



IPMA

Instituto Português
do Mar e da Atmosfera

RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

**CICLO REPRODUTIVO, ÍNDICE DE CONDIÇÃO E
TAMANHO DE PRIMEIRA MATURAÇÃO SEXUAL
DA AMÊIJOA - JAPONESA
Ruditapes philippinarum (ADAMS & REEVE, 1850)
NA RIA DE AVEIRO, PORTUGAL**

Francisco Maia, Carlos Barroso e Miguel Gaspar

2021

28



RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPMA – SÉRIE DIGITAL

Destinam-se a promover uma divulgação rápida de resultados de carácter científico e técnico, resultantes da atividade de investigação e do desenvolvimento e inovação tecnológica nas áreas de investigação do mar e da atmosfera. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes, podendo os trabalhos serem escritos em Português, Francês ou Inglês.

Edição

IPMA

Rua C - Aeroporto de Lisboa

1749-007 LISBOA

Portugal

Corpo Editorial

Francisco Ruano – Coordenador

Aida Campos

Irineu Batista

Lourdes Bogalho

Mário Mil-Homens

Rogélia Martins

Teresa Drago

Edição Digital

Conceição Almeida

As instruções aos autores estão disponíveis no sitio web do IPMA

<http://ipma.pt>

ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação

Capa

Conceição Almeida

ISSN

2183-2900

Todos os direitos reservados

**CICLO REPRODUTIVO, ÍNDICE DE CONDIÇÃO E TAMANHO DE PRIMEIRA
MATURAÇÃO SEXUAL DA AMÊIJOA-JAPONESA *Ruditapes philippinarum*
(ADAMS & REEVE, 1850) NA RIA DE AVEIRO, PORTUGAL**

Francisco Maia¹, Carlos Barroso², Miguel Gaspar³

¹Instituto Português do Mar e da Atmosfera (DivRP), Rua do Dr. Bernardino Machado s/n, 3800-155 Aveiro.

² Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro.

³Instituto Português do Mar e da Atmosfera (DivRP), Avenida 5 de Outubro s/n, 8700-305 Olhão.

Recebido em: 2020.09.11

Aceite em: 2021.01.20

RESUMO

O presente estudo reporta o ciclo reprodutivo, índice de condição e o tamanho da primeira maturação da amêijoia-japonesa *Ruditapes philippinarum* na Ria de Aveiro (Portugal). O ciclo reprodutivo foi monitorizado durante um período de 1 ano, de Janeiro a Dezembro de 2013, e classificado em 6 estados de maturação de acordo com a observação microscópica de cortes histológicos das gónadas. A época de desova decorreu de Abril a Outubro, com um pico de maior intensidade no final do Verão (Agosto e Setembro). O índice de condição apresentou um padrão sazonal bem definido, que parece estar relacionado com o ciclo reprodutivo da espécie. A primeira maturação sexual da amêijoia-japonesa decorre durante o seu primeiro ano de vida, quando os animais atingem um comprimento de concha de 20,0 mm. Foi ainda comparada a estratégia reprodutiva e o crescimento da amêijoia-japonesa na Ria de Aveiro com a sua congénere nativa amêijoia-boa (*Ruditapes decussatus*).

Palavras chave: Bivalves, *Ruditapes philippinarum*, índice de condição, tamanho da primeira maturação, competição interespecífica, *Ruditapes decussatus*, gestão de recursos pesqueiros.

ABSTRACT

Title: Reproductive cycle, condition index and size at first sexual maturity of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in the Ria de Aveiro, Portugal. This study reports the reproductive cycle, condition index and the size at first maturity of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ria de Aveiro (Portugal). The reproductive cycle was monitored over 1-year period, from January to December 2013, and the development of the gonads was classified into six successive maturity stages according with the microscopic observation of histological sections of the gonads. Spawning extended from April to October, with a peak by the end of summer (August and September). The condition index showed a distinct seasonal pattern which appear to be related to the reproductive cycle. The size at first sexual maturity was attained at a shell length of 20.0 mm, within the first year of life. Additionally, the reproductive strategy and the growth parameters were compared between the Manila clam and its congeneric native species the Grooved carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*).

Keywords: Bivalves, *Ruditapes philippinarum*, condition index, size at first maturity, interspecific competition, *Ruditapes decussatus*, fisheries resource management.

Referência bibliográfica: MAIA, F; BARROSO, C., GASPAR, M., 2020. Ciclo reprodutivo, índice de condição e primeira maturação da amêijoia-japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) na Ria de Aveiro, Portugal. **Relatórios Científicos e Técnicos do IPMA (<http://ipma.pt>) n° 28, 33pp.**

INTRODUÇÃO

A amêijoa-japonesa *Ruditapes philippinarum* é uma espécie exótica de carácter invasor indígena das zonas costeiras dos mares subtropicais e temperados do Pacífico Ocidental, estendendo-se do Sul do mar da China para o Norte até ao mar de Okhotsk, incluindo o mar do Japão, com grande capacidade de adaptação a novos habitats e que se estabeleceu com sucesso em vários ecossistemas fora da sua distribuição geográfica natural. As suas elevadas taxas de crescimento e reprodução (Delgado & Pérez-Camacho, 2007; Moura et al., 2018), ampla tolerância a diversos fatores ambientais (Velez et al., 2016), assim como a resistência a determinadas doenças e agentes patogénicos (Moreira et al., 2012; Daniel Pires, 2018) tornaram-na uma ótima candidata para aquacultura, tendo sido introduzida intencionalmente com esse fim em diversos países europeus (Gouilletquer, 2015).

Apesar do cultivo da amêijoa-japonesa não ser permitido em Portugal, existem registos da sua ocorrência em águas nacionais desde o início da década de 80, nomeadamente na Ria Formosa onde foram identificados os primeiros exemplares (Ruano & Sobral, 2000). O declínio das populações selvagens da sua congénere nativa *Ruditapes decussatus* e os baixos rendimentos da pesca daí resultantes contribuíram para a introdução deliberada desta espécie em diversas zonas de produção de moluscos bivalves do país, estando actualmente presente em vários estuários e sistemas lagunares portugueses (e.g. estuários do Tejo e Sado, Lagoa de Óbidos, Lagoa de Albufeira e Ria de Aveiro).

A captura comercial de amêijoa-japonesa na Ria de Aveiro teve início em 2010 com um registo anual de desembarques em lota na ordem das 3 toneladas e um volume de vendas de aproximadamente 5 000 €. Num período de tempo relativamente curto as capturas aumentaram significativamente e em 2012 os desembarques já excediam as 437 toneladas anuais e geravam rendimentos de cerca de 840 000 €. Este facto demonstra o forte carácter invasivo da espécie e a importância comercial deste recurso para as comunidades piscatórias da região. Não obstante o elevado contributo económico da amêijoa-japonesa para o rendimento dos mariscadores locais, convém referir que a introdução e proliferação de espécies exóticas invasoras numa dada região pode causar sérios problemas às espécies autóctones devido a fenómenos de competição interespecífica por espaço e alimento (Czech, B. & Krausman, P., 1997; Wilcove et al., 1998; Solidoro et al., 2000), predação (Cohen et al., 1995; Levings et al., 2002), ou ainda como vector de transmissão de agentes patogénicos ou parasitas (Crowl et al., 2008). Os efeitos das espécies invasoras sobre as espécies nativas são imprevisíveis e podem causar um declínio populacional ou até mesmo a sua extinção nas

áreas invadidas (Byrnes et al., 2007), com graves consequências económicas e sociais por vezes de carácter irreversível e de difícil contabilização.

A recente introdução da amêijoa-japonesa (entre 2008 e 2009) e a rápida e descontrolada disseminação na Ria de Aveiro é um motivo de preocupação, em virtude do seu alto potencial invasor e capacidade de excluir as espécies nativas de maior valor comercial, nomeadamente as espécies de bivalves pertencentes à mesma família Veneridae com as quais partilha atributos ecológicos semelhantes, como por exemplo a amêijoa-macha (*Venerupis corrugata*) e especialmente a amêijoa-boia (*Ruditapes decussatus*), com a qual compete no mesmo nicho ecológico. O conhecimento sobre a biologia da amêijoa-japonesa é fundamental para compreender as vantagens adaptativas e o sucesso competitivo desta espécie invasora sobre as espécies autóctones e na definição de estratégias de gestão eficazes que minimizem o seu impacto no ecossistema e que promovam a preservação, valorização e a exploração sustentada dos recursos autóctones da Ria de Aveiro. É neste contexto que se desenvolve o presente estudo sobre o ciclo reprodutivo, índice de condição e tamanho da primeira maturação da amêijoa-japonesa na Ria de Aveiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

Selecionou-se para local de amostragem um banco natural permanentemente submerso localizado no Canal de S. Jacinto-Ovar, próximo da vila da Torreira (Fig. 1). A seleção deste banco em particular deve-se ao facto de ser frequentemente utilizado por pescadores profissionais como local de captura de moluscos bivalves, nomeadamente de amêijoa-japonesa. O canal de S. Jacinto-Ovar, com cerca de 25 km de extensão, atravessa todo o sector central da Ria de Aveiro estendendo-se para norte desde a povoação de São Jacinto até à cidade de Ovar. Este canal é limitado a oeste por uma faixa litoral relativamente estreita que o separa do Oceano Atlântico. A pescaria de moluscos bivalves nesta zona da Ria de Aveiro reveste-se de especial importância sobretudo para os núcleos piscatórios de S. Jacinto, Murtosa e Torreira.



Figura 1. Ria de Aveiro. Localização da zona de amostragem de amêijoia-japonesa (1).

Figure 1. Ria de Aveiro. Manila clam sampling site location (1).

Ciclo Reprodutivo

O ciclo reprodutivo de *Ruditapes philippinarum* foi monitorizado durante o período de 1 ano, entre Janeiro e Dezembro de 2013, através da análise microscópica da gónada dos animais. Para esse efeito, foram recolhidos todos os meses 40 exemplares adultos, com comprimentos de concha superiores a 30 mm, e processados segundo métodos histológicos clássicos que têm produzido bons resultados em estudos desta natureza (ver protocolo de histologia em anexo; Maia et al., 2006). Após o processamento dos tecidos/gónadas, as preparações foram observadas ao microscópio ótico e classificadas de acordo com o seu estado de maturação sexual. Neste trabalho foi utilizada a escala de maturação proposta por Gaspar (1996), introduzindo-lhe apenas ligeiras alterações, de forma a adaptá-la à espécie em estudo:

Estado 0 – Repouso Sexual

Este estado é caracterizado pela abundância de tecido conjuntivo. Os folículos gonadais são escassos, pequenos e encontram-se dispersos pela massa visceral. Na maioria dos casos estão vazios, mas alguns podem conter células germinais não diferenciadas. Não há sinais de oogénese ou espermatogénese ativa e é impossível determinar o sexo dos animais (Fig. 2A e Fig. 3A).

Estado I – Gametogénese Inicial

Esta fase é caracterizada pelo aumento do número e dimensão dos folículos. A quantidade de tecido conjuntivo interfolicular diminui significativamente. As paredes foliculares tornam-se mais espessas e exibem células germinativas em diferentes fases de maturação. A gónada feminina apresenta oócitos imaturos em estágios iniciais de desenvolvimento, incrustados nas paredes foliculares ou ligados a estas por um pedúnculo citoplasmático (Fig. 2B). Nos machos é possível distinguir espermatogónias, espermatócitos, espermatídeos e, ocasionalmente, alguns espermatozóides (Fig. 3B).

Estado II – Gametogénese Avançada

Esta fase é caracterizada pelo aumento do diâmetro dos folículos e pela ausência quase total de tecido conjuntivo interfolicular. No interior dos folículos coexistem gâmetas em diferentes estados de maturação. Nos exemplares femininos, a maioria dos oócitos encontra-se ainda

ligada à parede folicular por um pedúnculo citoplasmático, assumindo uma forma piriforme. Já se detectam oócitos livres no lúmen folicular (Fig. 2C). Nos exemplares masculinos, as espermatogônias, espermatócitos e espermatídeos ainda estão presentes. No entanto, o interior dos folículos é majoritariamente preenchido por espermatozóides maduros que se organizam em “feixes” com os flagelos orientados para o lúmen folicular (Fig. 3C).

Estado III – Maturação

Esta fase é caracterizada pelo desaparecimento do tecido conjuntivo interfolicular. Os folículos apresentam o seu diâmetro máximo, ocupam praticamente toda a gónada e estão repletos de gametas maduros. Esta etapa do ciclo reprodutivo indica o fim da gametogénese, no entanto ainda é possível observar algumas células sexuais em diferentes estados de desenvolvimento. O interior dos folículos femininos está densamente preenchido por oócitos livres com configuração poligonal (Fig. 2D). Os folículos masculinos estão totalmente preenchidos por espermatozoides maduros, dispostos em rosetas (Fig. 3D).

Estado IV – Desova

Esta fase caracteriza-se pela emissão dos gametas. À medida que a desova avança observa-se uma redução gradual das dimensões dos folículos e da densidade de gametas no seu interior. Alguns folículos poderão estar total ou parcialmente vazios. O tecido conjuntivo interfolicular é abundante. Nos exemplares femininos, os oócitos assumem uma forma mais arredondada como consequência da diminuição da pressão folicular (Fig. 2E). Nos exemplares masculinos, as rosetas de espermatozóides desorganizam-se e observam-se espaços vazios no lúmen folicular à medida que a desova prossegue (Fig. 3E).

Estado V – Pós-desova

Esta fase é caracterizada por uma acentuada proliferação do tecido conjuntivo interfolicular e pela presença de numerosos hemócitos, que efectuam a lise *in situ* dos oócitos e espermatozóides residuais e de todo o material sexual não expelido. É ainda possível detetar nos exemplares femininos (Fig. 2F) e masculinos (Fig. 3F) alguns oócitos e espermatozóides no interior folicular, a maioria com sinais evidentes de degenerescência.

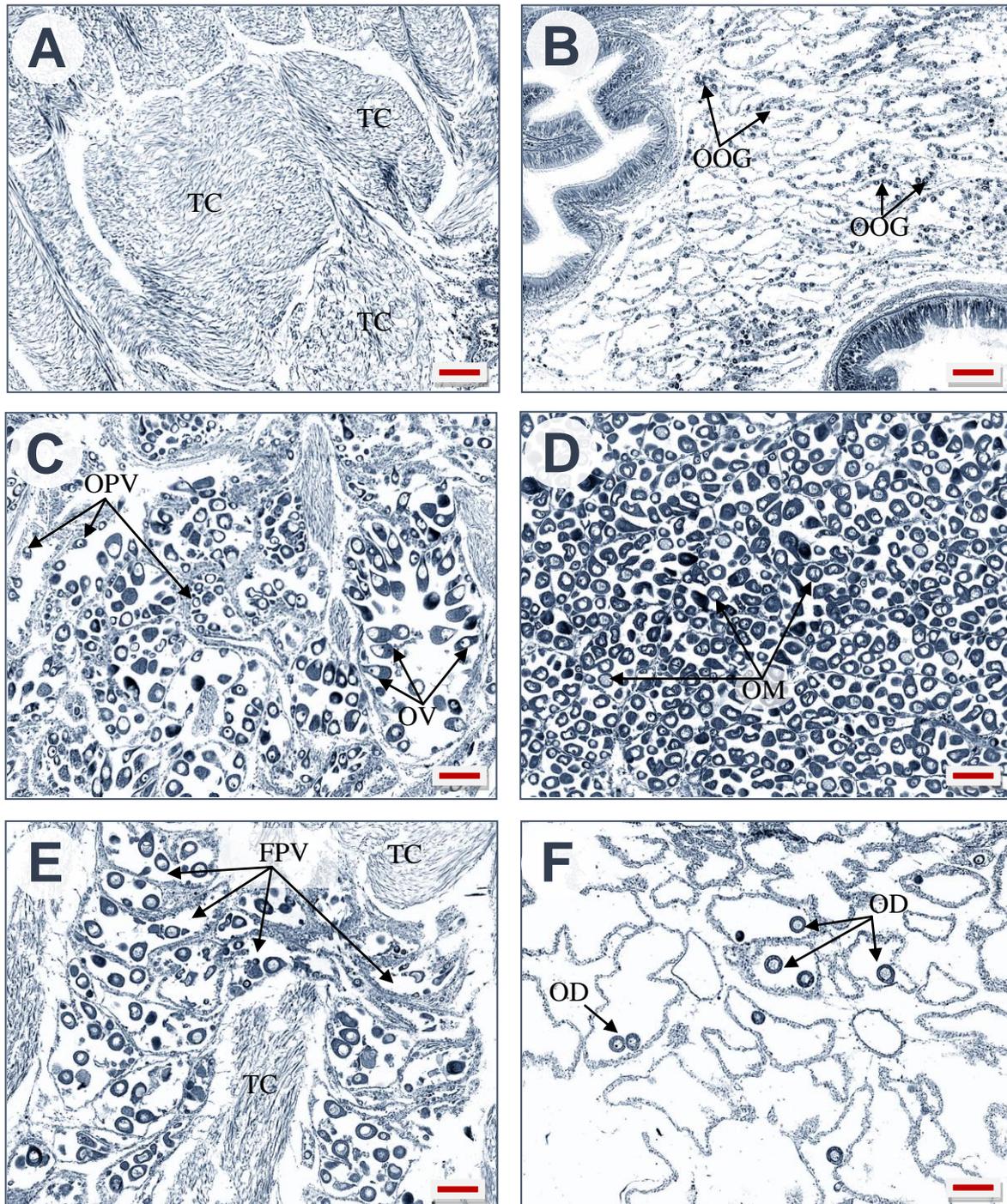


Figura 2. Microfotografias de secções de gónada de amêijoia-japonesa (fêmeas): (A) estado 0, repouso sexual; (B) estado I, gametogénese inicial; (C) estado II, gametogénese avançada; (D) estado III, maturação; (E) estado IV, desova; (F) estado V, pós-desova. TC, tecido conjuntivo; OOG, oogónias; OPV, oócitos pré-vitelogénicos; OV, oócitos vitelogénicos; OM, oócitos maduros; FPV, folículos parcialmente vazios; OD, oócitos em degenerescência. Barras de escala: 100 µm. Coloração: azul de toluidina. Fonte: elaborado pelo autor.

Figure 2. Microphotographs of histological sections of gonadal tissue of Manila clam (females). (A) stage 0, sexual resting; (B) stage I, early gametogenesis; (C) stage II, advanced gametogenesis; (D) stage III, maturity; (E) stage IV, spawning; (F) stage V, post-spawning. TC, connective tissue; OOG, oogonia; OPV, previtellogenic oocytes; OV, vitellogenic oocytes; OM, mature oocytes; FPV, partially empty follicles; OD, degenerative oocytes. Scale bars: 100 µm. Stain: toluidine blue. Source: elaborated by the author.

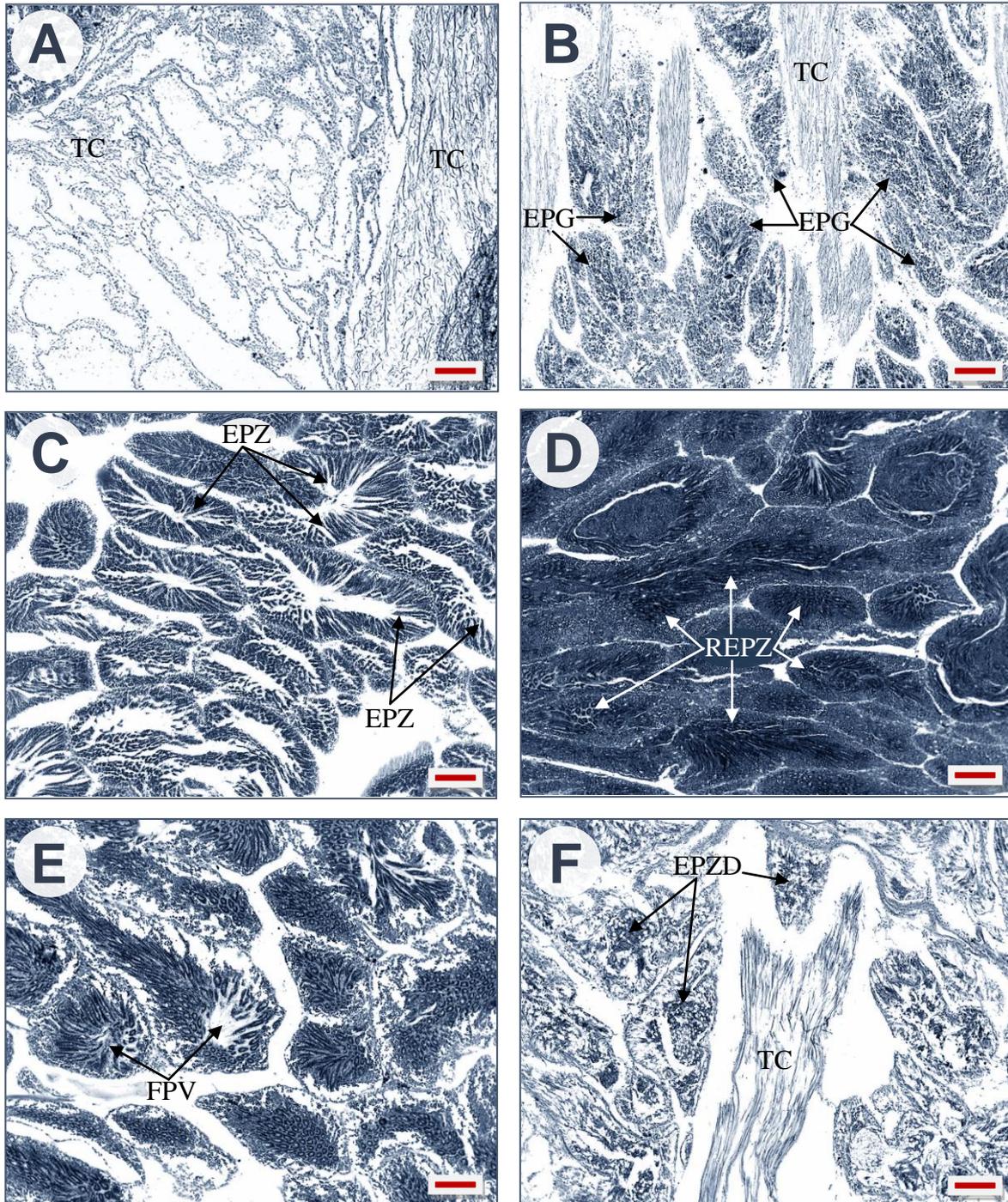


Figura 3. Microfotografias de secções de gónada de amêijoia-japonesa (machos): (A) estado 0, repouso sexual; (B) estado I, gametogénese inicial; (C) estado II, gametogénese avançada; (D) estado III, maturação; (E) estado IV, desova; (F) estado V, pós-desova. TC, tecido conjuntivo; EPG, espermatogónias; EPZ, espermatozóides; REPZ, rosetas de espermatozóides; FPV, folículos parcialmente vazios; EPZD, espermatozóides em degenerescência. Barras de escala: 100 µm. Coloração: azul de toluidina. Fonte: elaborado pelo autor.

Figure 3. Microphotographs of histological sections of gonadal tissue of Manila clam (males). (A) stage 0, sexual resting; (B) stage I, early gametogenesis; (C) stage II, advanced gametogenesis; (D) stage III, maturity; (E) stage IV, spawning; (F) stage V, post-spawning. TC, connective tissue; EPG, spermatogonia; EPZ, spermatozoa; REPZ, spermatozoa rosettes; FPV, partially empty follicles; EPZD, degenerative spermatozoa. Scale bars: 100 µm. Stain: toluidine blue. Source: elaborated by the author.

Índice de Condição

Os índices de condição são frequentemente utilizados como indicadores de avaliação do bem-estar animal, uma vez que refletem mudanças fisiológicas (decorrentes de doenças, estado nutricional, reprodução, crescimento, stress, condições ambientais, etc.) de um determinado indivíduo ao longo de um período específico de tempo (Christo, 2006; Sahin, 2006). O padrão de evolução do índice de condição pode ser utilizado para definir estratégias de exploração de moluscos bivalves com interesse comercial. De facto, o período de apanha e comercialização das espécies-alvo deve coincidir com a época do ano em que estas exibem as melhores condições fisiológicas, usualmente associadas a um maior peso dos animais e a menores taxas de mortalidade pós-colheita, potenciando assim o lucro dos pescadores.

Neste trabalho foi utilizado o índice de condição (IC) proposto por Walne (1976):

$$IC = (P_{\text{seco dos tecidos}} / P_{\text{seco da concha}}) \times 100$$

O peso seco dos tecidos e o peso seco da concha de cada exemplar foi determinado após secagem em estufa à temperatura de 80°C, por um período de 24 horas (Christo, 2006). Estes parâmetros foram calculados uma vez por mês a partir da média de um grupo aleatório de 10 animais com comprimento de concha padrão (40 mm ± 1 mm), de forma a refletir o ganho e perda de peso dos animais durante a reprodução, suprimindo assim a influência do crescimento na interpretação dos resultados.

Tamanho de primeira maturação

Para a determinação do tamanho de primeira maturação foram observados microscopicamente cerca de 300 exemplares com comprimentos de concha que variaram entre os 13 e os 55 mm. As amostras foram recolhidas no período de reprodução da espécie, durante os meses de Junho a Agosto de 2013.

O tamanho de primeira maturação pode ser definido como o comprimento a partir do qual 50% dos indivíduos estão sexualmente maduros. Foram classificados como sexualmente maduros todos os exemplares que, através de exame microscópico das gónadas, se encontravam nos estados de maturação III (Maturação), IV (Postura) e V (Pós-postura). Os dados foram posteriormente ajustados à seguinte curva logística:

$$P = 1/1 + \exp^{-r(L-L_{50})}$$

onde, (P) é a proporção de exemplares maduros em cada classe de comprimento (L); r é o declive da curva e (L₅₀) é o comprimento da primeira maturação (King, 1995).

RESULTADOS. DISCUSSÃO

Ciclo Reprodutivo

Na figura 4 apresenta-se a evolução anual do ciclo reprodutivo observada em exemplares femininos e masculinos de amêijoja-japonesa. Esta espécie apresenta um desenvolvimento sexual bem definido ao longo do ano, ocorrendo sincronia dos diferentes estados de maturação entre ambos os sexos. Por essa razão, será realizada uma análise conjunta do seu ciclo reprodutivo (Fig. 5).

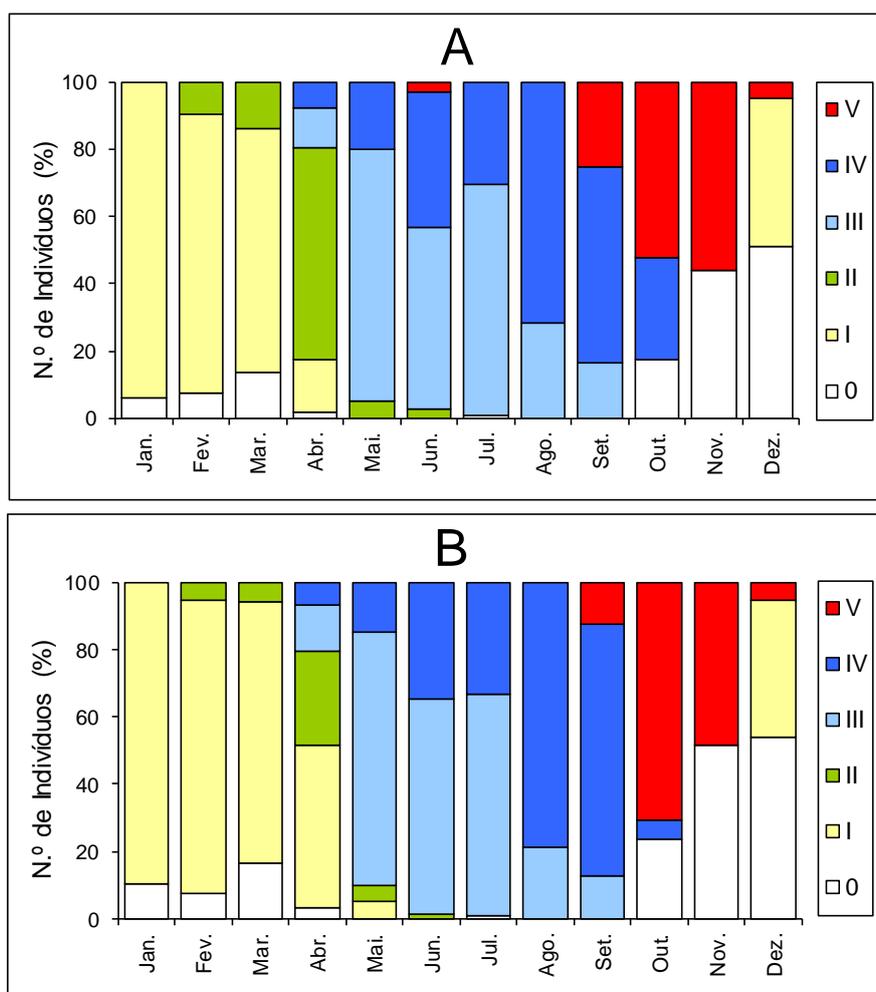


Figura 4. Amêijoja-japonesa. Variação mensal da percentagem de exemplares femininos (A) e masculinos (B) em cada estado do ciclo reprodutor.

Figure 4. Manila clam. Monthly variation in the percentage of female (A) and male (B) specimens in each stage of gonadal development.

Pela análise da figura 5 verifica-se que a gametogénese (estados de maturação sexual I e II) decorreu durante todo o Inverno e o início da Primavera, tendo sido observados indivíduos nos primeiros estados (da gametogénese) desde Janeiro até Abril. No final desse período (Abril) alguns exemplares (12,5%) alcançaram o estado máximo de maturação sexual (estado III) e uma pequena percentagem (7,5%) iniciou a desova (estado IV). A desova prolongou-se pelos meses subsequentes até Outubro, tendo, no entanto, apresentado maior intensidade nos meses de Verão, nomeadamente em Agosto (75%) e em Setembro (65%). Durante o Outono (Outubro e Novembro) a maioria dos indivíduos observados encontrava-se nas fases de pós-postura (estado V) e de repouso sexual (estado 0). Em Dezembro observou-se o início de um novo ciclo reprodutivo, apresentando-se grande parte da população (42,5%) no estado de gametogénese inicial (estado I).

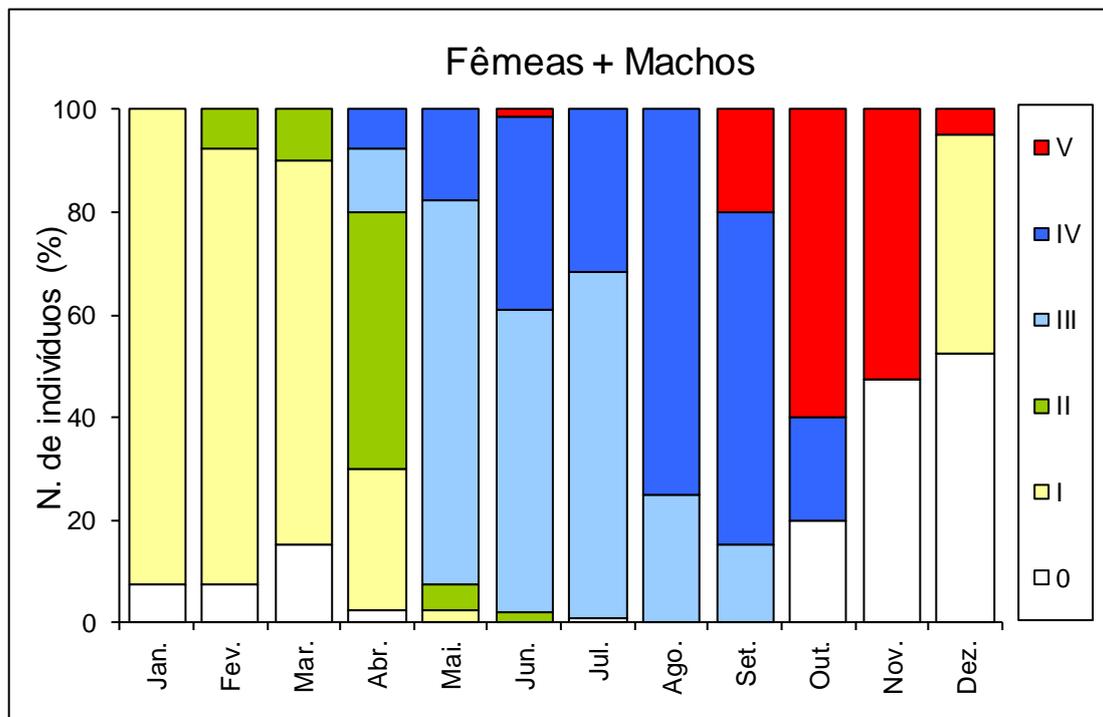


Figura 5. Amêijoia-japonesa. Variação mensal da percentagem de animais (fêmeas + machos) em cada estado do ciclo reprodutor.

Figure 5. Manila clam. Monthly variation in the percentage of specimens (females + males) in each stage of gonadal development.

Para determinar uma possível influência dos parâmetros físico-químicos no desenvolvimento do ciclo reprodutivo da amêijoia-japonesa, registaram-se durante o período de estudo e com periodicidade semanal os valores de salinidade e temperatura da água (maré cheia) (Fig. 6). Estes valores foram obtidos com uma sonda multiparâmetro WTW modelo LF197.

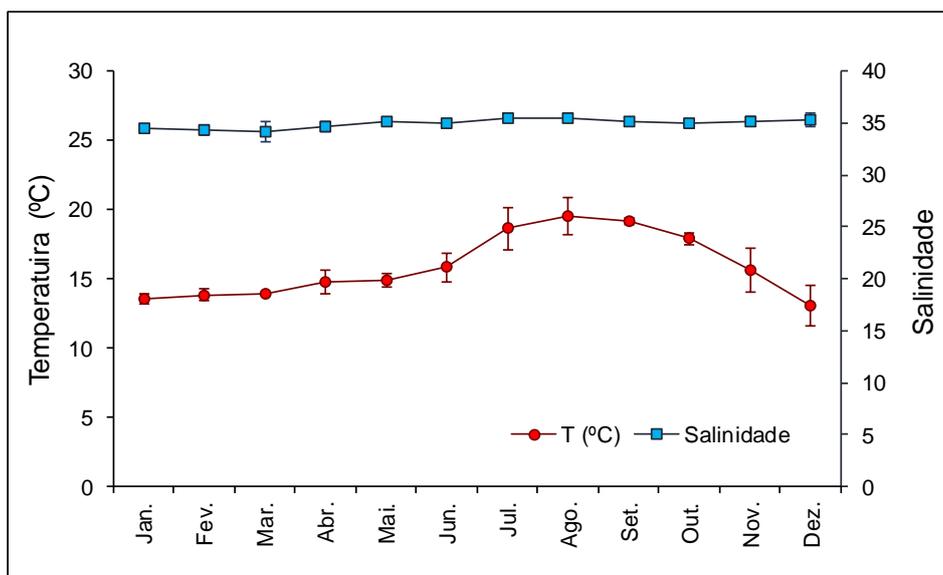


Figura 6. Valores médios (\pm desvio padrão) da temperatura e salinidade da água.

Figure 6. Average values (\pm standard deviation) of water temperature and salinity.

Verifica-se que a salinidade não variou significativamente ao longo do período de estudo, apresentando uma gama de valores compreendida entre os 34,2 e 35,5 (Fig. 6). A evolução do ciclo reprodutivo da amêijoia-japonesa parece estar relacionada com a flutuação sazonal da temperatura da água na Ria de Aveiro. De facto, verifica-se que a gametogénese (estados I e II) e a maturação sexual (estado III) são desencadeadas por um aumento progressivo da temperatura desde o início do Inverno (Dezembro/Janeiro \sim 13/14°C) até ao fim da Primavera (Maio/Junho \sim 15/16°C). O pico de desova (estado IV) ocorre no período mais quente do ano, nomeadamente em Agosto e Setembro, altura em que se registaram as temperaturas mais elevadas de cerca de 20 e 19°C, respectivamente. Sucede-se um período caracterizado pela predominância dos estados de pós-desova (estado V) e repouso sexual (estado 0), e que coincide com a queda gradual das temperaturas da água durante o Outono (Fig. 6).

Na figura 7 apresentam-se as épocas de desova da amêijoia-japonesa em vários países europeus, incluindo Portugal. Observam-se longos períodos de desova para a generalidade das populações estudadas (entre 5 a 8 meses) o que demonstra uma boa adaptação da espécie a habitats fora da sua área de distribuição natural e capacidade para estabelecer e manter populações viáveis nesses locais. Apesar de se notarem ligeiras diferenças no início e no final das épocas de postura, verifica-se que na maioria das áreas colonizadas a desova ocorre sobretudo durante os meses de Verão. Estas diferenças poder-se-ão justificar devido à relação entre o ciclo reprodutivo dos bivalves e algumas variáveis ambientais, nomeadamente a

temperatura e a disponibilidade alimentar (Darriba et al., 2004; Rodriguez-Rúa et al., 2003; Ojea et al., 2004).

Na Ria de Aveiro, a época de desova da amêijoja-japonesa prolongou-se por 7 meses (de Abril a Outubro), com um pico máximo registado em Agosto e Setembro. Moura et al. (2018) verificaram que a espécie apresenta uma estratégia reprodutiva semelhante no estuário do Tejo, diferindo apenas nas datas de início e de término da época de desova, que avançaram cerca de 1 mês (Maio a Novembro/Dezembro, respectivamente), e também no período de maior intensidade da desova, que ocorreu de Junho a Agosto. Segundo estes autores, as variações observadas no período de reprodução entre as duas populações estudadas podem ser justificadas devido a diferentes padrões na flutuação sazonal da temperatura da água na Ria de Aveiro e no estuário do Tejo, nomeadamente ao atraso na subida da temperatura da água e a valores mais elevados atingidos no estuário do Tejo (máximo = 23°C), do que os observados na Ria de Aveiro (máximo = 20°C, presente estudo, Matias et al., 2013).



Figura 7. Época de desova da amêijoja-japonesa em vários países Europeus. Período de desova (azul claro); pico da desova (azul escuro); 1 - Irlanda (Drummond et al., 2006); 2 - Itália (Meneghetti et al., 2004); 3 - Itália (Sbrenna & Campioni, 1994); 4 - França (Maitre-Allain, 1985); 5 - Espanha (Ojea et al., 2005); 6 - Espanha (Rodriguez-Moscozo et al., 1992); 7 - Portugal (presente estudo); 8 - Portugal (Moura et al., 2018).

Figure 7. Manila clam spawning season in several European countries. Spawning season (light blue); spawnings peak (dark blue); 1 - Ireland (Drummond et al., 2006); 2 - Italy (Meneghetti et al., 2004); 3 - Italy (Sbrenna & Campioni, 1994); 4 - France (Maitre-Allain, 1985); 5 - Spain (Ojea et al., 2005); 6 - Spain (Rodriguez-Moscozo et al., 1992); 7 - Portugal (present study); 8 - Portugal (Moura et al., 2018).

Índice de Condição

A figura 8 apresenta a variação do índice de condição (IC) da amêijoja-japonesa durante o período de estudo. Verificou-se que as oscilações sazonais do IC estão intimamente relacionadas com evolução do ciclo reprodutivo da espécie. De facto, o IC manteve-se

relativamente estável entre Janeiro e Março, período do ano em que a maioria dos exemplares observados se encontrava no estado inicial de gametogénese (estado I). A partir de Abril e até Julho observou-se um aumento progressivo do IC, acompanhando de perto o processo de desenvolvimento e maturação das gónadas (estados II e III). O valor mais elevado do IC foi obtido em Julho, numa altura em que a maioria dos indivíduos se encontrava no estado máximo de maturação sexual (estado III). Em Agosto, quando ocorreu o maior pico de desova (75% da população no estado IV), observou-se uma diminuição acentuada do IC, provavelmente devido à perda de peso dos animais com a libertação de gâmetas e declínio progressivo das reservas energéticas como consequência do esforço reprodutivo. O IC sofreu uma ligeira subida em Setembro, voltando a diminuir nos 2 meses subsequentes até Novembro, quando a maioria da população se encontrava nas fases de pós-postura (estado V) e repouso sexual (estado 0). Em Dezembro, observou-se novamente um aumento do IC que coincidiu com o início de um novo ciclo reprodutivo (42,5% da população no estado I).

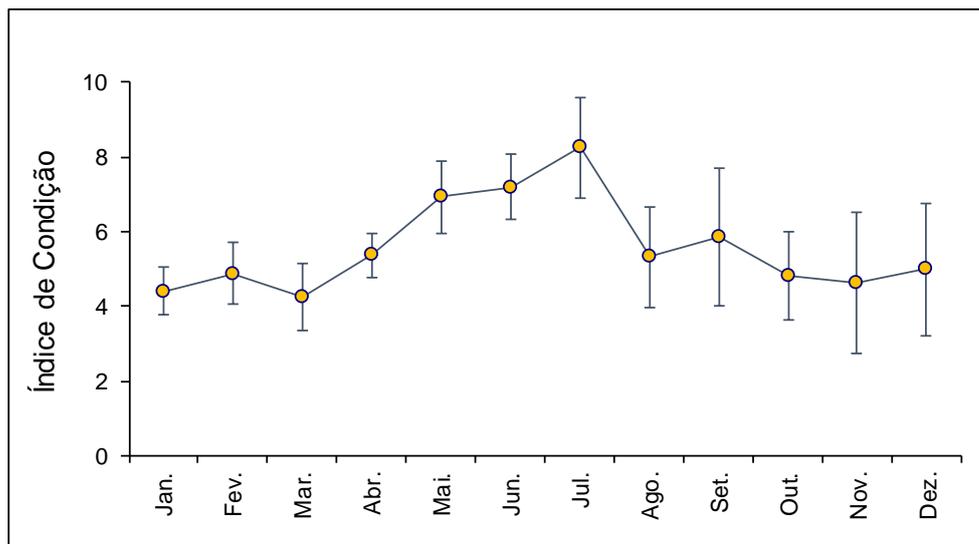


Figura 8. Variação sazonal do índice de condição (Média \pm desvio padrão) da amêijoia-japonesa na Ria de Aveiro.

Figure 8. Seasonal variation in the condition index (mean \pm standard deviation) of the Manila clam in Ria de Aveiro.

Tamanho da primeira maturação

Tal como se referiu anteriormente, o tamanho de primeira maturação (L_{50}) é definido como o comprimento a partir do qual 50% dos indivíduos de uma determinada espécie atinge a maturação sexual. Neste trabalho consideraram-se como sexualmente maduros todos os exemplares que iriam desovar durante a época de reprodução (estado III), os que se encontravam na fase activa de desova (estado IV), bem como todos aqueles que já tinham

desovado (estado V). Importa referir que o L_{50} da amêijoa-japonesa, bem como da esmagadora maioria das espécies bivalves, pode variar entre populações de diferentes áreas geográficas de acordo com os fatores ambientais específicos de cada habitat que influenciam o ciclo reprodutivo e o crescimento da espécie (Clarke, 1987; Santos et al., 2011; Moura et al, 2013; Kandeel, 2017).

Na figura 9A e 9B apresentam-se as ogivas de maturação da amêijoa-japonesa determinadas para os exemplares femininos e masculinos, respetivamente. Verificou-se que ambos os géneros atingem a maturação sexual com um comprimento de concha de 20,2 mm. O tamanho da primeira maturação estimado para a totalidade dos indivíduos observados (géneros agrupados) foi de 20,0 mm de comprimento (Fig. 10).

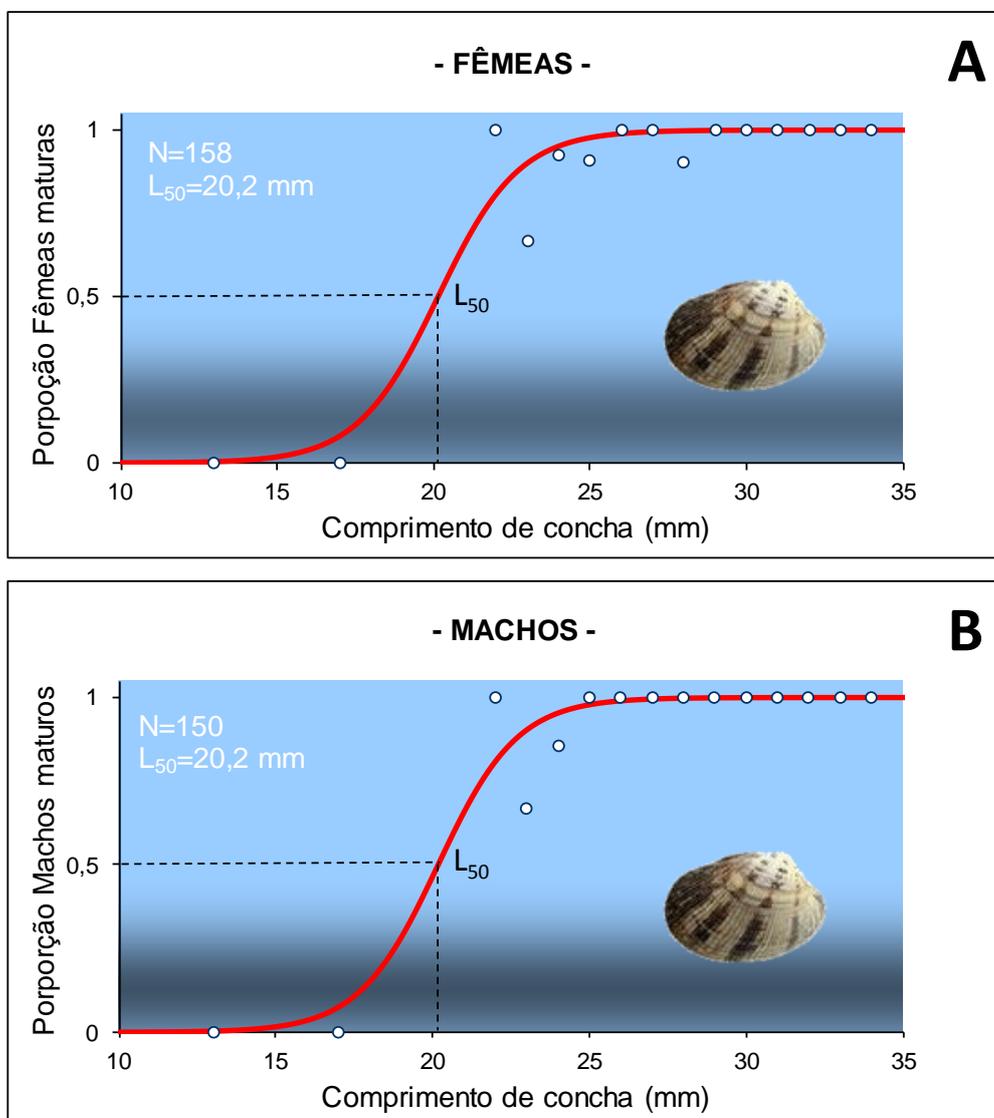


Figura 9. Ogivas de primeira maturação determinadas para as fêmeas (A) e para os machos (B) de amêijoa-japonesa.

Figure 9. First maturity ogives for females (A) and males (B) of Manila clam.

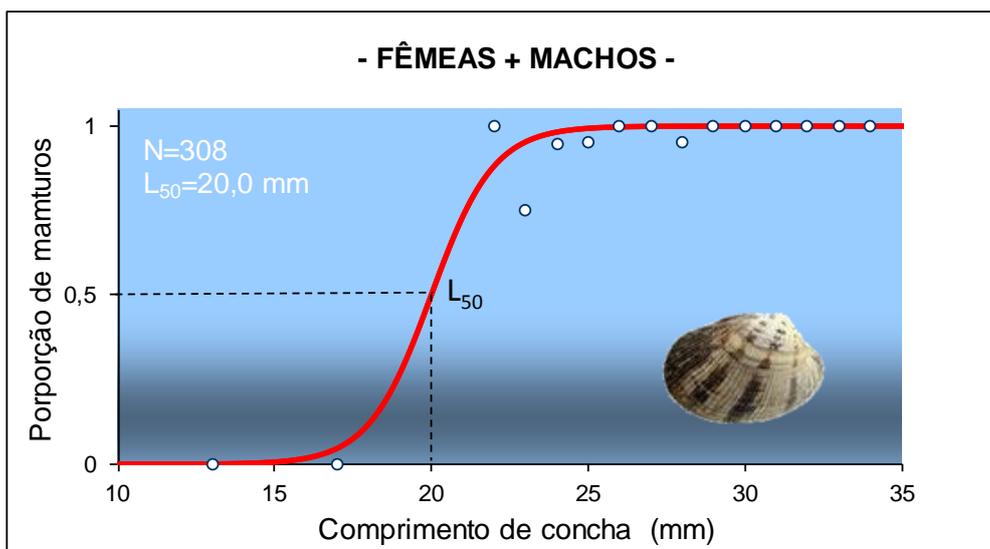


Figura 10. Ogiva de primeira maturação da amêijoia-japonesa (géneros agrupados).
Figure 10. First maturity ogive of Manila clam (both sexes grouped).

Os resultados do presente estudo enquadram-se no intervalo de valores de L_{50} referido em investigações anteriores. Na área de distribuição nativa da amêijoia-japonesa, nomeadamente na costa oeste da Coreia, os machos desta espécie atingem o L_{50} com um comprimento de concha de 17,16 mm (Chung et al., 2013) e as fêmeas com 17,83 mm (Choi et al., 2005). Embora não tenha sido estimado o tamanho da primeira maturação, Ponurovsky e Yakovlev (1992) referem que na Baía de Vostok (Mar do Japão), esta espécie atinge a maturação sexual entre os 20 e 30 mm de comprimento. Estes autores referem ainda a presença de exemplares maduros de menores dimensões, com comprimentos de concha de 7,5 mm (fêmeas) e de 8,0 mm (machos). No Lago Akkeshi, localizado na costa ocidental norte da Ilha Hokkaido (Japão), Yamamoto e Iwata (1956) mencionam que as fêmeas atingem a maturação sexual com cerca de 30 a 35 mm de comprimento e os machos entre os 22 e os 27 mm de comprimento. Chung et al. (2001), num estudo realizado na Baía de Komso (Coreia), verificaram que 56,3% das fêmeas e 60,0% dos machos atingiam a primeira maturação com cerca de 15,1 a 20,0 mm de comprimento, e que toda a população estaria madura a partir dos 25,1 mm de comprimento.

Fora da sua área de distribuição geográfica natural, nomeadamente em território Europeu, existem poucos estudos sobre o tamanho da primeira maturação da amêijoia-japonesa. Em França, Devauchelle (1990) indica que a maturação sexual ocorre no 1º ano de vida dos animais, quando estes atingem cerca de 15 a 20 mm de comprimento.

O tamanho da primeira maturação da amêijoia-japonesa foi ainda determinado no estuário do Tejo, onde a espécie apresentou um L_{50} de 29,4 mm com cerca de 1 ano de idade (Moura et al., 2018). A diferença observada no L_{50} entre as populações de amêijoia-japonesa da Ria de Aveiro (20 mm) e do estuário do Tejo (29,4 mm) pode estar relacionada com condições ambientais específicas de cada região que influenciam o processo de maturação sexual, nomeadamente a disponibilidade alimentar.

De facto, na Ria de Aveiro observa-se um padrão de sucessivos eventos de florescimento fitoplanctónico, que começam no fim do Outono e se prolongam até ao fim do Verão. As diatomáceas constituem a classe de microalgas planctónicas dominantes durante o final do Outono e o início da Primavera, e as clorófitas são responsáveis pelo pico de florescimento observado no fim da Primavera e no Verão (Lopes et al., 2006). Por outro lado, o estuário do Tejo é caracterizado por apresentar apenas um único evento anual de florescimento fitoplanctónico (diatomáceas), que ocorre no final da Primavera ou no Verão (Gameiro, 2009).

Assim, o menor valor de L_{50} da amêijoia-japonesa na Ria de Aveiro pode ser explicado por uma maior disponibilidade alimentar desde o fim do Outono até ao início da Primavera, o que permite que a espécie reúna mais cedo as condições fisiológicas necessárias para a maturação sexual, nomeadamente a acumulação de reservas de energia suficientes para suportar os elevados gastos energéticos deste processo.

Medidas de regulamentação e gestão da pescaria

A amêijoia-japonesa *Ruditapes philippinarum* conseguiu estabelecer-se com sucesso na Ria de Aveiro e representa actualmente uma das maiores fontes de rendimento para os mariscadores locais, apenas superada pela pescaria de outro molusco bivalve, o berbigão (*Cerastoderma edule*).

Quando se comparam alguns aspectos biológicos desta espécie invasora, nomeadamente o seu crescimento, período de desova e tamanho de primeira maturação na Ria de Aveiro, com os da espécie autóctone *Ruditapes decussatus* (amêijoia-boia), verifica-se que a amêijoia-japonesa possui uma clara vantagem competitiva sobre a sua congénere nativa (Tab. 1).

De facto, a amêijoia-japonesa apresenta uma taxa de crescimento superior ($0,82 \text{ ano}^{-1}$ vs. $0,47 \text{ ano}^{-1}$), um período de desova mais longo (7 meses vs. 6 meses) e atinge a maturação sexual com um comprimento de concha inferior ao registado na amêijoia-boia (20,0 cm vs. 21,4 cm).

A maturidade precoce (que ocorre durante o primeiro ano de vida, tal como acontece com a amêijoia-boia) permite a sua rápida inserção no stock de reprodutores e uma participação ativa na desova logo na primeira época de reprodução após o assentamento larval. Estas vantagens adaptativas podem ajudar a explicar a sua dominância e o depauperamento progressivo dos mananciais de amêijoia-boia na Ria de Aveiro.

Tabela 1. Comparação do crescimento, período de desova e tamanho da 1ª maturação da amêijoia-japonesa (*R. philippinarum*) e da amêijoia-boia (*R. decussatus*) na Ria de Aveiro. L_{∞} (mm); k (ano⁻¹); L_{50} (mm).

Table 1. Comparison of growth, spawning period and size at 1st maturity of the Manila clam (*R. philippinarum*) and the grooved carpet shell clam (*R. decussatus*) in the Ria de Aveiro. L_{∞} (mm); k (year⁻¹); L_{50} (mm).

| Espécie | Crescimento (Bertalanffy) | | | Período Desova | L_{50} | Valor Comercial | Referências |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|--|
| | L_{∞} | K | T_0 | | | | |
| <i>Ruditapes philippinarum</i> | 58,43 ¹ | 0,82 ¹ | 0,55 ¹ | 7 meses ² | 20,0 ² | ~2 €/kg ³ | ¹ Maia, não publicado; ² Presente estudo; ³ Docapesca (2018). |
| <i>Ruditapes decussatus</i> | 60,08 ⁴ | 0,47 ⁴ | 0,33 ⁴ | 6 meses ⁵ | 21.4 ⁵ | ~10 €/kg ³ | ⁴ Maia et al., 2015a; ⁵ Maia et al., 2015b; ³ Docapesca (2018). |

A partir do momento em que uma espécie invasora se estabelece num determinado território, a erradicação torna-se praticamente impossível. Contudo, a exploração comercial intensiva da amêijoia-japonesa permitida ao abrigo da legislação em vigor (não estão definidos limites de captura) pode ajudar a controlar a sua abundância e expansão na Ria de Aveiro proporcionando, simultaneamente, um rendimento suplementar aos mariscadores e a preservação das populações de moluscos bivalves autóctones de maior valor económico.

No entanto, e tal como referido anteriormente, a amêijoia-japonesa assume atualmente um papel preponderante no rendimento económico de vários agregados familiares ligados à atividade de marisqueio, pelo que se deve equacionar a gestão desta pescaria de uma forma “tradicional”, ou seja, aplicando medidas de regulamentação do exercício da pesca adequadas à exploração sustentável do recurso (limites máximos de captura, épocas/zonas de defeso, tamanho mínimo de captura, etc.).

Nesse caso, deveria ser definida uma época de defeso durante o período de maior intensidade de desova da amêijoia-japonesa (Agosto-Setembro). Tendo em consideração que na Ria de Aveiro se pratica uma pescaria multiespecífica, com sobreposição espacial de áreas de pesca,

a época de defeso da amêijoa-japonesa deverá coincidir com o período de desova das restantes espécies comerciais de moluscos bivalves, estabelecendo-se assim uma época de defeso comum.

Verificou-se neste estudo que a amêijoa-japonesa atinge a primeira maturação sexual (L_{50}) com um comprimento de concha de 20 mm, um valor inferior ao tamanho mínimo de captura actualmente em vigor na Ria de Aveiro (TMC = 40 mm). A manutenção desta medida legislativa (TMC) protege eficazmente a fração juvenil da população e garante uma boa reprodução dos stocks se os efetivos populacionais forem assegurados. Por essa razão, deveriam também ser estabelecidos limites máximos diários de captura para a amêijoa-japonesa (por pescador apeado e por embarcação), à semelhança do que acontece com as outras espécies comerciais de bivalves da Ria de Aveiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar os seus sinceros agradecimentos aos técnicos do IPMA-Aveiro, Danny Bettencourt, Vera Sobral, Laurinda Paiva e Victor Bettencourt pela forma competente e empenhada como desempenharam as suas funções.

Gostariam ainda de sublinhar o papel fundamental das Organizações de Produtores APARA e VIANAPESCA, em particular aos seus presidentes Francisco Portela Rosa e Adelino Vieira, respectivamente.

Um agradecimento especial à D. Isabel Resende do Centro de Depuração e Expedição de Moluscos Bivalves “Francisco Resende” e à D. Sandra Sousa da “Aguarelatropical Aquicultura de Ostras Lda.”, por todo o apoio na obtenção de amostras de amêijoa-japonesa.

Grande parte deste trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projecto GEPETO. Caso de Estudo: Apanha de bivalves na Ria de Aveiro. Biologia e gestão da pesca de moluscos bivalves na Ria de Aveiro.

REFERÊNCIAS

- Byrnes, J. E., Reynolds, P. L. & Stachowicz, J. J., 2007. Invasions and extinctions reshape coastal marine food webs. *PLoS ONE* 3, e295.
- Gameiro, A.L.P., 2009. Fitoplâncton do Estuário do Tejo (Portugal): Dinâmica sazonal, interanual e produção primária. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Biologia - Especialidade Ecologia. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal. 179pp.
- Choi, K.H., Park, G.M. and Chung, E.Y., 2005. Ovarian maturation in female *Ruditapes philippinarum* on the west coast of Korea. *Development and Reproduction*, 9, 123–134.
- Christo, S. W., 2006. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do género *Crassostrea sacco*, 1987 na Baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): um subsídio ao cultivo. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Sector de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
- Chung, E.Y., Hur, S.B., Hur, Y.-B. and Lee, J.S., 2001. Gonad maturation and artificial spawning of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) in Komso Bay, Korea. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 4, 208–218.
- Chung, E.Y., Chung, J.S. and Lee, K.Y., 2013. Gametogenic cycle, the spawning season, first sexual maturity, and the biological minimum size in male *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae) in Western Korea. *Journal of Life Sciences*, 7, 613–622.
- Cohen, A.N., Carlton, J. T., 1995. Introduction, dispersal and potential impacts of the green crab *Carcinus maenas* in San Francisco Bay, California. *Marine Biology*, 122: 225-237.
- Clarke, A., 1987. Temperature, latitude and reproductive effort. *Marine Ecology Progress Series*, 38, 89–99.
- Crowl, T., Crist, T., Parmenter, R., Belovssky, G., Lugos, A., 2008. The spread of invasive species and infectious disease as drivers of ecosystem change. *Frontiers in Ecology and Environment*, 6, 238-246.
- Czech, B., and Krausman, P. R., 1997. Distribution and causation of species endangerment in the United States. *Science*, 277, 1116-1117.

- Daniel Pires, 2018. Produção de Moluscos Bivalves e Fatores de Risco Associados. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agronómica - Produção Animal - Instituto Superior de Agronomia / Faculdade de Medicina Veterinária. 69 p (<http://hdl.handle.net/10400.5/17883>).
- Darriba, S., San Juan, F., Guerra, A., 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311, 101-115.
- Delgado, M. and Pérez-Camacho, A., 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adam and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): Influence of temperature. *Scientia Marina* 71, 471–484.
- Devauchelle, N., 1990. Sviluppo sessuale e maturità di *Tapes philippinarum* = Sexual development and maturity of *Tapes philippinarum*, in: Agostini, D. et al. (Ed.) *Tapes philippinarum: biologia e sperimentazione*. pp. 47-62.
- Drummond, L., Mulcahy, M. and Culloty, S., 2006. The reproductive biology of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the north-west of Ireland. *Aquaculture* 254, 326–340.
- GASPAR, M.J.B., 1996. Bivalves do litoral oceânico algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pescaria dos mananciais de interesse económico: Aplicação à gestão dos recursos. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Universidade do Algarve, Faro, 282 pp.
- Gouletquer, P., 2015. *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850). In: FAO, 2005-2015. Cultured Aquatic Species Information Programme. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome. (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ruditapes_philippinarum/en)
- King, M., 1995. Fisheries Biology, Assessment and Management. Fishing News Books (Eds.) Oxford, 341 pp.
- Kandeel, K.E., 2017. Size at the onset of sexual maturity in 7 bivalve species in Egyptian waters. *Thalassia Salentina* 39, 123-136.
- Levings, C. D., Kieser, D., Jamieson, G. S., Dudas, S., 2002. Marine and estuarine alien species in the Strait of Georgia, British Columbia. In: Claudi, R., Nantel, P., Muckle-Jeffs, E. (Eds.), Alien invaders in Canada's waters, wetlands and forests. Natural Resources Canada, Forest Service, Ottawa, pp. 19-28.

- Lopes, C.B., Lillebo, A.I., Dias, J.M., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A.C., 2007. Nutrient dynamics and seasonal succession of phytoplankton assemblages in a Southern European Estuary: Ria de Aveiro, Portugal. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 71, 480–490.
- Maia, F., Sobral, M.P., Gaspar, M., 2006. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Bases científicas para a gestão destes recursos. IPIMAR - Relatórios Científicos e Técnicos - Série digital, n.º 30, 35p. (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>).
- Maia, F., Barroso, C., Gaspar, M., 2015a. Age, growth and morphometric relationships of the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in Ria de Aveiro lagoon (NW Portugal). (<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35793.07525>).
- Maia, F., Barroso, C., Gaspar, M., 2015b. Reproductive cycle, condition index and size at first maturity of the grooved carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) in Ria de Aveiro lagoon (NW Portugal). (<https://doi.org/10.13140/rg.2.2.15660.41607>).
- Maitre-Allain Thierry, 1985. Données sur la reproduction de la palourde Japonaise *Ruditapes philippinarum* dans l'étang de Thau (Hérault, France). Rapport et Procès-verbaux des Réunions, CIESM, 29, 109-110.
- Meneghetti, F., Moschino, V. and Da Ros, L., 2004. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from Lagoon of Venice. *Aquaculture*, 240, 473–488.
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., et al., 2012. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Development and Comparative Immunology*, 36, 140-149.
- Moura, P., Vasconcelos, P., Gaspar, M.B. Age and growth in three populations of *Dosinia exoleta* (Bivalvia: Veneridae) from the Portuguese coast. *Helgoland Marine Research*, 67, 639–652.
- Moura, P., Vasconcelos, P., Pereira, F., Chainho, P., Costa, J., & Gaspar, M., 2018. Reproductive cycle of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): An intensively harvested invasive species in the Tagus Estuary (Portugal). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98, 1645-1657.

- Ojea, J., P , D., Novoa, S., Sánchez, J., Abad, M., 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle, *Aquaculture*, 238, 451-468.
- Ojea, J., Martínez, D., Novoa, S. and Cerviño-Otero, A., 2005. Ciclo gametogénico de una población de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) en la ría de Camariñas (noroeste de España) y relación con la composición bioquímica mayoritaria. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 21, 337–342.
- Ponurovsky, S.K. and Yakovlev, Y.M., 1992. The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Shellfish Research*, 11, 265–277.
- Rodríguez-MoscOSO, E., Pazo, J.P., García, A. and Fernández-Cortés, F., 1992. Reproductive cycle of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). *Scientia Marina*, 56, 61–67.
- Rodríguez-Rúa, A., Prado, M., Romero, Z., Bruzón, M., 2003. The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir Estuary (Cádiz, SW Spain). *Aquaculture*, 217, 157-166.
- Ruano, F., Sobral, D. V., 2000. Marine non-indigenous species – current situation in Portugal. In: Rodrigues, L., Reino, L., Godinho, L. O., Freitas, H., (eds), *Proceedings of the 1st Symposium on Nonindigenous Species: Introduction, Causes and Consequences*. Liga para a Protecção da Natureza, Lisboa, Portugal, pp 58–63.
- Sahin, C., Düzgünes, Okumus, I., 2006. Seasonal variations in condition index and gonadal development of the introduced blood cockle *Anadara inaequalis* (Bruguiere, 1789) in the Southeastern Black Sea Coast. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6, 155-163.
- Santos, S., Cardoso, J., Carvalho, C., Luttikhuisen, P., van der Veer HW., 2011. Seasonal variability in somatic and reproductive investment of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) along a latitudinal gradient. *Estuarine Coast Shelf Science*, 92, 19–26.
- Sbrenna, G. and Campioni, D., 1994. Gametogenic and spawning patterns of Manila clams *Tapes philippinarum* (Bivalvia: Veneroida) in two lagoons of the river Po delta, Italy. *Journal of Shellfish Research*, 13, 37–46.

- Solidoro, C., Pastres, R., Canu, D. M., Pellizzato, M., Rossi, R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine Ecology Progress Series*, 199: 137-148.
- Velez, C., Figueira, E., Soares, A., Freitas, R., 2016. Native and introduced clams biochemical responses to salinity and pH changes. *Science of the Total Environment*, Volumes 566–567, 260-268.
- Walne, P., 1976. Experiments on the culture in the sea of the butterfish *Venerupis decussata* L.. *Aquaculture*, 8, 371-381.
- Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Philips, A., Losos, E., 1998. Quantifying threats to imperilled species in the United States. *Bioscience*, 48, 607-615.
- Yamamoto, K., Iwata, F., 1956. Studies on the bivalve, *Venerupis japonica*, in Akkeshi Lake. II. Growth rate and biological minimum size. *Bulletin of the Hokkaido Regional Fisheries Research Laboratory*, 14, 57–62.

ANEXO

PROTOCOLO DE HISTOLOGIA

Colheita

Para o estudo histológico da gónada removeu-se de cada exemplar uma porção anterior da massa visceral com cerca de 3 a 5 mm de espessura. Esta porção foi colocada num frasco, devidamente rotulado, e fixada com líquido de San Felice.

Líquido de San Felice:

Solução aquosa de óxido de crómio a 1%.....16 partes
Formol a 4%..... 8 partes
Ácido acético glacial.....1 parte

Fixação

Um bom fixador deve preservar as características morfológicas das estruturas celulares que se pretendem examinar e conferir à peça uma determinada rigidez. A fixação actua na conservação das estruturas celulares interrompendo os processos de autólise e confere aos tecidos a rigidez necessária para que estes possam suportar as restantes etapas histológicas. As peças foram fixadas com líquido de San Felice durante 48 horas. Após um período de lavagem de cerca de três dias em água corrente, as peças foram conservadas em álcool a 70 % (v/v).

Desidratação

A desidratação elimina a água dos tecidos e prepara-os para a impregnação. A passagem pelos álcoois deve ser gradual para preservar as estruturas celulares. Nesta operação, a água foi extraída dos tecidos fazendo mergulhar sucessivamente as peças, durante uma hora, numa série ascendente de álcoois (90 %, 95 %, 100 % I e 100 % II).

Impregnação

Nesta etapa promove-se a penetração da parafina nos tecidos, tornando-os mais rígidos e preparando-os para o corte.

As peças desidratadas foram imersas em butanol durante três horas e de seguida foram colocadas numa mistura em partes iguais de butanol e parafina com ponto de fusão de 43°C. Durante uma hora, as peças permaneceram na estufa a uma temperatura de aproximadamente 47°C, o que permitiu a evaporação do butanol e a sua substituição gradual nos tecidos pela parafina.

A penetração prosseguiu na estufa durante a noite, com a introdução das peças em parafina com ponto de fusão de 43°C. No dia seguinte, as peças passaram para uma parafina com ponto de fusão de 47°C, permanecendo aí uma hora. Após este período, as peças foram mudadas para uma parafina com elevado ponto de fusão (54°C) onde voltaram a aguardar uma hora antes de se prepararem os blocos.

Inclusão

A inclusão das peças num bloco permite a execução das restantes etapas histológicas. Nesta operação as peças foram colocadas, segundo uma orientação predefinida, em moldes próprios para a formação de blocos. A inclusão fez-se em parafina com alto ponto de fusão (54-56°C), administrada por um dispensador de parafina (Electrothermal paraffin wax dispenser).

Enquanto a parafina ainda estava líquida foram introduzidas etiquetas em cada um dos moldes de modo a identificar os exemplares. Deixaram-se os moldes à temperatura ambiente e logo após a solidificação da parafina desenformaram-se os blocos. Estes, foram submetidos durante algum tempo, a uma temperatura de cerca de 5°C antes de serem seccionados.

Corte ou seccionamento

Os blocos, após refrigeração, foram cortados em secções de 5 a 6 µm de espessura. A execução dos cortes nos blocos fez-se com auxílio de um micrótomo manual (Reichert-Jung mod. 1130 / Biocut).

O corte seriado de finas secções do bloco forma uma fita vulgarmente conhecida por “ténia”. Durante o corte, as ténias foram mantidas esticadas com o auxílio de pincéis de cerdas finas. As ténias obtidas foram depois colocadas, suavemente, sobre uma placa de cartão.

Montagem, distensão e colagem dos cortes

As secções da ténia consideradas necessárias foram retiradas com o auxílio de um bisturi e depois foram montadas, com a face mais brilhante voltada para baixo, em lâminas de vidro sobre uma solução de água albuminada.

Para permitir a distensão dos cortes, as lâminas foram colocadas sobre uma placa de aquecimento (Electrothermal MH 6616) mantida a uma temperatura moderada. O excesso de água albuminada foi retirado com papel de filtro.

Preparação da solução de água albuminada:

Colocar uma clara de ovo num gobelé e agitar vigorosamente, de seguida filtrar o preparado e adicionar uma pequena pedra de timol. Dissolver 14 gotas do preparado em 50 ml de água destilada.

Secagem

Para garantir a completa adesão da peça à lâmina, retirou-se o excesso da solução colante (água albuminada) com papel de filtro. De seguida, colocaram-se as lâminas numa estufa a 40°C, durante 24 horas.

Desparafinação

A parafina foi retirada das peças através da imersão das lâminas em xilol durante cerca de 30 minutos. Durante esta operação foram usadas duas tinas de imersão e o xilol foi mudado regularmente.

Re-hidratação

Para permitir que os cortes possam ser corados, é necessário proceder à sua re-hidratação. A rehidratação é conseguida através da passagem das peças por banhos com concentrações decrescentes de álcoois. As lâminas foram mergulhadas durante 5 minutos em cada uma das tinas, contendo uma série descendente de álcoois (100 %, 95 % e 75 %) e no final foram imersas em água corrente durante cerca de 15 minutos.

Coloração

A coloração permite evidenciar as estruturas que se pretendem estudar. Neste trabalho usou-se como corante o Azul de Toluidina.

Preparação do Azul de Toluidina:

Diluir 1g de bórax em 100 ml de água destilada (agitar no vórtex). Adicionar posteriormente 1g de azul de toluidina e homogeneizar a solução.

Os cortes foram corados lâmina a lâmina, com a colocação de uma gota deste corante sobre cada corte. Após a aplicação do corante, as lâminas foram passadas imediatamente por água. O processo foi repetido quando se verificou uma fraca coloração. Enquanto se processava uma lâmina as outras ficavam imersas em água.

Desidratação

Nesta etapa as peças foram desidratadas através da sua passagem por uma série ascendente de álcoois (75 %, 95 % e 100 %). Esta passagem foi relativamente rápida, não demorando mais de um minuto em cada tina.

Clareamento ou diafanização

Este processo tem como objectivo tornar a peça mais transparente e possibilitar a mistura com o meio de montagem. Depois da passagem das lâminas pela série ascendente de álcoois, foram mergulhadas, sucessivamente, em duas tinas com xilol. Na primeira tina as lâminas foram enxaguadas e na segunda sofreram uma paragem durante cerca de 10 minutos.

Montagem

Nesta operação, as peças são colocadas num meio de montagem cujo índice de refração é semelhante ao do vidro. O meio de montagem utilizado foi o Entellan. Com o auxílio de uma vareta de vidro foi colocada uma gota de Entellan em cima do corte. Sobre o meio de montagem foi colocada, cuidadosamente, uma lamela. Para eliminar as bolhas de ar que, por

vezes, se formavam entre a lâmina e a lamela, exerceu-se uma ligeira pressão do centro para a periferia da lâmina.

Observação microscópica

Após a montagem das preparações, os cortes histológicos foram observados ao microscópio óptico (ZEISS Axioskop 2 plus), e classificados segundo os diferentes estados de maturação.

