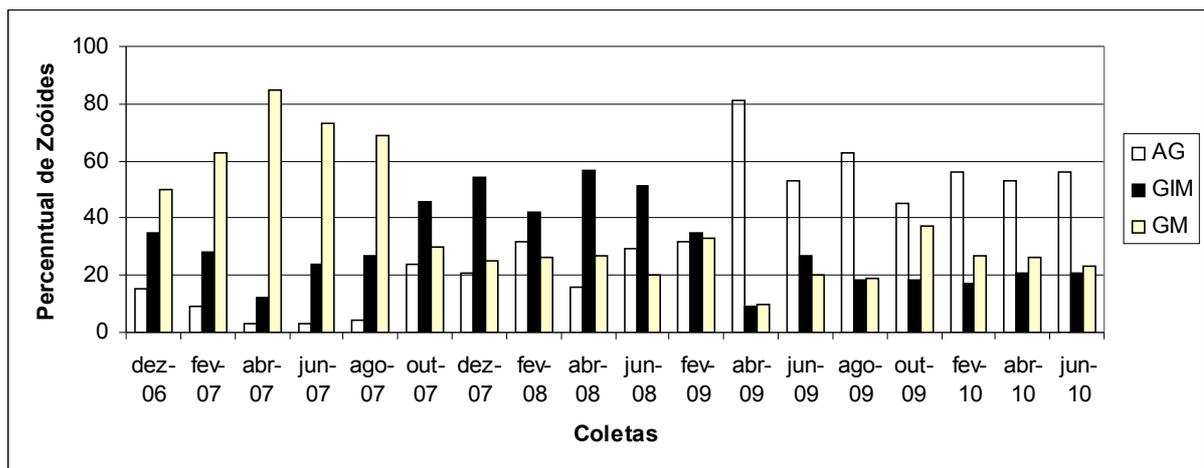


Figura 9– Percentuais relativos aos estágios de maturação do total de zoóides observados em cada mês de coleta, indicando a ocorrência de gônadas maduras (GM), gônadas imaturas (GIM) e gônadas ausentes (GA).

Para melhor compreender a variação dos dados apresentados, os estágios de maturação foram analisados isoladamente a partir das médias de indivíduos por colônia agrupados pela data de coleta.

Para o estágio considerado como gônadas ausentes, as médias de indivíduos sem gônadas masculinas e femininas foram menores durante o intervalo de dezembro de 2006 a agosto de 2007. A partir de outubro ocorreu um ligeiro aumento e nos dois últimos anos houve um aumento nas médias de indivíduos sem gônadas em comparação com os anos anteriores (Figura 10).

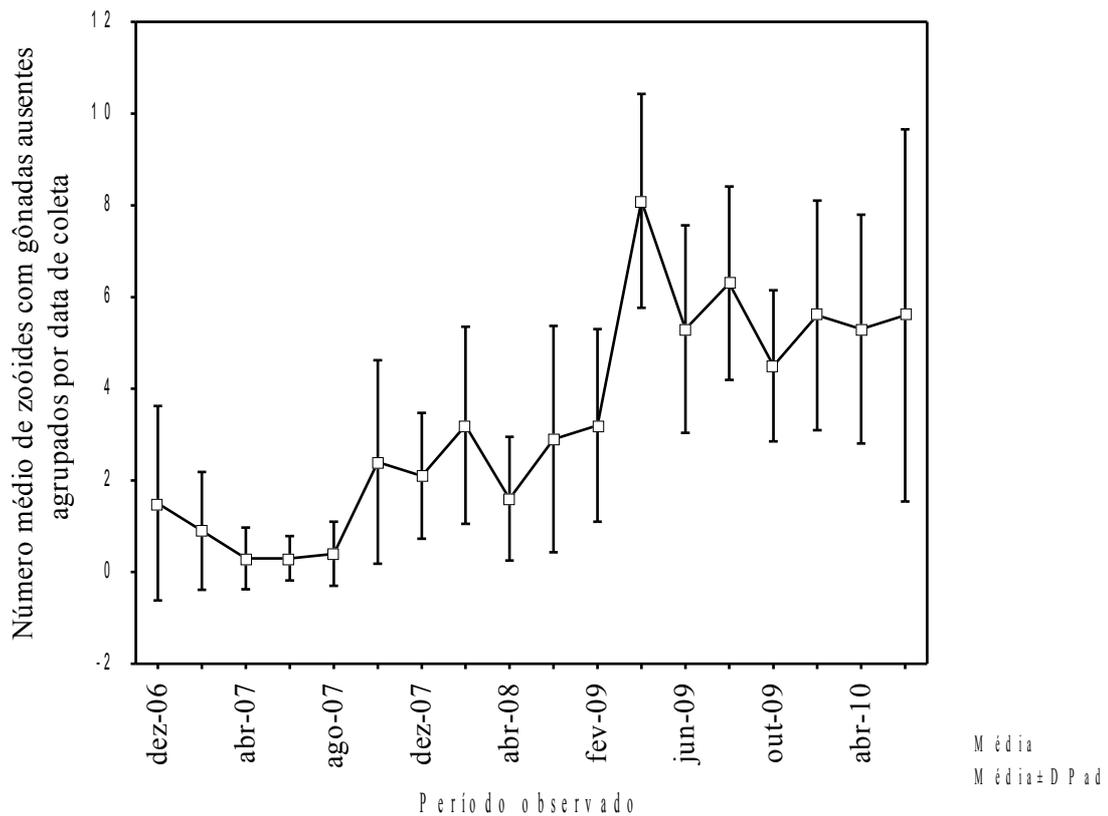


Figura 10– Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) com gônadas ausentes durante o período observado.

Entre o segundo semestre de 2007 e o primeiro semestre de 2008 houve um aumento nas médias de zoóides com gônadas imaturas (Figura 11). A heterogeneidade dos dados também foi evidente nesse segundo estágio, caracterizando a variabilidade encontrada no decorrer do período observado. Em abril de 2007 e de 2009 as colônias de *E. vannamei* apresentaram a menor proporção de gônadas imaturas.

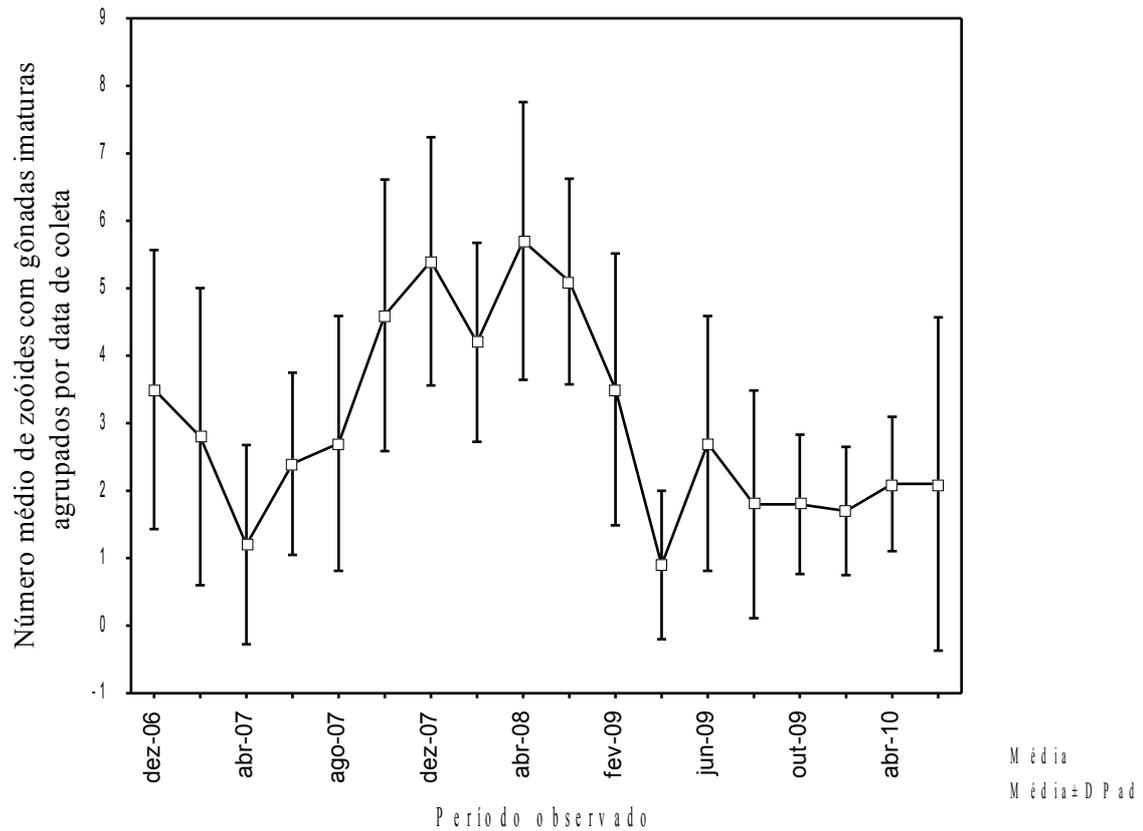


Figura 11 – Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando gônadas imaturas durante o período observado.

O último estágio acompanhado foi o de zoóides com gônadas maduras, com as maiores médias encontradas durante o ano de 2007, principalmente em abril. Posteriormente as médias não mantiveram o padrão elevado (Figura 12).

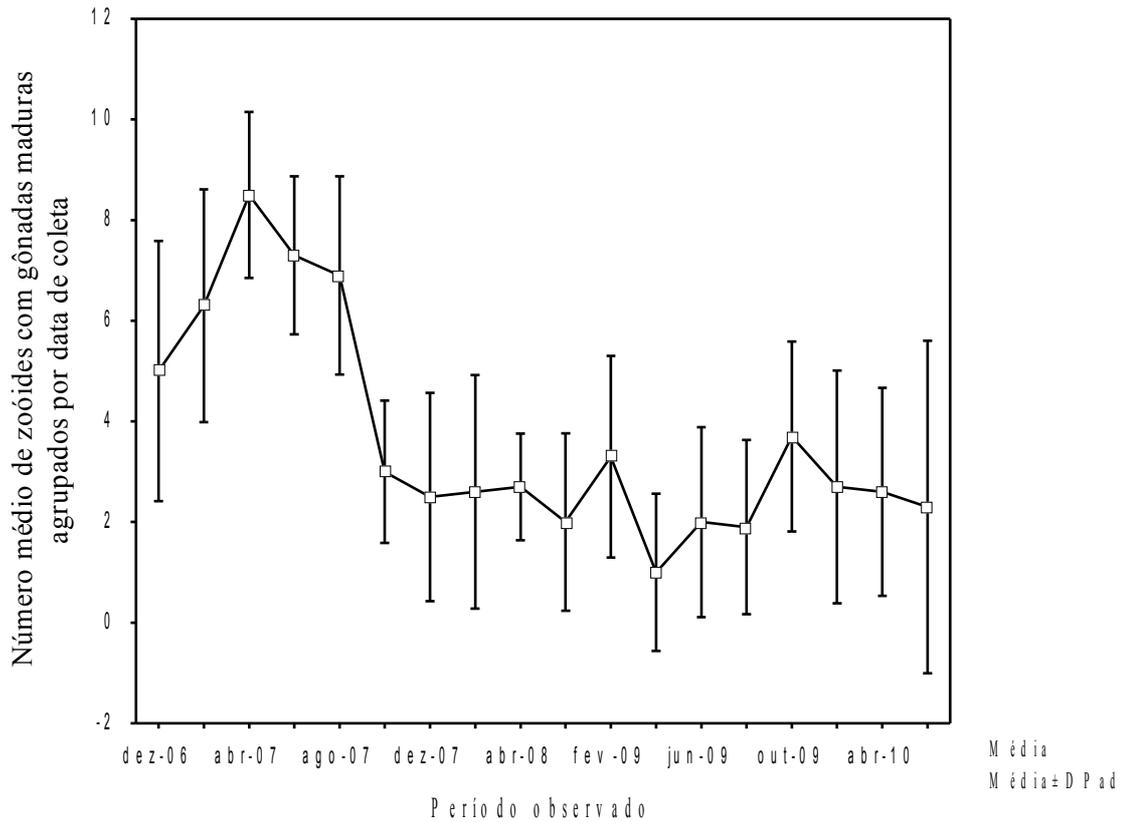


Figura 12– Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando gônadas maduras durante o período observado.

Quando observadas as médias correspondentes aos números de larvas e ovos incubados, pode-se verificar que esta característica foi a que melhor representou a previsão do período reprodutivo da espécie. A Figura 13 apresenta quatro intervalos bem definidos durante o período amostrado, identificando maior presença de larvas e ovos entre o final e início de um ano para outro. Como foram identificadas já na cavidade atrial, pode-se dizer que o desenvolvimento e a liberação das larvas ocorrem durante todo o ano, com incremento da liberação a partir de outubro, e maior liberação durante o mês de fevereiro. A atividade é reduzida a partir de abril, mantendo-se até agosto quando novamente volta a aumentar a participação de larvas e ovos nas colônias. Esta condição sugere que o desenvolvimento e a liberação das larvas ocorrem na estação chuvosa.

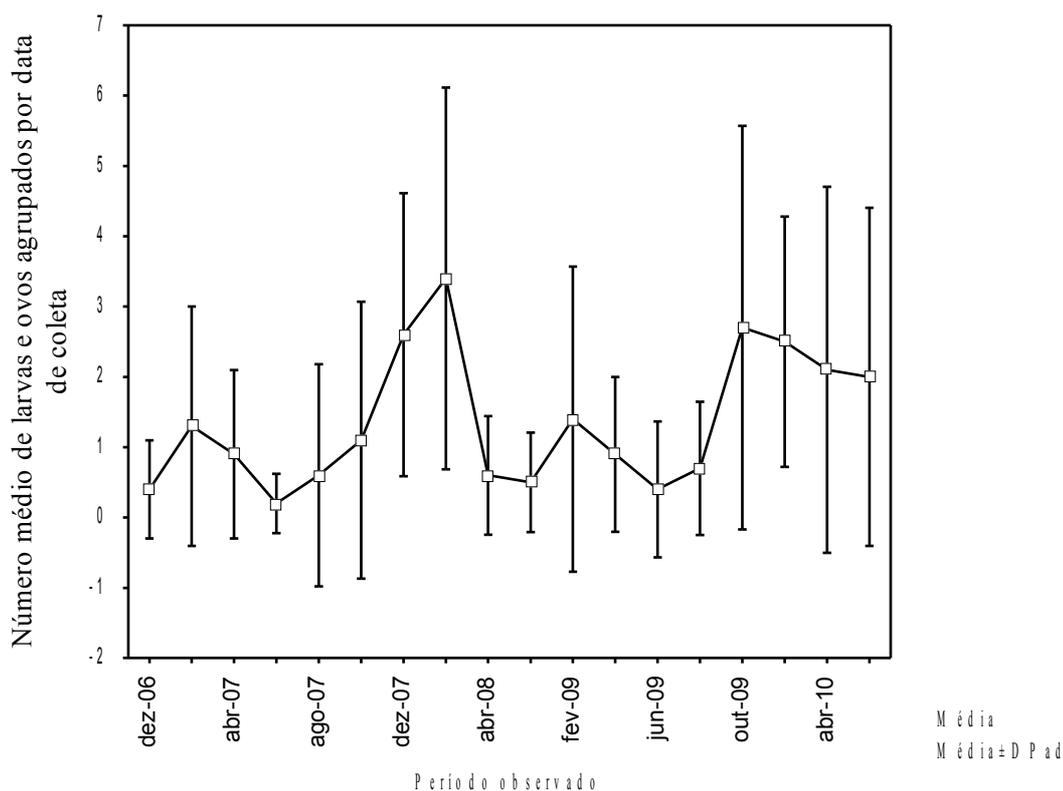


Figura 13– Variação do número de zoóides (média \pm desvio padrão) apresentando larvas e ovos durante o período observado.

4.2. Composição lipídica: Ácidos graxos

A análise da composição lipídica foi baseada na caracterização dos ácidos graxos presentes em 120 amostras de *E. vannamei*. A partir dos extratos hexânicos, foram identificados 32 tipos diferentes de ácidos graxos representados por longas cadeias hidrocarbônicas, todos estando na forma de metil-ésteres de ácidos graxos. Todas as amostras apresentaram AG saturados e insaturados conforme a presença de insaturações. As cadeias de AG saturados foram assim consideradas pela ausência de duplas ligações nas estruturas apresentando-se com número par ou ímpar de átomos de carbono. As cadeias de AG insaturados foram determinadas conforme o número de duplas ligações presentes, ocorrendo formas monoinsaturadas ou poliinsaturadas. Foram identificadas ainda estruturas com ramificações, principalmente nos compostos saturados. A tabela 1 mostra a lista de ácidos graxos identificados na espécie indicando a nomenclatura e as características comuns de cada estrutura.

Tabela 1– Lista de ácidos graxos encontrados em *Eudistoma vannamei*, indicando a nomenclatura utilizada, número de átomos de carbono, duplas ligações e ramificações para cada ácido graxo.

Classificação	Nome sistemático do ácido graxo parental ^a	Nome sistemático do éster de ácido graxo	Nomenclatura abreviada	Número de carbonos ^b	Duplas ligações	Ramificações	Peso molecular ^c
Ácidos graxos saturados	Ácido dodecanóico (Láurico)	metil- dodecanoato (Laurato)	12:0	12 / 13	0	0	214
		metil- metil- dodecanoato	12:0*	13 / 14	0	1	228
	Ácido tridecanóico	metil- tridecanoato	13:0	13 / 14	0	0	228
		metil- metil- tridecanoato	13:0*	14 / 15	0	1	242
	Ácido tetradecanóico (Mirístico)	metil- tetradecanoato (Miristato)	14:0	14 / 15	0	0	242
		metil- metil- tetradecanoato	14:0*	15 / 16	0	1	256
	Ácido pentadecanóico	metil- pentadecanoato	15:0	15 / 16	0	0	256
		metil- metil- pentadecanoato	15:0*	16 / 17	0	1	270
	Ácido hexadecanóico (Palmitico)	metil- hexadecanoato (Palmitato)	16:0	16 / 17	0	0	270
		metil- metil- hexadecanoato	16:0*	17 / 18	0	1	284
	(Fitânico)	3,7,11,15-tetrametil- metil- hexadecanoato	16:0 Δ _{3,7,11,15}	20 / 21	0	4	326
Classificação	Nome sistemático do ácido	Nome sistemático do éster	Nomenclatura	Número de	Duplas	Ramificações	Peso

	graxo parental ^a	de ácido graxo	abreviada	carbonos ^b	ligações		molecular ^c
Ácidos graxos saturados	Ácido heptadecanóico (Margárico)	metil- heptadecanoato	17:0	17 / 18	0	0	284
		metil- metil- heptadecanoato	17:0*	18 / 19	0	1	298
	Ácido octadecanóico (Esteárico)	metil- octadecanoato (Estearato)	18:0	18 / 19	0	0	298
		metil- metil- octadecanoato	18:0*	19 / 20	0	1	312
	Ácido nonadecanóico (Nonadecílico)	metil- nonadecanoato	19:0	19 / 20	0	0	312
	Ácido eicosanóico (Araquídico)	metil- eicosanoato	20:0	20 / 21	0	0	326
	Ácido heneicosanóico	metil- heneicosanoato	21:0	21 / 22	0	0	340
	Ácido docosanóico (Beênico)	metil- docosanoato	22:0	22 / 23	0	0	354
		metil-tricosanoato	23:0	23 / 24	0	0	368
	Ácido tetracosanóico (Lignocérico)	metil- tetracosanoato	24:0	24 / 25	0	0	382
Ácidos graxos monoinsaturados	Ácido hexadecenóico (Palmitoléico)	metil- hexadecenoato (Palmitoleato)	16:1**	17 / 18	1	0	268
		metil- octadecenoato (Oleato)	18:1**	19 / 20	1	0	296
Classificação	Nome sistemático do ácido graxo parental ^a	Nome sistemático do éster de ácido graxo	Nomenclatura abreviada	Número de carbonos ^b	Duplas ligações	Ramificações	Peso molecular ^c

Ácidos graxos monoinsaturados	Ácido nonadecenóico	metil- nonadecenoato	19:1	20 / 21	1	0	310
	Ácido eicosenóico (Gondóico)	metil- eicosenoato	20:1	21 / 22	1	0	324
	Ácido docosenóico	metil- docosenoato	22:1	23 / 24	1	0	352
Ácidos graxos poliinsaturados	Ácido octadecadienóico (Linoléico)	metil- octadecadienoato (Linoleato)	18:2	20 / 21	2	0	294
	Ácido octadecatrienóico (Linolênico)	metil- octadecatrienoato (Linolenato)	18:3	21 / 22	3	0	292
	Ácido eicosadienóico	metil- eicosadienoato	20:2	22 / 23	2	0	322
	Ácido eicosatrienóico	metil- eicosatrienoato	20:3	23 / 24	3	0	320
	Ácido eicosatetraenóico (Araquidônico)	metil- eicosatetraenoato	20:4	24 / 25	4	0	318
	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	metil- eicosapentaenoato	20:5	25 / 26	5	0	316

^a Nome sistemático seguido do nome comum entre parênteses.

^b Estrutura comum / estrutura metilada.

^c Peso molecular dos ácidos graxos metilados.

* Estruturas ramificadas.

** Presença de isômeros (estruturas com mesmo número de átomos de carbono apresentando insaturações em posições diferentes).

A maioria das cadeias de AG saturados apresentou número par de átomos de carbono, sendo eles: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido araquídico (C20:0), ácido beênico (C22:0) e ácido lignocérico (C24:0). As estruturas com número ímpar foram representadas pelos ácidos tridecanóico (C13:0), pentadecanóico (C15:0), margárico (C17:0), ácido nonadecílico (C19:0), ácido heneicosanóico (C21:0) e tricosanóico (C23:0).

Os ácidos graxos ramificados apresentaram tamanho de cadeia carbônica semelhante a dos ácidos graxos lineares: ácido láurico, ácidos tridecanóico, ácido mirístico, pentadecanóico, ácido palmítico, margárico e ácido esteárico. A posição das ramificações não foi colocada, pois os resultados obtidos com as bibliotecas mostraram similaridades muito baixas em alguns casos, ou muito próximas para estruturas com mesmo número de átomos de carbono que apresentaram ramificações em posições diferentes. Nesse último caso pode-se citar C14:0 com ramificações nas posições 9 ou 12, C16:0 com ramificações nas posições 14 ou 15, e C17:0 com ramificações nas posições 10 ou 16. As demais estruturas foram verificadas com sendo C12:0 Δ 4, C13:0 Δ 12, C15:0 Δ 14 e C18:0 Δ 17, e apenas C16:0 apresentou mais de uma ramificação. Seria necessário o uso de técnicas auxiliares para identificação segura desses AG, sendo as posições apenas citadas para demonstrar que pode ser maior o número de AG ramificados presentes em *E. vannamei*.

Os ácidos graxos monoinsaturados foram representados pelos ácidos palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1), nonadecenóico (C19:1), eicosenóico (C20:1) e docosenóico (C22:1). Os resultados também mostraram similaridades muito próximas que não permitiram distinguir um composto de outro para estruturas com mesmo número de átomos de carbono que apresentaram duplas ligações em posições diferentes. O ácido oléico apresentou mais de um isômero com insaturação nas posições 9 ou 11, indicando que *E.vannamei* possua separadamente os ácidos oléico 18:1 ω 9 e vacênico 18:1 ω 7. As demais estruturas verificadas foram C16:1 Δ 9 ou ω 7, C19:1 Δ 10 ou ω 9, C20:1 Δ 11 ou ω 9 e C22:1 Δ 13 ou ω 9. A numeração ω indica a posição da dupla ligação a partir do terminal metílico enquanto que a numeração Δ indica a posição da dupla ligação a partir do terminal carboxílico. Seria necessário também o uso de outras técnicas para confirmar com mais segurança os AG monoinsaturados presentes nas amostras.

Os ácidos graxos poliinsaturados foram representados pelos ácidos linoléico (C18:2), linolênico (C18:3), eicosadienóico (C20:2), eicosatrienóico (C20:3),

eicosatetraenóico (C20:4) e eicosapentaenóico (C20:5). Os resultados mostraram similaridades muito próximas para estruturas com mesmo número de átomos de carbono apresentando duplas ligações em posições diferentes, sendo necessário identificá-las por meio de técnicas auxiliares. Foram verificados C18:2 Δ 9,12 ou ω 6, C18:3 Δ 9,12,15 ou ω 3, C20:2 Δ 11,14 ou ω 6, C20:3 Δ 7,10,13, C20:4 Δ 5,8,11,14 ou ω 6 e C20:5 Δ 5,8,11,14,17 ou ω 3.

Do total de ácidos graxos identificados, os AG saturados corresponderam a 56,71%, monoinsaturados a 28,70%, poliinsaturados com apenas 4,68% e ramificados com 9,91%. Foram utilizados os dados das áreas absolutas dos picos de cada AG como medida da quantidade da substância analisada nas amostras. Os ácidos graxos saturados foram representados por estruturas contendo de 12 a 24 átomos de carbono. Do total de ácidos graxos identificados, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0) apresentaram 21,40%, 11,09% e 7,19% respectivamente. Dentre os AG com número ímpar destacou-se o ácido margárico (C17:0) com 5,88%, seguido pelo pentadecanóico (C15:0) com 3,68%. Os demais AG apresentaram menor participação, principalmente os ácidos tridecanóico (C13:0), docosanóico (C22:0),tricosanóico (C23:0) e tetracosanóico (C24:0), ambos com valores inferiores a 1%. Os ácidos graxos monoinsaturados foram representados principalmente pelos isômeros do ácido oléico (C18:1) com 16,36%, seguidos pelo ácido eicosenóico (C20:1) com 6,10% e pelos isômeros do ácido palmitoléico (C16:1) com 4,12%. O ácido nonadecenóico (C19:1) teve participação de 2%, enquanto que a do ácido docosenóico (C22:1) foi inferior a 1%. Devido a presença de isômeros em TR diferentes e ao grau de similaridade, os dados foram unificados em cada situação.

Os ácidos graxos poliinsaturados foram caracterizados pela pouca participação nas amostras. Do total de ácidos graxos identificados, 2,34% foi representado pelo ácido araquidônico (C20:4), 1,55% pelo ácido linoléico (C18:2) enquanto que os ácidos linolênico (C18:3), eicosadienóico (C20:2), eicosatrienóico (C20:3) e eicosapentaenóico (C20:5) foram inferior a 1%.

Os ácidos graxos ramificados foram bastante frequentes nas amostras. Apenas um composto apresentou quatro ramificações, enquanto que os demais apresentaram apenas uma ramificação. Pela falta de identificação precisa devido ao aparecimento de compostos em TR diferentes apresentando ramificações em posições diferentes, os dados foram unificados em cada situação. Do total de ácidos graxos identificados, 3,96% foi referente a variações do ácido graxo C16:0 identificados em TR diferentes apresentando ramificações nos carbonos 14

ou 15. Ácidos graxos C15:0 e C14:0 também foram bastante comuns e apresentaram a mesma condição descrita anteriormente. Os demais compostos foram encontrados com valores percentuais abaixo de 1%.

Os ácidos graxos mirístico, palmítico, margárico, esteárico, palmitoléico, oléico e gondóico foram selecionados como compostos majoritários e analisados por meio das médias apresentadas para cada data de coleta. Assim como foram verificadas variações para os estágios de maturação, a composição de AG também variou entre os meses observados.

O ácido mirístico C14:0 apresentou uma tendência de aumento a partir de dezembro de 2006, atingindo um máximo em junho de 2007 e decrescendo após outubro (Figura 14). Os intervalos entre fevereiro e junho nos anos consecutivos demonstraram uma inversão na quantidade desse composto, sugerindo que outros fatores além da época do ano estejam influenciando a sua ocorrência nas colônias.

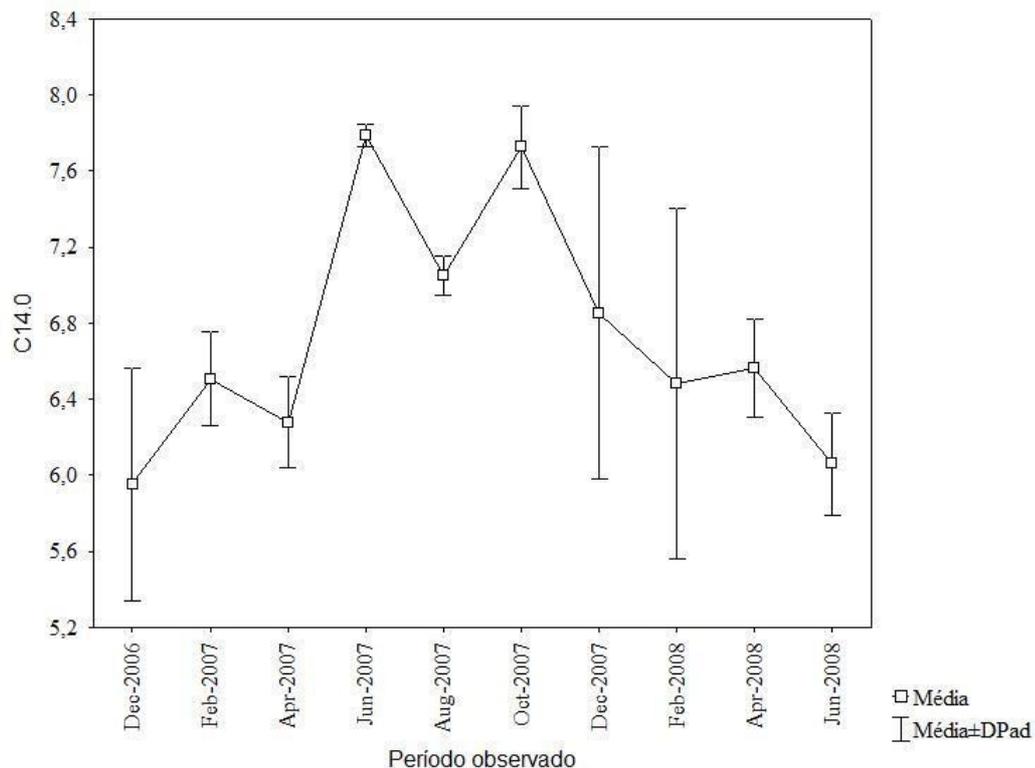


Figura 14– Variação apresentada pelo ácido mirístico C14:0 para o período amostrado.

O ácido palmítico C16:0 apresentou variação semelhante à do ácido mirístico para o mesmo período amostrado, embora mais errática. Apesar da variabilidade dos dados, a distribuição foi mais uniforme, com menores oscilações entre os meses. O ano de 2007 apresentou maior quantidade de C16:0 nas colônias, principalmente entre junho e agosto. No ano de 2008, os meses de fevereiro, abril e junho, diferentemente do ano anterior apresentaram inversão na quantidade de C16:0 (Figura 15).

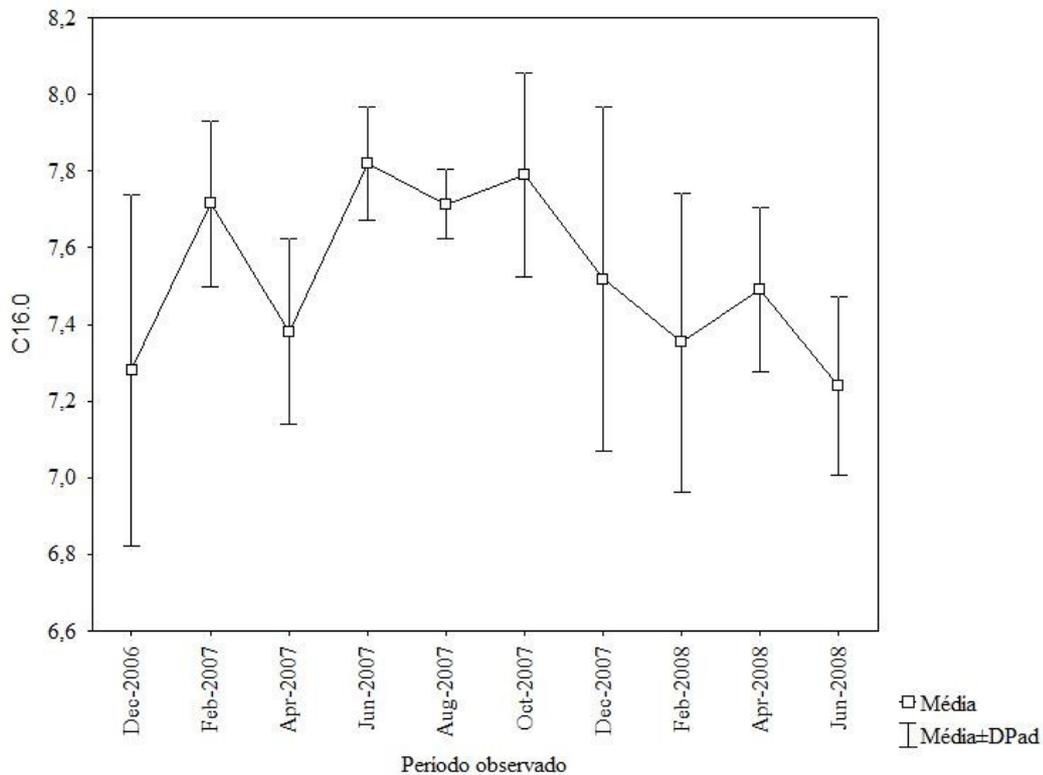


Figura 15 – Variação apresentada pelo ácido palmítico C16:0 para o período amostrado.

A distribuição do ácido margárico C17:0 apresentou diferenças quando comparada com as dos compostos anteriores. No intervalo entre os meses de dezembro de 2006 e junho de 2007 se observou uma tendência ao aumento dos seus teores médios, com posterior decréscimo até junho de 2008 (Figura 16). Outubro de 2007 foi o mês onde houve maior variabilidade na quantidade do ácido margárico diferente do que havia sido observado para os ácidos mirístico e palmítico.

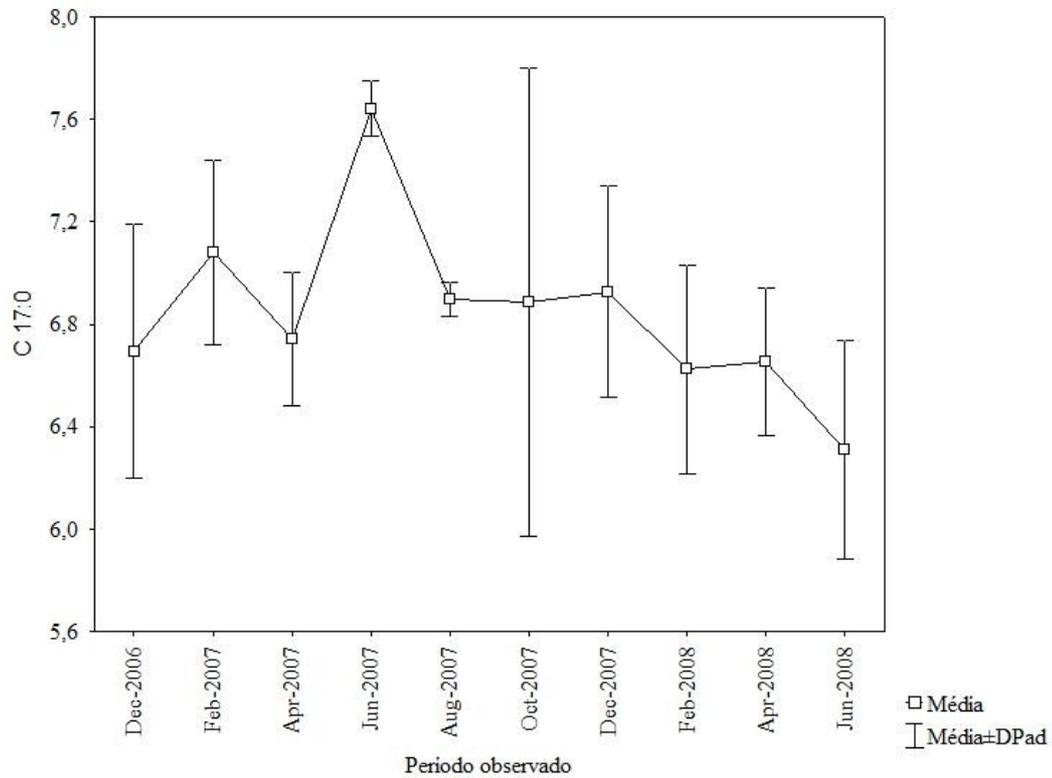


Figura 16 – Variação apresentada pelo ácido margárico C17:0 para o período amostrado.

O ácido esteárico C18:0 apresentou quatro intervalos bem definidos com baixa oscilação entre um pico e outro. No ano de 2007, as amostras apresentaram grande quantidade de C18:0 nos meses de fevereiro, junho, agosto e dezembro, enquanto que o mês de outubro foi representado pela menor participação desse composto (Figura 17). O comportamento observado no início de 2007 foi oposto ao de 2008, caracterizado pela inversão nas quantidades de C18:0. Semelhante ao ocorrido com o ácido margárico, a maior variação na quantidade do ácido esteárico nas amostras foi em outubro de 2007. O mês de agosto diferentemente apresentou a menor variação em ambos os casos.

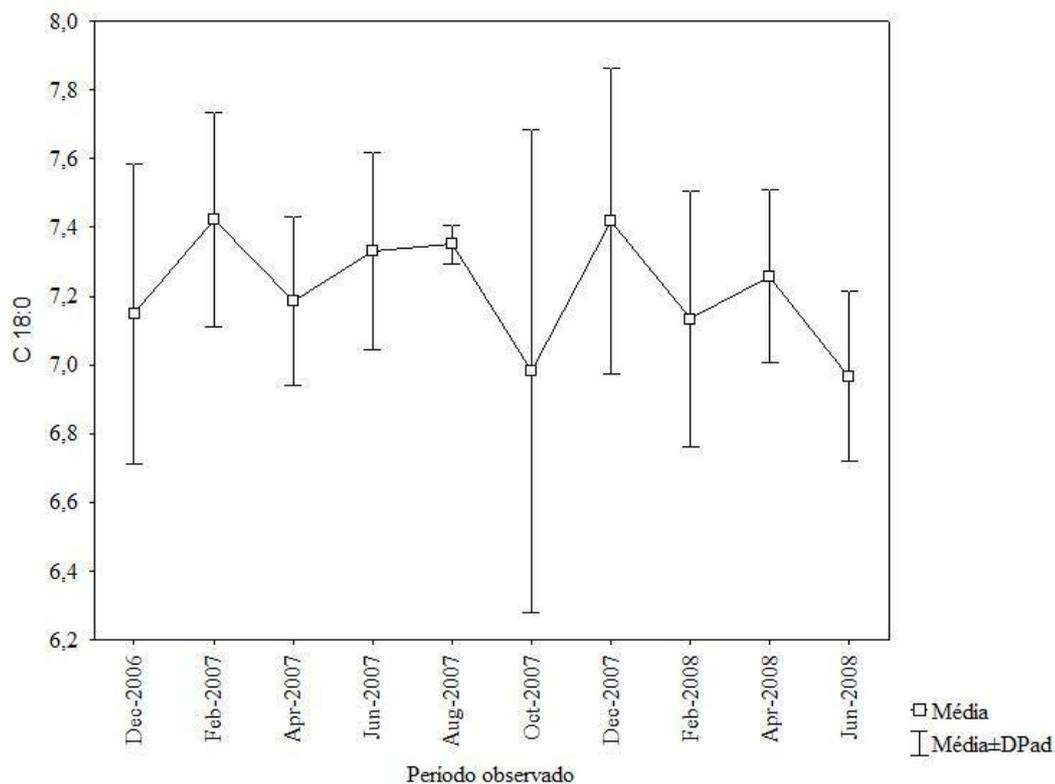


Figura 17 – Variação apresentada pelo ácido esteárico C18:0 para o período amostrado.

O ácido palmitoléico C16:1 apresentou maior variabilidade nos dados e consequentemente maiores oscilações entre os picos. A menor quantidade deste AG foi observada em dezembro de 2006, e nos meses de abril e outubro de 2007. Nos demais meses, as médias se mantiveram altas com máxima participação de C16:1 em agosto (Figura 18). As médias obtidas em 2008 foram similares a de outros meses, e diferentemente do que vinha acontecendo com os demais compostos, o ácido palmitoléico mostrou-se em grande quantidade no início de 2008. O comportamento diferenciado entre os anos mostra que são necessários outros dados complementares para avaliar melhor a ocorrência dos AG nas colônias. Deve também ser lembrado que as informações obtidas para o ácido palmitoléico foram resultado da combinação dos dados referentes aos isômeros desse composto. Seria necessário distingui-los corretamente para verificar o comportamento de distribuição separadamente.

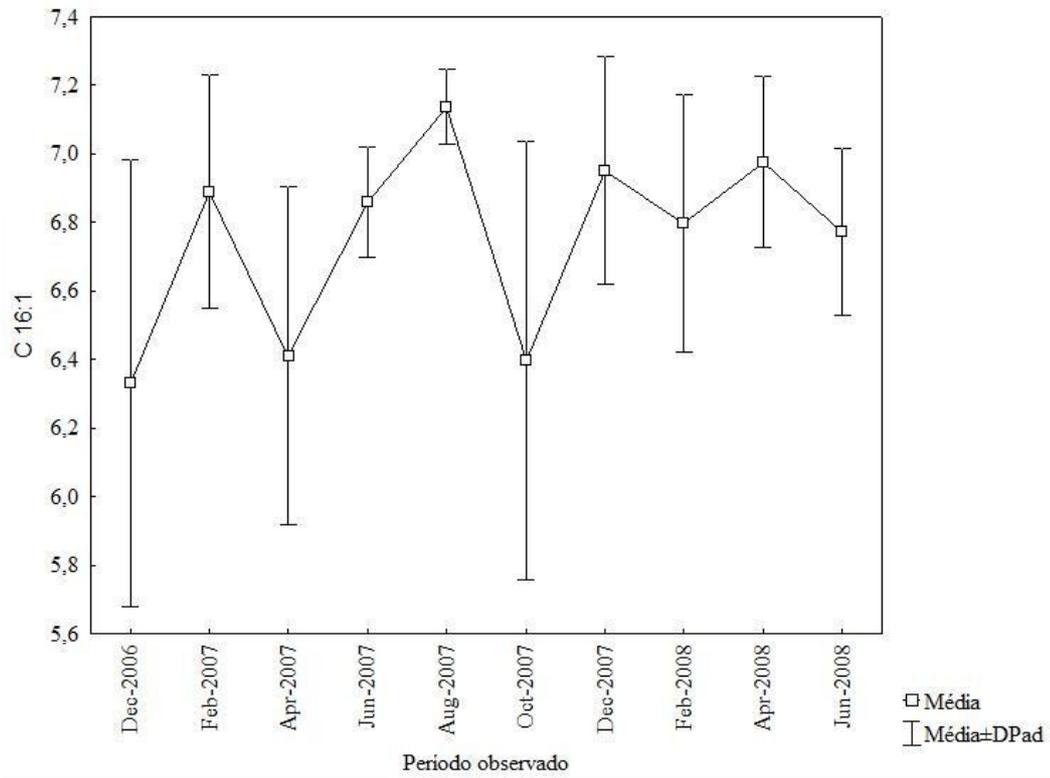


Figura 18 – Variação apresentada pelo ácido palmitoléico C16:1 para o período amostrado.

O ácido oléico C18:1 foi o composto majoritário dentre os monoinsaturados. A distribuição na quantidade deste AG nas amostras demonstrou algumas semelhanças com a distribuição observada para o ácido palmitoléico (Figura 19). As menores quantidades de C18:1 também foram durante dezembro de 2006, abril e outubro de 2007. Nos demais meses, as médias foram um pouco maiores, tendo maior quantidade deste composto em fevereiro, junho, agosto e dezembro de 2007. A partir de fevereiro de 2008, as médias foram mais baixas com menor valor em junho. As informações obtidas para o ácido oléico também foram resultado da combinação dos dados referentes aos isômeros desse composto, sendo necessário distingui-los corretamente para verificar o comportamento de distribuição separadamente.

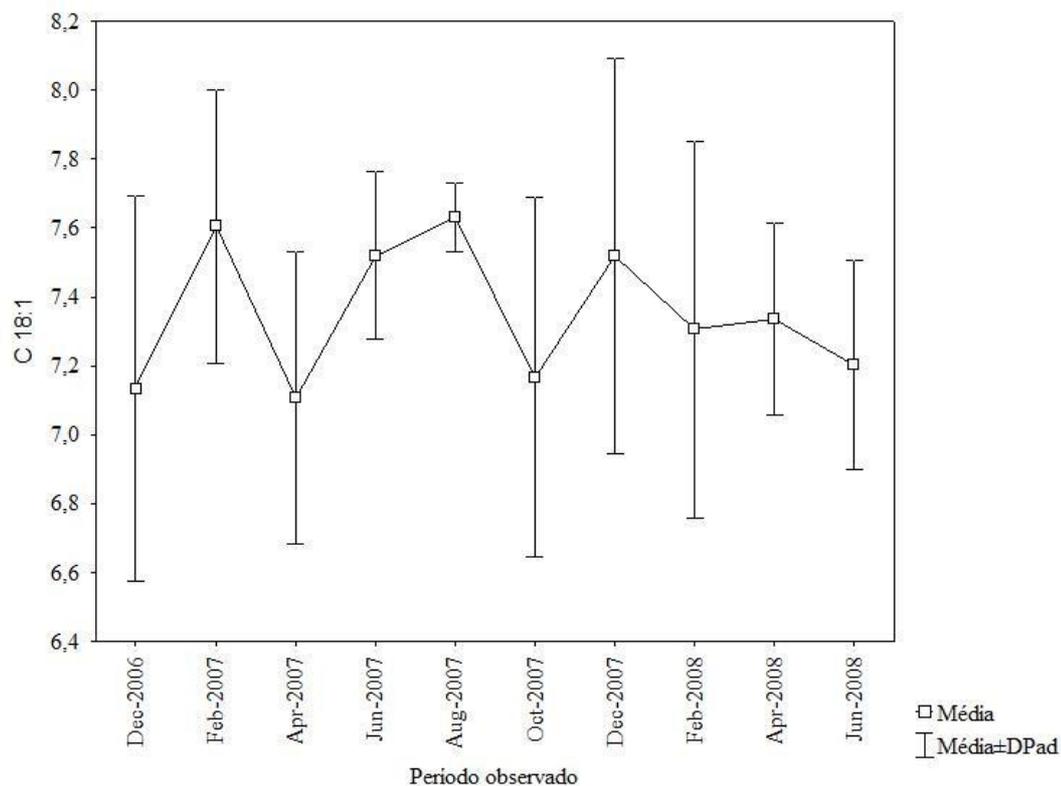


Figura 19 – Variação apresentada pelo ácido oléico C18:1 para o período amostrado.

Por último foi observado a distribuição do ácido gordo C20:1. Este composto apresentou maior diferença quando comparado com os ácidos palmitoléico e oléico. As médias foram altas em 2007, porém a máxima ocorreu em dezembro. Posteriormente a quantidade de C20:1 tornou-se menor, com valor mínimo em junho de 2008. Neste mesmo mês ocorreu a maior variabilidade na quantidade deste composto nas amostras. O intervalo fevereiro-abril foi semelhante entre os anos consecutivos, com redução na quantidade do ácido gordo (Figura 20). As informações obtidas para o ácido gordo foram referentes aos isômeros desse composto, sendo necessário posteriormente distingui-los para verificar o comportamento de distribuição separadamente.

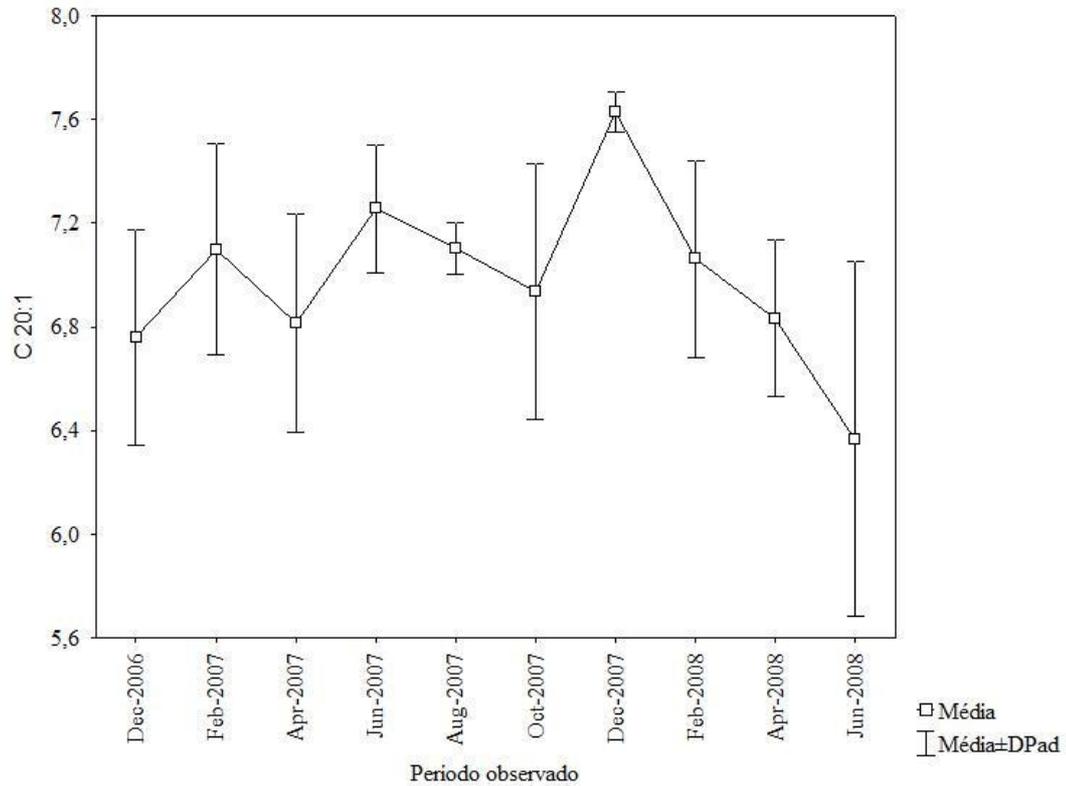


Figura 20 – Variação apresentada pelo ácido gordo C20:1 para o período amostrado.

4.3. Ácidos graxos e ciclo reprodutivo

O ciclo reprodutivo e a composição de ácidos graxos quando analisados separadamente possibilitaram a identificação de diferentes comportamentos químicos e biológicos presentes na ascídia *E. vancouverensis*. Porém foi necessário analisá-los em conjunto para identificar possíveis relações existentes entre a reprodução e a composição de ácidos graxos. Para isso foram utilizados os dados biológicos de larvas e ovos, e os dados químicos dos AG considerados majoritários. O modelo generalizado utilizado indicou que os ácidos mirístico e esteárico apresentavam correlação com a atividade reprodutiva, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2– Resultados da análise pelo Modelo Linear Generalizado (GLZ), para a relação com o número de zoóides portando larvas ou ovos. Em negrito os valores significativos.

Ácido Graxo	Graus de Liberdade	Est. Wald	p
C14:0	1	6,31968	0,011940
C16:0	1	0,41857	0,517651
C 17:0	1	3,63310	0,056641
C 18:0	1	20,29811	0,000007
C 16:1	1	0,28375	0,594256
C 18:1	1	3,57725	0,058576
C 20:1	1	0,42151	0,516185

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos Reprodutivos

O estudo da reprodução pode se basear em diferentes estratégias para identificação do período e do esforço reprodutivo. No caso das ascídias, os dois métodos mais frequentemente empregados envolvem a avaliação do recrutamento (ROCHA, 1993; GAMA *et al.*, 2006) e o exame do desenvolvimento gonadal (MILLAR, 1952). A observação das larvas também é um método de caracterização bastante utilizado para identificar e acompanhar o ciclo reprodutivo das espécies (MILLAR, 1971). No presente trabalho, a análise das estruturas gonadais não constituiu uma maneira eficiente de se avaliar a função reprodutiva. Os dados apresentados nas Figuras 15, 16 e 17 mostram variações sem um padrão muito claro. Por outro lado, a presença de ovos ou larvas incubados nos zoóides foi um indicador mais confiável do esforço reprodutivo. Em *Eudistoma*, de maneira geral, os ovos permanecem na cavidade atrial após passarem pelos ovidutos, sendo então incubados até a formação completa da larva girinóide.

Os resultados da presente pesquisa evidenciaram ciclo reprodutivo contínuo para *E. vannamei* com maior atividade reprodutiva entre os meses de dezembro e abril, com maior número larvas e ovos incubados em fevereiro. A época coincide com a estação chuvosa, porém seria necessário obter dados pluviométricos para indicar uma correlação com este fator.

Outros trabalhos sobre ciclo reprodutivo com ascídias do gênero *Eudistoma* demonstraram diferenças quanto à atividade reprodutiva. Millar (1974) ao estudar ascídias caribenhas, numa área também tipicamente tropical, encontrou um resultado diferente para *Eudistoma* sp., pois a espécie não apresentou reprodução contínua, com a atividade acontecendo durante o intervalo de junho a novembro, com picos em agosto e setembro, quando mais de 75% das colônias continham larvas. Naquele trabalho é possível perceber ainda que, embora as flutuações de temperatura sejam mínimas, o maior esforço reprodutivo se concentra em meses onde há os mínimos de temperatura. De fato, já se demonstrou que temperaturas muito elevadas também inibem a maturação gonadal das ascídias (MILLAR, 1971). Já Turon (1988) ao observar o período reprodutivo de *Eudistoma planum* presente no nordeste da Espanha, constatou que esta espécie apresentou período com maior liberação das

larvas durante os meses de maio e agosto, época considerada a mais quente do ano. Em regiões temperadas já se evidenciou claramente que a temperatura é um dos principais fatores que controla a função reprodutiva (MILLAR, 1971; HIROSE *et al.*, 2007; EPELBAUM *et al.*, 2009).

A espécie *Didemnum rodriguesi* coletada em Santa Catarina apresentou alternância sazonal entre a reprodução sexuada e assexuada. No verão, as colônias foram mais abundantes e menores, com ovos e larvas incubados e taxas de recrutamento maiores, enquanto que no inverno esse padrão foi substituído por um número menor de colônias, de maior tamanho e inférteis. A reprodução sexuada ocorreu entre os meses de novembro e maio, com maior número de ovos em janeiro e de larvas em março (RITZMANN; ROCHA; ROPER, 2009). Apesar da época ser de maior número de larvas e ovos entre *D. rodriguesi* e *E. vannahamei*, esta deve ser interpretada com cautela, pois no Ceará não há mudanças marcadas de temperatura como nas regiões sudeste e sul, sendo a sazonalidade na zona costeira marcada pelo regime pluviométrico e de ventos. Em Santa Catarina, por outro lado, a temperatura é um fator a ser considerado, e os meses de novembro a maio são os mais quentes.

5.2. Ácidos graxos

A análise de compostos químicos realizada para *E. vannahamei* no presente trabalho evidenciou a partir da fase hexânica dos extratos metanólicos uma variedade de ácidos graxos, contendo ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos poliinsaturados e ácidos graxos ramificados. A presença de ácidos graxos saturados foi descrita também por Takeara (2006) ao realizar estudo químico em ascídias do litoral nordestino utilizando as espécies *Didemnum psammotodes* e *Eudistoma vannahamei*. A partir da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannahamei* foram identificados os ácidos mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico e esteárico, enquanto que para *D. psammotodes* foram identificados os ácidos láurico, mirístico, pentadecanóico, palmítico, margárico e esteárico provenientes da fase clorofórmica do extrato metanólico.

No presente trabalho, do total de ácidos graxos identificados, os ácidos graxos saturados corresponderam a 56,71% tendo como compostos majoritários os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e margárico. Foram identificados ácidos graxos monoinsaturados (28,70%) com maior quantidade dos isômeros dos ácidos palmitoléico e oléico, e também do

ácido gondoico. Em menor quantidade foram identificados ácidos graxos poliinsaturados (4,68%), melhor representados pelo ácido araquidônico, e os ácidos graxos ramificados (9,91%) melhor representados pelas estruturas com tamanho de cadeia carbônica semelhante a dos ácidos graxos lineares pentadecanóico e palmítico.

Dagorn (2010) analisou a composição lipídica das ascídias coloniais *Eudistoma* sp. e *Leptoclinides uniorbis* coletadas na baía de Ghoubbet (Djibouti). Para *Eudistoma* sp. foram identificados 38 ácidos graxos fosfolipídicos compostos por 42,9% de ácidos graxos saturados, 31,2% de ácidos monoinsaturados e 25,9% de ácidos poliinsaturados. Diferentemente, em *L. uniorbis* foram identificados 35 ácidos graxos fosfolipídicos compostos por 29,2% de ácidos graxos saturados, 38,5% de ácidos monoinsaturados e 32,3% de ácidos poliinsaturados. Comparando os ácidos graxos de *E.vannamei* da presente pesquisa aos de *Eudistoma* sp. e *L. uniorbis*, pode-se perceber que ambas apresentaram os ácidos palmítico, esteárico e mirístico como componentes majoritários dos ácidos graxos saturados. Os compostos majoritários dos ácidos graxos monoinsaturados para *Eudistoma* sp. e *L. uniorbis* foram os ácidos palmitoléico, oléico e vacênico. É muito provável que o comportamento seja semelhante em *E. vannamei* devido aos teores observados, apesar da não indicação das insaturações nos isômeros dos ácidos palmitoléico e oléico. Dentre os componentes majoritários dos ácidos graxos poliinsaturados os maiores teores para *Eudistoma* sp. e *L. uniorbis* foram dos ácidos eicosapentaenóico e araquidônico, enquanto que para *E. vannamei* foram os ácidos araquidônico e linoléico. Os demais compostos foram bastante semelhantes com variações nos teores apresentados para cada espécie.

Outras duas ascídias coloniais estudadas foram *Eudistoma bitumis* e *Cystodytes violatinctus*, presentes na região do oceano Índico. Os ácidos graxos fosfolipídicos foram representados por mais de 99% de ácidos graxos saturados, quantidades traços de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados para *E.bituminis*, enquanto que *C. violatinctus* apresentou 64,2% de ácidos graxos saturados, 23,6% de ácidos graxos monoinsaturados e quantidades traços de ácidos graxos poliinsaturados (VIRACAOOUNDIN *et al.*, 2003). *Eudistoma vannamei* se assemelha com essas duas espécies pelo maior teor dos ácidos mirístico, palmítico e esteárico. Maior diferença observada foi quanto ao teor de ácido oléico, o qual esteve presente em *C. violatinctus* com 20% e em quantidade traço em *E.bituminis*.

A composição de ácidos graxos foi observada também para as ascídias solitárias *Styela* sp. e *Phallusia* sp., ambas da região do mediterrâneo (SLANTCHEV *et al.*, 2002). Os ácidos graxos foram observados quanto à sua concentração nos triacilgliceróis e fosfolipídios, demonstrando diferenças entre estas espécies. *Styela* sp. e *Phallusia* sp. apresentaram maiores

teores para os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, isômeros do ácido oléico e eicosapentaenóico, porém em quantidades diferentes nos triacilgliceróis e fosfolipídios. Em *Styela* sp., os ácidos docosapentaenóico e docosahexaenóico estavam concentrados apenas nos fosfolipídios. Os ácido margárico e pentadecanóico, observados em *E. vancouverensis* em maior quantidade entre os compostos ímpares, não foram observados nos triacilgliceróis e fosfolipídios de *Phallusia* sp.

Outros compostos lipídicos são encontrados em ascídias. Takeara identificou colesterol e colestanona a partir dos extratos metanólicos de *E. vancouverensis* e de *Didemnum psammotodes* coletadas no litoral cearense, tendo como principais constituintes químicos identificados os esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol (TAKEARA, 2006; TAKEARA *et al.*, 2007). No presente trabalho não foram tomados dados de esteróides, mas foi possível observar nos cromatogramas picos em TR característicos para colesterol e colestanona.

5.3. Reprodução e Ácidos Graxos

Embora os ácidos graxos sejam componentes essenciais dos organismos vivos, como elementos estruturais ou não, as funções biológicas da maioria destes compostos ainda não é bem elucidada. No presente estudo ficou evidenciada a associação entre a presença de ovos e larvas incubados na cavidade atrial e dois componentes lipídicos: o ácido gondóico e o ácido margárico.

A composição lipídica dos organismos pode variar de acordo com diferentes fatores. Animais da mesma espécie provenientes de diferentes localidades podem ter constituição diferente, como já foi visto na ascídia *Styela plicata* (KERR; BAKER, 1991). Modificações no comportamento termotrópico e na composição das cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios em diferentes épocas do ano foram demonstradas por (SANINA; KOSTETSKY, 2001) para a ascídia *Halocynthia aurantium*, possivelmente relacionadas com adaptações à temperatura da água do mar.

Tais diferenças podem resultar de variações na composição da dieta, estágio de vida, sanidade, ou ainda de suas características genéticas. No presente estudo as amostras foram todas provenientes de uma mesma localidade, de maneira que as variações ambientais e

disponibilidade alimentar precisariam ser melhor analisados para observância de alterações ao longo dos anos.

As variações resultantes de modificações na temperatura da água e do grau de maturação sexual já foram estudadas em alguns organismos cultivados, como a ostra perliífera *Pinctada fucata martensii* (SAITO, 2004). No caso específico das ascídias em ambientes naturais, contudo, poucas informações estão disponíveis.

O ácido gundóico e o ácido margárico são lipídios frequentemente encontrados em vegetais, e sua presença em variação pode estar relacionada com a dieta de *E. vannamei*. É importante ressaltar que as associações aqui evidenciadas não são indicativas de relação causal. Dessa forma, o período chuvoso pode estar marcando a estação reprodutiva na ascídia, mas também ocasionando um aumento nas populações de determinadas microalgas ricas em ácido gundóico e margárico que serviriam de alimento para o animal.

Por outro lado, é clara a relação que existe entre a qualidade do alimento e o sucesso reprodutivo dos animais. Para copépodos que se alimentam de microalgas, Vehma *et al.* (2011) mostraram que há um efeito da composição da dieta, relacionado com os teores de ácidos graxos das microalgas, na produção de ovos. Wichard (2007) também já havia demonstrado a importância dos ácidos graxos na reprodução dos copépodos.

Estudos adequados sobre a composição e dinâmica temporal da comunidade planctônica na zona costeira do Ceará seriam necessários para identificar quais espécies de microalgas estão disponíveis para os animais filtradores, e se há variação na composição específica ou abundância do fitoplâncton. A identificação desses constituintes auxiliaria como ferramenta alternativa para caracterização da dieta alimentar de *E.vannamei* visto que ao analisar algumas pelotas fecais dessa espécie foi possível observar sob microscópio a presença de compostos celulares e fragmentos de carapaça de diatomáceas.

6. CONCLUSÕES

A análise das estruturas gonadais constituiu uma maneira eficiente de se avaliar a função reprodutiva, sendo a presença de ovos ou larvas incubados nos zoóides um indicador mais confiável do esforço reprodutivo.

E. vannamei apresentou atividade reprodutiva contínua, com maior intensidade entre os meses de dezembro e abril (estação chuvosa), e com maior número larvas e ovos incubados em fevereiro.

Do total de ácidos graxos identificados, os ácidos graxos saturados corresponderam a 56,71%, monoinsaturados a 28,70%, poliinsaturados com apenas 4,68% e ramificados com 9,91%.

Os ácidos graxos predominantes foram os ácidos mirístico, palmítico, margárico, esteárico, palmitoléico, oléico e gondóico.

Dentre os ácidos graxos majoritários, os ácidos mirístico e esteárico apresentaram variações correlacionadas ao período reprodutivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUEL, H.; HARJES, M.; ROCHA, R.; STUBING, D.; HAGEN, W. Lipid biomarkers indicate different ecological niches and trophic relationships of the Arctic hyperiid amphipods *Themisto abyssorum* and *T. libellula*. **Polar Biology**, v.25, p.374-383. 2002.
- BERGÉ, J. P.; BARNATHAN, G. Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v.96, p.49-125. 2005.
- DAGORN, F.; DUMAY, J.; WIELGOSZ-COLLIN, G.; RABESAOTRA, V.; VIAU, M.; MONNIOT, C.; BIARD, J.-F.; BARNATHAN, G. Phospholipid distribution and phospholipid fatty acids of the tropical tunicates *Eudistoma sp.* and *Leptoclinides uniorbis*. **Lipids**, v.45, p.253-261. 2010.
- DEIBEL, D.; CAVALLETO, J. F.; RIEHL, M.; GARDNER, W. S. Lipid and lipid class content of the pelagic tunicate *Oikopleura vanhoeffeni*. **Marine Ecology Progress Series**, v.88, p.297-302. 1992.
- DIAS, G. M. **Estrutura de comunidade e variabilidade genética de ascídias coloniais do entremarés rochoso**. 2004. 122 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- DIAS, G. M. **Influência de interações bióticas na aptidão, abundância e defesa de ascídias coloniais** 2008. 93 f. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- DURANTE, K. M.; SEBENS, K. P. Reproductive ecology of the ascidians *Molgula citrina* Alder & Hancock, 1848 and *Aplidium glabrum* (Verrill, 1871) from the gulf of Maine, USA. **Ophelia**, v.39, p.1-21. 1994.
- EPELBAUM, A.; HERBORG, L. M.; THERRIAULT, T. W.; PEARCE, C. M. Temperature and salinity effects on growth, survival, reproduction, and potential distribution of two non-indigenous botryllid ascidians in British Columbia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.369, p.43-52. 2009.
- GAMA, P. B.; LEONEL, R. M. V.; HERNÁNDEZ, M. I. M.; MOTHESE, B. Recruitment and colonization of colonial ascidians (Tunicata: Ascidiacea) on intertidal rocks in Northeastern Brazil. **Iheringia, Sér. Zool.**, v.96, n.2, p.165-172. 2006.
- GOODBODY, I. Continuous breeding in three species of tropical ascidians. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v.136, p.403-409. 1961.
- GOODBODY, I. The Physiology of Ascidians. **Advances in Marine Biology**, v.12, p.1-149. 1974.
- GRAEVE, M.; DAUBY, P.; SCAILTEUR, Y. Combined lipid, fatty acid and digestive tract content analyses: a penetrating approach to estimate feeding modes of Antarctic amphipods. **Polar Biology**, v.24, p.853-862. 2001.
- GRAEVE, M.; KATTNER, G.; PIEPENBURG, D. Lipids in Arctic benthos: does the fatty acid and alcohol composition reflect feeding and trophic interactions? **Polar Biology**, v.18, p.53-61. 1997.
- GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: R. Curi; C. Pompéia; C. K. Miyasaka ; J. Procopio (Ed.). **Entendendo a gordura: Os ácidos graxos**. Barueri: Editora Manole, 2002. p.5-23.

HAGEMANN, A.; VOIGT, O.; WÖRHEIDE, G.; THIEL, V. The sterols of calcareous sponges (Calcarea, Porifera). **Chemistry and Physics of Lipids**, v.156, p.26-32. 2008.

HIROSE, E.; KOJIMA, A.; NOGAMI, J.; TERUYA, K. Seasonality of sexual reproduction in three photosymbiotic *Trididemnum* species (Didemnidae: Ascidiacea: Tunicata) in a subtropical sea grass bed. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.87, p.979-982. 2007.

HURLBUT, C. J. Larval release and supply predict temporal variation in settlement of a colonial ascidian. **Marine Ecology Progress Series**, v.80, p.215-219. 1992.

JIMENEZ, P. C. **Bioprospecção de substâncias com potencial antitumoral em ascídias do litoral cearense: Estudos com *Eudistoma vannamei* MILLAR, 1977 (Urochordata, Ascidiacea)**. 2004. 93 f. Dissertação de Mestrado - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.287, p.93-101. 2003.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; TAKEARA, R.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v.151, p.391-398. 2008.

JU, S.-J.; HARVEY, H. R. Lipids as markers of nutritional condition and diet in the Antarctic krill *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias* during austral winter **Deep-Sea Research II**, v.51, p.2199-2214. 2004.

KERR, R. G.; BAKER, B. J. Marine Sterols. **Natural Product Reports**, v.8, p.465-497. 1991.

KOTT, P. The Australian Ascidiacea. Part 2, Aplousobranchia (1). **Memoirs of the Queensland Museum**, v.29, n.1, p.1-266. 1990.

LAMBERT, C. C. Historical introduction, overview and reproductive biology of the protochordates. **Can. J. Zool.**, v.83, p.1-7. 2005a.

LAMBERT, G. Ecology and Natural History of the Protochordates. **Canadian Journal Zoology**, v.83, p.34-50. 2005b.

LEVINTON, J. S. *Marine Biology: Function, Biodiversity, Ecology*: Oxford University Press, Inc. . 2001. 515 p.

LÓPEZ-LEGENTIL, S.; RUCHTY, M.; DOMENECH, A.; TURON, X. Life cycles and growth rates of two morphotypes of Cystodites (Ascidiacea) in the western Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v.296, p.219-228. 2005.

LOTUFO, T. M. C. **Ecologia das ascídias da Baía de Santos (SP): período reprodutivo, crescimento e aspectos sucessionais**. 1997. 113 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

LOTUFO, T. M. C. **Ascidiacea (Chordata: Tunicata) do Litoral Tropical Brasileiro**. 2002. 183 f. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

- LOTUFO, T. M. C.; SILVA, A. M. B. Ascidiacea. In: H. Matthews-Cascon ; T. M. C. Lotufo (Ed.). **Biota marinha da Costa Oeste do Ceará**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p.221-247.
- MAAZOUZI, C.; MASSON, G.; IZQUIERDO, M. S.; PIHAN, J. C. Fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: Feeding strategies and trophic links. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.147, p.868-875. 2007.
- MATTHEWS-CASCON, H.; LOTUFO, T. M. C. Biota marinha da Costa Oeste do Ceará. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2006. 248 p. (Biodiversidade)
- MAYZAUD, P.; BOUTOUTE, M.; PERISSINOTTO, R.; NICHOLS, P. Polar and neutral lipid composition in the pelagic Tunicate *Pyrosoma atlanticum*. **Lipids**, v.42, p.647-657. 2007.
- MCHENRY, M. J. The morphology, behavior, and biomechanics of swimming in ascidian larvae. **Canadian Journal Zoology**, v.83, p.62-74. 2005.
- MILLAR, H. R. The annual growth and reproductive cycle in four ascidians. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.31, p.41-60. 1952.
- MILLAR, H. R. The annual growth and reproductive cycle of the ascidian *Dendrodoa grossularia* (Van Beneden). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.33, p.33-48. 1954.
- MILLAR, H. R. Some ascidians from Brazil. **Annals and Magazine of Natural History**, v.1, n.13, p.497-514. 1958b.
- MILLAR, H. R. The biology of ascidians. **Advances in Marine Biology**, v.9, p.1-100. 1971.
- MILLAR, H. R. A note on the breeding season of the three ascidians on Coral Reefs at Galeta in the Caribbean Sea. **Marine Biology**, v.28, p.127-129. 1974.
- MILLAR, H. R. Ascidiaceae (Tunicata: Ascidiacea) from the Northern and Northeastern Brazilian Shelf. **Journal of Natural History**, v.11, p.169-223. 1977.
- MONNIOT, C.; MONNIOT, F.; LABOUTE, P. Coral Reef Ascidiaceae of New Caledonia. Paris: Orstom Editions. 1991. 247 p
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciênc. agrotec.**, v.32, n.4, p.1245-1251. 2008.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier. 2002. 975 p
- OLIVEIRA-FILHO, R. R. **Caracterização das ascídias em regiões portuárias do Ceará**. 2010. 109 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- OLIVEIRA, F. A. S. **Caracterização dos Didemnidae (Chordata:Tunicata) em simbiose com microalgas no litoral do Ceará** 2007. 24 f. Monografia de Graduação - Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- OLIVEIRA, F. A. S. **Estudo da diversidade dos micro-organismos associados a ascídias coloniais (Tunicata, Ascidiacea)** 2010. 65 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências do mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

- PALERMO, J. A.; BRASCO, M. F. R.; HUGHES, E. A.; SELDES, A. M.; BALZARETTI, V. T.; CABEZAS, E. Short side chain sterols from the tunicate *Polizoa opuntia*. **Steroids**, v.61, p.2-6. 1996.
- PUCCIA, E.; MESSINA, C. M.; CANGIALOSI, M. V.; D'AGATI, P.; MANSUETO, C.; PELLERITO, C.; NAGY, L.; MANSUETO, V.; SCOPELLITI, M.; FIORE, T.; PELLERITO, L. Lipid and fatty acid variations in *Ciona intestinalis* ovary after tri-n-butyltin (IV)chloride exposure. **Applied Organometallic Chemistry**, v.19, p.23-29. 2005.
- RITZMANN, N. F.; ROCHA, R. M.; ROPER, J. J. Sexual and asexual reproduction in *Didemnum rodriguesi* (Ascidiacea, Didemnidae). **Iheringia, Ser. Zool.**, v.99, n.1, p.106-110. 2009.
- ROCHA, R. M. **Ascídias coloniais do Canal de São Sebastião, SP: Aspectos ecológicos**. 133 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.
- ROCHA, R. M. Replacement of the compound ascidian species in a southeastern Brazilian fouling community. **Bolm. Inst. oceanogr., S Paulo**, v.39, p.141-153. 1991.
- ROCHA, R. M. **Comunidade incrustante em substrato duro não estabilizado na zona entremarés (São Sebastião, SP)**. 148 f. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- ROCHA, R. M.; FARIA, S. B. Ascidians at Currais Islands, Paraná, Brazil: taxonomy and distribution. **Biota Neotropica**, v.5, p.1-20. 2005.
- ROCHA, R. M.; KREMER, L. P.; BAPTISTA, M. S.; METRI, R. Bivalve cultures provide habitat for exotic tunicates in southern Brazil. **Aquatic Invasions**, v.4, n.1, p.195-205. 2009.
- ROCHA, R. M.; LOTUFO, T. M. C.; RODRIGUES, S. A. The biology of *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in southern Brazil: spatial distribution and reproductive cycle. **Bulletin of Marine Science**, v.64, p.77-87. 1999.
- ROCHA, R. M.; METRI, R.; OMURO, J. Y. Spatial distribution and abundance of ascidians in a bank of coralline algae at Porto Norte, Arvoredo Island, SantaCatarina. **Journal of Coastal Research**, v.Special Issue 39, p.1676-1679. 2006.
- ROCHA, R. M.; MORENO, T. R.; METRI, R. Ascídias (Tunicata: Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, p.461-476. 2005.
- RODRIGUES, S. A. Ascidiacea. In: (Ed.). **História Natural dos Organismos Aquáticos do Brasil, Tunicata**. 1964. p.299-304.
- RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M.; LOTUFO, T. M. C. Guia ilustrado para a identificação das ascídias do Estado de São Paulo. São Paulo: IBUSP/ FAPESP. 1998. 190 p.
- SAITO, H. Lipid and FA composition of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii*: Influence of Season and Maturation. **Lipids**, v.39, p.997-1005. 2004.
- SANINA, N. M.; KOSTETSKY, E. Y. Seasonal changes in termotrophic behavior of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in different organs of the ascidian *Halocynthia aurantium*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.128, p.295-305. 2001.
- SAWADA, H.; YOKOSAWA, H.; LAMBERT, C. C. The Biology of Ascidians. Tokyo: Springer-Verlag. 2001. 470 p

SLANTCHEV, K.; YALÇIN, F.; ERSÖZ, J. N.; ÇALIS, I.; STEFANOV, K.; POPOV, S. Composition of lipophylic extracts from two tunicates, *Styela sp.* and *Phallusia sp.* from the Eastern Mediterranean. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.57c, p.534-540. 2002.

SMITH, A.; MORAES, J. O. Estudos preliminares sobre a geologia ambiental costeira do estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.23, p.85-96. 1984.

STUBING, D.; HAGEN, W.; SCHMIDT, K. On the use of lipid biomarkers in marine food web analyses: An experimental case study on the Antartic krill, *Euphausia superba*. **Limnology and Oceanography**, v.48, p.1685-1700. 2003.

TAKEARA, R. **Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias *Didemnum psammotodes* (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea)**. 2006. 211 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

TAKEARA, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; JIMENEZ, P. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LOTUFO, T. M. C. Constituintes químicos da ascídia *Didemnum psammotodes* (Sluiter, 1895) coletada na costa cearense. **Química Nova**, v.30, p.1179-1181. 2007.

TURON, X. The ascidians of Tossa de Mar (NE of Spain) II. Biological cycles of the colonial species. **Cahiers de Biologie Marine**, v.29, p.207-418. 1988.

TURON, X.; BECERRO, M. A. Growth and survival of several ascidian species from the northwestern Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v.82, p.235-247. 1992.

VAN NAME, W. G. The North and South American Ascidians. **Bulletin American Museum of Natural History**, v.84, p.1-476. 1945.

VEHMAA, A.; LARSSON, P.; VIOUDEZ, C.; POHNERT, G.; REINIKAINEN, M.; ENGSTROM-OST, J. How will increased dinoflagellate: diatom ratios affect copepod egg production?- A case study from the Baltic Sea **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.401, p.134-140. 2011.

VERLENGIA, R.; LIMA, T. M. Síntese de ácidos graxos. In: R. Curi; C. Pompéia; C. K. Miyasaka ; J. Procopio (Ed.). **Entendendo a gordura: Os ácidos graxos**. Barueri: Editora Manole, 2002. p.121-133.

VIRACAOOUNDIN, I.; BARNATHAN, G.; GAYDOU, E. M.; AKNIN, M. Phospholipid FA from Indian Ocean Tunicates *Eudistoma bituminis* and *Cystodytes violatinctus*. **Lipids**, v.38, p.85-88. 2003.

WICHARD, T.; GERECHE, A.; BOERSMA, M.; POULET, S. A.; WILTSHIRE, K.; POHNERT, G. Lipid and fatty acid composition of diatoms revisited: Rapid wound-activated change of food quality parameters influences herbivorous copepod reproductive success. **Chembiochem**, v.8, p.1146-1153. 2007.

YAMAGUCHI, M. Growth and reproductive cycles of the marine fouling ascidians *Ciona intestinales*, *Styela plicata*, *Botrylloides violaceus*, and *Leptoclinium mitsukurii* at Aburatsubi-Moroiso Inlet (Central Japan). **Marine Biology**, v.29, p.253-259. 1975.

ZAIA, D. A. M. Os lipídios e a origem da vida. In: R. Curi; C. Pompéia; C. K. Miyasaka ; J. Procopio (Ed.). **Entendendo a gordura: Os ácidos graxos**. Barueri: Editora Manole, 2002. p.1-4.

8. APÊNDICE

8.1. APÊNDICE A – Periodicidade das coletas em função da variação das marés.

COLETA	AMOSTRA	DATA	MARÉ*
01	01-10	08/10/2006	0.0
02	11-20	02/12/2006	0.4
03	21-30	18/02/2007	0.1
04	31-40	18/04/2007	-0.1
05	41-50	15/06/2007	0.1
06	51-60	31/08/2007	0.2
07	61-70	27/10/2007	0.1
08	71-80	22/12/2007	0.4
09	81-90	23/02/2008	0.3
10	91-100	19/04/2008	0.3
11	101-110	18/06/2008	0.4
12	111-120	30/08/2008	0.1
13	121-130	11/02/2009	0.1
14	131-140	25/04/2009	0.1
15	141-150	21/06/2009	0.2
16	151-160	22/08/2009	0.0
17	161-170	18/10/2009	0.2
18	171-180	28/02/2010	0.0
19	181-190	30/04/2010	0.2
20	191-200	27/06/2010	0.3

*As marés foram definidas com base na Tábua de Marés oferecida pela Diretoria de Hidrografia e Navegação (DHN).

8.2. APÊNDICE B – Número de zoóides identificados quanto ao estágio de maturação gonadal em cada amostra. AG: ausência de gônadas; GIM: gônadas em início de maturação; GM: gônadas maduras; LV/OV: larvas e ovos; – ausência de análise biológica.

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
01	01-10	–	–	–	–
02	11	0	2	8	0
02	12	1	3	6	0
02	13	0	1	9	0
02	14	1	3	6	2
02	15	0	3	7	0
02	16	0	6	4	0
02	17	6	2	2	1
02	18	3	3	4	0
02	19	4	4	2	0
02	20	0	8	2	1
03	21	1	4	5	2
03	22	0	0	10	3
03	23	1	4	5	0
03	24	0	8	2	0
03	25	0	2	8	0
03	26	0	2	8	2
03	27	4	2	4	1
03	28	0	3	7	0
03	29	1	2	7	0
03	30	2	1	7	5
04	31	0	0	10	0
04	32	0	0	10	0

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
04	33	0	0	10	0
04	34	0	3	7	0
04	35	1	2	7	1
04	36	0	2	8	1
04	37	0	0	10	1
04	38	0	0	10	3
04	39	0	4	6	3
04	40	2	1	7	0
05	41	1	2	7	1
05	42	0	4	6	0
05	43	0	0	10	0
05	44	0	4	6	0
05	45	1	4	5	0
05	46	0	2	8	1
05	47	1	3	6	0
05	48	0	2	8	0
05	49	0	1	9	0
05	50	0	2	8	0
06	51	0	2	8	0
06	52	0	1	9	0
06	53	0	5	5	0
06	54	2	2	6	0
06	55	1	4	5	0
06	56	0	5	5	1
06	57	0	0	10	0
06	58	0	1	9	0

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
06	59	0	5	5	0
06	60	1	2	7	5
07	61	0	6	4	0
07	62	0	7	3	1
07	63	1	8	1	0
07	64	3	4	3	0
07	65	4	4	2	0
07	66	1	5	4	6
07	67	7	1	2	1
07	68	3	4	3	3
07	69	1	3	6	0
07	70	4	4	2	0
08	71	1	9	0	1
08	72	3	5	2	3
08	73	1	2	7	4
08	74	3	6	1	4
08	75	4	5	1	0
08	76	1	5	4	4
08	77	0	7	3	0
08	78	2	6	2	1
08	79	2	4	4	3
08	80	4	5	1	6
09	81	0	4	6	7
09	82	4	4	2	4
09	83	2	7	1	2
09	84	3	2	5	6

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
09	85	0	4	6	7
09	86	4	3	3	5
09	87	3	5	2	1
09	88	5	4	1	1
09	89	4	6	0	1
09	90	7	3	0	0
10	91	2	6	2	1
10	92	3	4	3	0
10	93	0	8	2	2
10	94	1	8	1	0
10	95	1	7	2	0
10	96	3	4	3	0
10	97	3	3	4	0
10	98	0	8	2	1
10	99	0	6	4	2
10	100	3	3	4	0
11	101	2	6	2	2
11	102	1	7	2	1
11	103	1	5	4	0
11	104	0	5	5	0
11	105	2	5	3	1
11	106	2	7	1	1
11	107	3	4	3	0
11	108	6	4	0	0
11	109	4	6	0	0
11	110	8	2	0	0

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
12	111-120	–	–	–	–
13	121	1	8	1	0
13	122	0	5	5	7
13	123	3	3	4	3
13	124	5	3	2	1
13	125	4	3	3	1
13	126	5	3	2	1
13	127	5	2	3	0
13	128	1	1	8	1
13	128	2	5	3	0
13	130	6	2	2	0
14	131	2	3	5	1
14	132	10	0	0	0
14	133	8	2	0	0
14	134	10	0	0	0
14	135	7	2	1	2
14	136	9	0	1	1
14	137	9	1	0	2
14	138	9	0	1	0
14	139	9	1	0	0
14	140	8	0	2	3
15	141	3	5	2	0
15	142	6	0	4	0
15	143	2	2	6	1
15	144	6	1	3	0
15	145	3	5	2	0

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
15	146	4	5	1	0
15	147	8	2	0	0
15	148	8	1	1	0
15	149	8	2	0	0
15	150	5	4	1	3
16	151	9	1	0	0
16	152	3	5	2	1
16	153	6	4	0	3
16	154	4	2	4	1
16	155	8	2	0	1
16	156	5	0	5	0
16	157	5	2	3	0
16	158	8	0	2	0
16	159	6	2	2	1
16	160	9	0	1	0
17	161	3	3	4	6
17	162	6	1	3	0
17	163	6	0	4	0
17	164	4	1	5	0
17	165	2	1	7	8
17	166	3	2	5	3
17	167	4	3	3	0
17	168	4	2	4	5
17	169	7	3	0	3
17	170	6	2	2	2
18	171	3	1	6	3

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
18	172	8	1	1	0
18	173	6	2	2	4
18	174	5	1	4	3
18	175	7	2	1	0
18	176	9	0	1	3
18	177	2	3	5	6
18	178	7	2	1	2
18	179	2	2	6	2
18	180	7	3	0	2
19	181	4	3	3	1
19	182	4	3	3	0
19	183	9	1	0	1
19	184	8	1	1	2
19	185	3	1	6	0
19	186	9	1	0	0
19	187	3	2	5	7
19	188	6	3	1	5
19	189	3	3	4	0
19	190	4	3	3	5
20	191	10	0	0	0
20	192	10	0	0	0
20	193	9	0	1	2
20	194	1	2	7	6
20	195	2	6	2	5
20	196	5	5	0	1
20	197	7	3	0	0

COLETA	AMOSTRA	AG	GIM	GM	LV/OV
20	198	10	0	0	0
20	199	1	5	4	5
20	200	1	0	9	1
Subtotal		595	542	663	243
Total de zoóides observados			1800		