



**Hugo Gabriel Maia da  
Silva Santos**

**Indução da muda no caranguejo *Carcinus maenas* L.  
sob acção hormonal e química**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Fernando Carvalho, Professor Auxiliar do Departamento de Imunofisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar - Universidade do Porto e co-orientação do Professor Doutor Henrique Queiroga, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **o júri**

presidente

**Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos**

Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutor José Luís de Jesus Baldaia**

Professor Associado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Laboratório de Fisiologia Geral, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia

**Doutor Henrique José de Barros Brito Queiroga**

Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## agradecimentos

Como seria de esperar, o planeamento, execução e escrita desta tese de mestrado teve a colaboração de várias pessoas a quem eu gostaria de, desde já, demonstrar o meu mais sentido e profundo agradecimento.

Para iniciar tenho que referir, naturalmente, a pessoa que estive ao meu lado durante todo este período. O prof. Fernando Carvalho foi, sem dúvida, o orientador que eu necessitava para levar avante este projecto. A sua perspicácia, astúcia, atenção e disponibilidade foram características essenciais para que eu tivesse a oportunidade de adquirir muitos e importantes ensinamentos. Sempre muito prático e voluntarioso, ajudou-me na execução das experiências – foi sempre como que uma “fonte” de conhecimento que me levou a muitas discussões e esclarecimentos importantes para que este trabalho fosse levado a bom porto.

Agradeço também ao prof. Henrique Queiroga o seu contributo extremamente relevante, sobretudo na parte de escrita e na análise estatística. O seu elevado sentido crítico foi muito importante para mim, uma vez que muitas das suas sugestões permitiram esclarecer muitas das minhas dúvidas.

Uma vez que todo o trabalho relacionado com esta tese é parte integrante de um projecto europeu (SOCRATE) desenvolvido por diversas empresas europeias e pelo Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, agradeço, de forma global, a todas as pessoas que estiveram envolvidas neste projecto e que, directa ou indirectamente, contribuíram para que estas experiências pudessem ser realizadas. Agradeço especialmente ao Dr. João Bela, que, juntamente com o prof. Fernando Carvalho, foi um dos responsáveis por este projecto. A sua colaboração foi extremamente positiva neste estudo, nomeadamente no planeamento e montagem das instalações experimentais e na execução das diversas experiências, principalmente pela sua capacidade de aliar o apurado sentido científico a um enorme sentido prático. Agradeço-lhe também a ajuda preciosa disponibilizada aquando da revisão da escrita da tese.

Os meus “muito obrigado” vão também para todo o “people” do Abel Salazar que me apoiou e incentivou nesta dura jornada da minha vida. O que dizer da Eng. Amélia! Uma pessoa excepcional, sempre pronta a ajudar no que quer que fosse preciso, sempre com uma leitura atenta e pormenorizada e, acima de tudo, uma pessoa que está sempre lá quando é necessário. Agradeço também à Cristina Abreu que, também ela, me ajudou e apoiou para que este trabalho fosse realizado com êxito; sem esquecer, o trabalho por ela desenvolvido no projecto SOCRATE. E, naturalmente, quando penso no Porto, não posso deixar de referir o apoio do Sr. Andrade (e as suas histórias africanas), da Beatriz, da Mónica Felício, da Mónica Cunha e da Andreia. A todos eles o meu muito obrigado por me “aturarem”.

As experiências efectuadas envolveram a utilização de um número elevado de caranguejos, os quais foram capturados sob as mais diversas condições meteorológicas, com a indispensável ajuda, ou melhor, mestria do “mestre” Raul. A completar a nossa equipa nestas “cruzadas” pela Ria de Aveiro contamos também com a ajuda preciosa do Sr. Victor. Não posso, claro, deixar de agradecer também à instituição – o IPIMAR de Aveiro – que disponibilizou material e recursos humanos para nos auxiliar na captura dos caranguejos. Sendo assim, endereço ao Dr. Sobral o meu muito obrigado pelo acolhimento e ajuda que me deram nesta importante tarefa.

As experiências decorreram nas instalações da MATERAQUA, Lda., empresa do Sr. Misca (Sr. Manuel Caçoilo), a quem eu agradeço o acolhimento. Queria também estender este meu reconhecimento aos dois Sr. Manuel e ao Sr. Bagão (trabalhadores da MATERAQUA) pela ajuda que me foram disponibilizando, quer aquando da montagem da estação experimental quer posteriormente na sua limpeza e na alimentação dos caranguejos.

Quero agradecer a alguns amigos que desde o início estiveram a meu lado e me apoiaram quando as coisas pareciam andar menos bem. Com muita pena minha não posso fazer referência a todos eles; assim sendo, agradeço ao meu grande amigo Abel, que sempre teve a paciência “pronta” para me ouvir, que de vez em quando me dizia aquela palavra de incentivo e, especialmente, que tinha sempre aquelas suas piadas (!!!) que colocam qualquer um bem disposto. Queria agradecer também às minhas amigas Susana, Tânia e Sarita. Queria deixar aqui bem expresso um agradecimento especial ao Bruno que sempre se mostrou disponível para me ajudar e, em especial, para me elucidar sobre os “tortuosos caminhos” da estatística.

Aos meus pais (Manuel e Maria Helena) e irmãs (Becas e Bechi) gostaria de agradecer todo o apoio que me deram, o qual foi muito importante para que este trabalho fosse terminado com êxito.

Finalmente, tenho que agradecer de forma emocionada e apaixonada à pessoa mais importante do Mundo – a minha Té. Como costume dizer-te: tu és a luz que ilumina o meu caminho e, como era previsível, este período da tese não foi excepção. Sabes bem que não há palavras para descrever tudo o que sinto por ti e que és tu que me dás força para eu seguir em frente. Mais uma vez pude contar com o teu apoio e compreensão, tendo estado a meu lado sem hesitações e sempre a “espicaçar-me” quando as coisas estavam a correr menos bem. Tenho que te pedir desculpa por te ter “abandonado” variadas vezes para me “entregar” aos artigos, aos quadros, aos gráficos, aos resultados, ao computador... Obrigado por tudo. Obrigado por me “deixares” gostar de ti. Obrigado por gostares de mim. Amo-te mais que tudo na vida.



## resumo

O caranguejo *Callinectes sapidus* (caranguejo azul) tem sido utilizado, nos últimos anos, com enorme sucesso, na produção de caranguejos moles. Nos Estados Unidos da América esta indústria tem apresentado uma enorme expansão, tendo este produto sido considerado uma iguaria de alta qualidade alimentar. Uma vez que o caranguejo *Carcinus maenas* (caranguejo verde) é extremamente abundante e de fácil captura na Ria de Aveiro, começou a ser estudada a possibilidade de se efectuar a produção de caranguejos moles com esta espécie. Esta produção teria como objectivo colocar no mercado os caranguejos moles quer como produto alimentar (quando em condições óptimas) quer como isco para a pesca desportiva. No entanto, a produção de caranguejo verde não pode ser efectuada com os métodos utilizados na produção de caranguejo azul, isto porque os processos de identificação da fase da muda em ambas as espécies são distintos. Assim, enquanto que no caranguejo azul essa identificação é feita por uma simples e rápida observação directa das patas natatórias (último par de pereópodes), no caranguejo verde é necessário remover-se uma peça bucal (exopódito do 1º maxilípede) para posterior observação ao microscópio óptico.

Carvalho *et al.* (1999) realizaram a caracterização da população de *Carcinus maenas* da Ria de Aveiro tendo-se procurado, sem sucesso, identificar um método mais simples, rápido e não-invasivo de identificação das fases da muda no caranguejo verde. Desta forma, a utilização do caranguejo verde na produção de caranguejos moles seria possível através de uma intervenção no processo fisiológico da muda, ou seja, na pesquisa de um ou mais estímulos que conduzam a uma indução da muda.

O controlo do ciclo da muda dos crustáceos é feito maioritariamente através de hormonas da muda (ecdisteróides). Estas apresentam-se como fundamentais para o normal desenrolar do ciclo da muda, sendo por isso bastante importante saber de que forma variam os seus níveis ao longo do ciclo da muda. Para melhor entender as variações dos níveis de ecdisteróides na hemolinfa do caranguejo verde, realizou-se a identificação, separação e quantificação dos ecdisteróides nas diferentes fases do ciclo da muda, utilizando-se para isso a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e o enzimo-imuno-ensaio (EIA).

Os ecdisteróides apresentam concentrações baixas nas fases de pós-muda (fase A e B), registando-se aumentos ligeiros na intermuda (fase C) e na fase inicial da pré-muda (fases D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>). No final da pré-muda (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) regista-se um aumento significativo das concentrações de ecdisteróides (ANOVA unifactorial, p<005). A 20-hidroxiecdisona foi o ecdisteróide que maiores concentrações apresentou ao longo das diferentes fases da muda, correspondendo os picos mais elevados, à semelhança do verificado nos ecdisteróides totais, às fases finais da pré-muda (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). A identificação do perfil de ecdisteróides na hemolinfa do *Carcinus maenas* permitiu também otimizar as técnicas utilizadas para ser possível a sua futura aplicação em estudos hormonais após a identificação de um estímulo que induza a muda de forma efectiva.

Diferentes tratamentos foram utilizados com o intuito de avaliar o seu efeito na sobrevivência e frequência de muda da espécie *Carcinus maenas*. Resumindo, realizaram-se experiências em que os caranguejos foram expostos ao ar, em que se ablaram ambos os pedúnculos oculares e/ou as patas locomotoras e em que se injectou a hormona da muda activa e/ou compostos químicos com possível inibição da produção/libertação da hormona inibidora da muda.

A experiência de exposição ao ar não apresentou nenhum resultado relevante relativamente à frequência de muda. No entanto, ainda no que diz respeito às frequências de muda, verificou-se que os grupos de estudo constituídos pelos animais capturados por arrasto (machos/arrasto e fêmeas/arrasto) apresentaram valores superiores aos que foram capturados com nassas (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ). Os períodos de exposição ao ar mais longos (120, 144 e 168h) apresentaram quase sempre as taxas de mortalidade mais elevadas. No entanto, foi em períodos longos de exposição (machos/arrasto – 120h; fêmeas/arrasto – 144h) que se registou a frequência de muda mais elevada (19%).

A ablação dos pedúnculos oculares e/ou a ablação de patas locomotoras resultou em frequências de muda superiores nos caranguejos machos do que nas fêmeas (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ). Em todos os grupos de estudo, as taxas de mortalidade mais elevadas foram registadas nos caranguejos em que se ablaram ambos os pedúnculos oculares (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ). Apesar de, no final da experiência não existirem diferenças significativas entre as frequências de muda observadas, os machos/nassas com ablação de patas locomotoras apresentaram, nos primeiros 15 dias de experiência, uma rápida subida da frequência de muda (de 0 até 22%), tendo estabilizado em seguida até ao final da experiência. Numa tentativa de repetir este resultado, realizou-se um novo ensaio com machos/nassas com ablação de patas locomotoras, mas neste ensaio as frequências de muda registadas foram bastante inferiores.

As experiências em que se efectuou a injeção de 20-hidroxicodisona (20-OHE) e/ou outros compostos químicos com possível influência no ciclo da muda também não permitiram encontrar um estímulo da muda. No ensaio A, as taxas de mortalidade foram extremamente elevadas quer nos controlos (entre 58 e 94%) quer nos animais sujeitos aos diferentes tratamentos (entre 81 e 100%). No ensaio B, os caranguejos foram sujeitos a tratamentos semelhantes (alterou-se apenas as concentrações dos compostos) e apresentaram taxas de mortalidade muito menores (controlos - entre 6 e 13%; tratamentos – entre 17 e 62%). No que diz respeito às frequências de muda, no ensaio A da experiência o número de mudas foi maior nos caranguejos fêmeas do que nos machos, registando-se o contrário no ensaio B. Nas frequências de muda, o valor mais elevado (10%) foi registado em fêmeas (capturadas por arrasto) em que se injectou simultaneamente 20-OHE e ciproheptadina, sem no entanto se mostrar significativamente superior.

A impossibilidade de obter um método simples de identificação da fase da muda na espécie estudada (*Carcinus maenas*) e a variação sazonal das respostas aos diferentes estímulos testados reduziu a aplicabilidade dos resultados obtidos na produção de caranguejo mole. No futuro, o controlo das condições ambientais (fotoperíodo, temperatura e salinidade) como modeladoras da resposta fisiológica deverá ser objecto de uma nova abordagem, a qual poderá eventualmente ser efectuada com uma espécie mais adequada (como o *Callinectes sapidus*).

## abstract

The blue crab *Callinectes sapidus* has been used, in the last years, with great success, in soft crab production. In United States of America this industry showed an enormous expansion, being soft blue crab considered an highly quality food product. Once green crab *Carcinus maenas* is extremely abundant and easy to capture in Ria de Aveiro, it was studied the possibility of producing soft green crabs with this crab species. The production of soft green crabs objective will be to obtain a high quality alimentary product (when in best conditions) and bate for sport fisherman. However, the methods used in the production of soft blue crabs cannot be applied to green crab because the moult phase identification methods are different. In the blue crab, the moult phase identification is made in a simple and quick way through the direct observation of the swimming legs (last pair of pereopods). In the green crab, moult phase identification requires the removal of the exopodite of the 1<sup>st</sup> maxilliped for posterior observation at light microscopy.

A previous study on the green crab (*Carcinus maenas*) population characterization in Ria de Aveiro tried to identify, without success, a simple, fast and non-invasive method of moult phase identification. In this way, the use of green crab in the production of soft crabs would be possible by the intervention on the physiologic process of moult, i.e., in researching one or more stimulus that can induce moult.

The moult cycle control in crustaceans is made mainly through the moult hormones (ecdysteroids). These hormones have showed to be crucial for the normal development of the moult cycle, being very important to know how these hormones titers change throughout the moult cycle. For better understanding of these hormones variation in green crab hemolymph, ecdysteroids were identified, separated and quantified in the different moult phases. High performance liquid chromatography (HPLC) and enzimo-immuno-assay (EIA) were the two techniques used to perform this hormonal analysis.

Ecdysteroids showed low concentrations in post-moult phases (phases A and B), registering slight increases in intermoult (phase C) and beginning of pre-moult (phases D<sub>0</sub> and D<sub>1</sub>). The final pre-moult phases (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) registered significant higher ecdysteroids concentration in green crab hemolymph (trifactorial ANOVA, p<0.05). 20-Hidroxyecdysone was the ecdysteroid with higher hemolymph concentration throughout the different moult phases, being the highest values, similarly to total ecdysteroids, in the final pre-moult phases (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>). The ecdysteroid titer identification in *Carcinus maenas* hemolymph also allowed the optimization of the methods (HPLC and EIA) used for their future utilization in hormonal studies after identification of one stimulus that induce moult effectively.

Different treatments were used to evaluate their effect on survival and moult frequency of the crab *Carcinus maenas*. In this way, some experiments were performed where crabs were exposed to air, eyestalks and/or walking legs were ablated and active moult hormone (20-hydroxyecdysone) and/or other chemical compounds with possible inhibition of moult inhibiting hormone (MIH) production/liberation were injected.

The air exposure experiment did not registered relevant results regarding moult induction. However, concerning moult frequency, it was verified that crabs captured by trawl (males/trawl and females/trawl) presented higher values than the ones captured with traps (trifactorial ANOVA,  $p < 0.05$ ). The longest exposure periods (120, 144 e 168h) showed, usually, the highest mortality rates. Nevertheless, it was in longer exposure periods (males/trawl – 120h; females/trawl – 144h) that the higher moult frequency value (19%) was registered.

Eyestalk ablation and/or walking legs ablation resulted on higher moult frequencies in male than in female crabs (trifactorial ANOVA,  $p < 0.05$ ). In all study groups, highest mortality rates were observed on crabs with eyestalk ablation (trifactorial ANOVA,  $p < 0.05$ ). Although at the end of the experiment the moult frequencies registered were not relevant, males, captured by traps, with walking legs ablation showed, in the first 15 experiment days, a quick increase in the moult frequency (from 0 to 22%), stabilizing since the 15<sup>th</sup> day until the end of the experiment. A second assay was performed to try to repeat these good results but without success, being registered very low moult frequencies and mortality rates.

The experiment where it was injected 20-hydroxyecdysone (20-OHE) and/or other chemical compounds, which possibly interfere in moult cycle, did not presented any stimuli for moult. In assay A, mortality rates were extremely high both in control crabs (between 58 and 94%) and experimental (between 81 and 100%). Meanwhile, in assay B, crabs submitted to similar treatments presented lower mortality rates (controls - between 6 and 13%; treatments – between 17 and 62%). The different mortality rates registered in assay A and B may be due to water physico-chemical variations (temperature, salinity e dissolved oxygen). Regarding moult frequencies, in assay A, it was registered a higher number of moults in female than male crabs; being registered the opposite in assay B (males presented more moults than female crabs). Moult frequencies did not present significant results; however, the simultaneous injection of 20-OHE and cyproheptadine (10%) in females (captured by trawl) registered the highest value of this experiment.

The impossibility of an easy identification method of the moult phase in the studied species (*Carcinus maenas*) and the seasonal variation of the answers to the stimuli tested reduced the applicability of the obtained results in the soft crab production. In the future, the control of the environmental conditions (e.g. photoperiod, temperature and salinity) as modellers of the physiologic response should be object of a new approach, which eventually can be done with a more appropriate species (*Callinectes sapidus*).

# ÍNDICE

	página
<b>Introdução Geral</b>	<b>11</b>
<b>Material e Métodos Geral</b>	<b>57</b>
<b>Resultados</b>	<b>72</b>
<b>Parte I – Endocrinologia</b>	<b>73</b>
<u>Capítulo 1</u> – Extracção, purificação e quantificação dos ecdisteróides ao longo das fases do ciclo da muda da espécie <i>Carcinus maenas</i>	74
Introdução	75
Material e Métodos	77
Resultados	80
Discussão	84
<b>Parte II – Efeitos de estímulos hormonais e/ou químicos na frequência da muda de <i>Carcinus maenas</i></b>	<b>87</b>
<u>Capítulo 2</u> – Determinação do LT50 na exposição permanente ao ar do caranguejo <i>Carcinus maenas</i>	88
Introdução	89
Material e Métodos	90
Resultados	90
Discussão	93
<u>Capítulo 3</u> – Estudo dos efeitos da exposição ao ar no ciclo da muda do caranguejo <i>Carcinus maenas</i>	95
Introdução	96
Material e Métodos	97
Resultados	98
Discussão	104

	Página
<u>Capítulo 4</u> – Estudo dos efeitos da ablação dos pedúnculos oculares e de patas locomotoras no ciclo da muda do caranguejo <i>Carcinus maenas</i>	108
Introdução	109
Material e Métodos	110
Resultados	112
Discussão	119
<u>Capítulo 5</u> – Estudo dos efeitos da injeção da hormona da muda activa e de alguns químicos no ciclo da muda do caranguejo <i>Carcinus maenas</i>	123
Introdução	124
Material e Métodos	125
Resultados	128
Discussão	138
<b>Discussão Geral</b>	<b>144</b>
<hr/>	
<b>Conclusões</b>	<b>150</b>
<hr/>	
<b>Bibliografia</b>	<b>153</b>
<hr/>	
<b>Anexos</b>	<b>162</b>
<hr/>	

# **INTRODUÇÃO GERAL**

## PRODUÇÃO MUNDIAL DE ORGANISMOS AQUÁTICOS – ESTADO ACTUAL

Os organismos aquáticos pescados e/ou cultivados pelo Homem são uma importante fonte de proteína animal necessária para a alimentação de uma população mundial em constante crescimento. Em 1999, a produção mundial total de organismos aquáticos (pesca e aquacultura) foi de 136.857.212 toneladas (t), representando um aumento de cerca de 7% relativamente a 1998 e de cerca de 24% relativamente a 1990 (Quadro 1). Na última década, 1998 foi o único ano em que ocorreu uma diminuição na produção de organismos aquáticos, verificando-se uma recuperação dessa produção no ano de 1999 (Quadro 1). A diminuição da produção em 1998 deveu-se à diminuição das pescas marinhas efectuadas pelos países sul-americanos no Pacífico Sul devido a anomalias climáticas – o El Niño (FAO, 2000a).

Nos últimos anos tem-se verificado um abrandamento e, em alguns casos, uma diminuição gradual das capturas pesqueiras, nomeadamente devido à sobre-exploração da maior parte das zonas de pesca mundiais. A pesca de organismos aquáticos registou taxas de crescimento progressivamente mais pequenas durante os últimos 50 anos (anos 50 e 60 – 6%/ano; anos 70 e 80 - 2%/ano; anos 90  $\approx$  0%/ano) (FAO, 2000a). Em contraste, o crescimento da produção de aquacultura tem registado uma tendência de crescimento progressivo, ao longo dos últimos 50 anos. A produção de aquacultura nos anos 50 e 60 registou um crescimento de 5%/ano, nos anos 70 e 80 essa taxa subiu para 8%/ano, tendo atingido nos anos 90 um valor próximo de 10%/ano (FAO, 2000a).

Quadro 1: Produção mundial de organismos aquáticos entre 1995 e 1999, em quantidade (toneladas - t), realçando-se os registos da China, maior produtor mundial, e de Portugal (FAO, 2000b; FAO, 2000c; FAO, 2000d).

		Ano				
		1995	1996	1997	1998	1999
<b>Pesca Mundial (t)</b>		93.107.230	94.714.442	94.996.948	88.024.061	94.086.236
<b>Aquacultura Mundial (t)</b>		31.285.615	33.923.591	35.937.932	39.275.336	42.770.975
<b>Produção Total Mundial (t)</b>		124.392.845	128.638.033	130.934.880	127.299.397	136.857.211
<b>China</b>	<b>Pesca (t)</b>	12.712.706	14.333.737	15.906.614	17.400.447	17.455.582
	<b>Aquacultura (t)</b>	20.018.273	22.208.495	24.030.313	27.071.942	30.044.177
<b>Portugal</b>	<b>Pesca (t)</b>	263.400	262.125	223.666	224.929	209.656
	<b>Aquacultura (t)</b>	4.981	5.364	7.185	7.536	7.523



Em 1999, a produção de aquacultura atingiu as 42.770.975 t, o que representa um crescimento de cerca de 8% relativamente a 1998 (Quadro 1) (FAO, 2000d). A produção aquícola mundial é dominada pelos países asiáticos – a China (30.044.177 t, que representam cerca de 70,2% da produção aquícola total mundial em 1999), a Índia (2.035.488 t), o Japão (1.315.299 t), as Filipinas (948.995 t), a República da Coreia (776.781 t) e a Indonésia (689.640 t) são os países que apresentam valores de produção mais elevados (FAO, 2000d). No que diz respeito à pesca, a produção é também dominada pela China (17.455.582 t), mas de forma menos pronunciada (19% do total mundial). Na pesca, os países asiáticos (Japão – 5.299.077 t) não exercem um domínio tão acentuado como o verificado na produção aquícola, isto porque alguns países do continente americano apresentam também valores relativamente elevados (Peru – 8.431.023 t; Chile – 5.280.731 t; Estados Unidos da América – 4.831.284 t) (FAO, 2000c). Desta forma, o crescimento da aquacultura apresenta-se como uma alternativa ao abrandamento e mesmo diminuição das capturas pesqueiras mundiais (Quadro 1), permitindo ao mesmo tempo uma recuperação das zonas pesqueiras mundiais que estão sobre-exploradas.

## **AQUACULTURA DE CRUSTÁCEOS NO MUNDO**

A aquacultura de crustáceos, a carcinocultura, possui já centenas, ou mesmo milhares de anos, uma vez que já era efectuada após a entrada de uma diversidade de camarões, lagostins e caranguejos, de forma natural, em lagos ao longo da costa indo-pacífica. O aparecimento de técnicas de refrigeração e melhores e mais rápidos meios de transporte permitiu aos produtores o acesso ao mercado das grandes cidades e ao mercado internacional (Lee e Wickins, 1992). Estas e outras evoluções provocaram um crescimento acentuado nas produções aquícolas de crustáceos, nos últimos 30 anos, a nível mundial (Quadro 2).

Actualmente, uma grande variedade de crustáceos é cultivada por todo o mundo, embora apenas algumas espécies tenham valor económico suficientemente elevado para serem exploradas industrialmente. Os crustáceos, consoante a ordem a que pertencem e/ou o local onde habitam, podem ser separados em diversos grupos: 1) crustáceos de água doce; 2) santolas e caranguejos; 3) lagostas e lavagantes; 4) camarões e gambas; 5) vários crustáceos marinhos (FAO, 2000d). Considerando os crustáceos em geral e o grupo

“camarões e gambas” em particular, salienta-se a família Penaeidae (produção em 1999 - 1.129.465 t), a mais representativa em termos de produção aquícola mundial de crustáceos (71,3%) e, conseqüentemente, do grupo “gambas e camarões” (99,9%) (Quadro 2) (FAO, 2000d). O elevado valor comercial de algumas espécies pertencentes a esta família (exemplos: *Penaeus*<sup>1</sup> *monodon*, *P. vannamei*, *P. chinensis*, *P. merguensis*, *P. stylirostris*, *P. indicus*, *P. japonicus*) suscitou o interesse dos produtores aquícolas, levando a estudos para avaliar quais destas espécies apresentavam melhores características para serem cultivadas artificialmente (Lee e Wickins, 1992; FAO, 2000d). O grupo “camarões e gambas” apresenta um enorme valor económico a nível da aquacultura mundial. Assim, em 1999, uma produção de 1.130.737 t originou receitas na ordem dos 6.669.855 milhões de dólares americanos, representando 71,4% da produção e 75,4% da receita aquícola mundial de crustáceos. A importância económica deste grupo é realçada quando se efectua uma comparação com a produção e receita aquícola total mundial. Os valores da produção aquícola do grupo “camarões e gambas” representam apenas 2,6% da produção aquícola total mundial mas representam 12,4% da receita aquícola total mundial (FAO, 2000e).

Quadro 2: Produção aquícola mundial de crustáceos (toneladas) (FAO, 2000d).

Grupos de crustáceos	Ano								% cres. último ano
	1970	1980	1990	1995	1996	1997	1998	1999	
Crustáceos de água doce	3.510	17.266	70.557	103.322	152.624	208.774	246.005	319.283	22,9 %
Santolas e caranguejos	303	1.001	3.823	44.766	46.392	70.948	79.621	103.650	23,2 %
Lagostas e lavagantes	0	49	79	69	62	67	40	58	31,0 %
Camarões e gambas	9.022	71.897	673.203	952.941	961.148	1.000.928	1.074.878	1.130.737	4,9 %
Vários crustáceos marinhos	117	879	4.393	24.488	7.269	21.515	52.736	30.214	- 42,7 %
Produção Total de Crustáceos	12.952	91.092	752.055	1.125.586	1.167.495	1.302.232	1.453.280	1.583.942	8,2 %

Dos crustáceos cultivados os caranguejos foram, inicialmente, os que menor interesse despertaram, provavelmente devido a não possuírem um abdómen longo e carnudo como os camarões e lagostas, facto que torna estes últimos extremamente atractivos para o consumidor. Outra das possíveis razões para um menor investimento na produção aquícola destes animais pode dever-se às suas características naturais,

<sup>1</sup> O género *Penaeus*, desde 1997, tem uma nova classificação proposta por Pérez Farfante e Kensley, podendo ser designado de *Marsupenaeus* ou *Litopenaeus*. Para evitar confusão, neste trabalho manteve-se a designação *Penaeus*.

nomeadamente às suas tendências canibais e à vida larvar prolongada de algumas espécies de caranguejos. Apesar de tudo isto, nos últimos anos tem ocorrido uma aposta na produção extensiva de algumas espécies de grandes dimensões, assim como na produção de caranguejo mole (Lee e Wickins, 1992). O aumento do interesse na produção aquícola de caranguejos resultou num crescimento da sua produção de 23,2% em 1999 (Quadro 2) (FAO, 2000e).

Os crustáceos provenientes das capturas pesqueiras e da aquacultura, consoante a sua apresentação no mercado, podem atingir preços relativamente elevados. A nível local, os crustáceos são normalmente vendidos vivos, podendo ainda ser apresentados congelados, enlatados, secos e cozinhados. As diferentes formas de apresentação podem ser utilizadas quer no animal inteiro quer em partes do animal (exemplos: cauda do camarão ou da lagosta; pinças do caranguejo) (Lee e Wickins, 1992). A variação do valor económico dos crustáceos está também dependente da fase biológica e, por vezes, do estágio do ciclo da muda em que se encontra o animal. Por exemplo, na Tailândia, um exemplar fêmea de *Scylla serrata* (caranguejo da lama) que esteja ovada possui um preço elevado para depois da desova o preço de mercado baixar em cerca de 90% (Lee e Wickins, 1992). O preço do caranguejo aumenta bastante quando este é apresentado no estágio de pós-muda, isto é, período do ciclo da muda em que a carapaça do caranguejo está mole. A produção de caranguejo mole envolve dois objectivos principais, a sua utilização como isco para a pesca e como produto para alimentação humana. Nos Estados Unidos da América, o caranguejo mole da espécie *Callinectes sapidus* (“blue crab” – caranguejo azul) é considerado uma iguaria de altíssima qualidade, sendo por isso produzido em grande escala.

## **AQUACULTURA DE CRUSTÁCEOS EM PORTUGAL**

Em Portugal, o sector das pescas encontra-se numa fase de recessão, como é possível verificar pelo decréscimo de capturas pesqueiras nos últimos anos (Quadro 1). Por sua vez, a aquacultura, após um incremento considerável no final dos anos 80, apresentou uma forte queda no início dos anos 90 tendo estabilizado nos anos de 1998 e 1999 em cerca de 7.000.000 t (Quadro 1) (FAO, 2000d). No que diz respeito à aquacultura de crustáceos, Portugal apresenta uma produção insignificante, havendo registos da cultura de

apenas uma espécie de camarão (*Penaeus japonicus*) (Arrobas e Ruano, 1986). No nosso país, a FAO (Food and Agriculture Organisation) apenas apresenta registos de produção de crustáceos entre 1989 e 1996, verificando-se uma produção média anual de cerca de 4,2 t (FAO, 2000d).

Apesar do insucesso da aquacultura de crustáceos em Portugal, nos anos 70 e 80 realizaram-se alguns estudos para avaliar quais as espécies nativas de crustáceos (*Penaeus kerathurus* - Figueiredo, 1972 e Luís, 1988; *Palaemon serratus* - Arrobas, 1983) que apresentavam melhores características para serem produzidas em aquacultura. No nosso país, apesar do sucesso nas experiências de reprodução artificial nestas espécies, os resultados referentes ao crescimento até tamanho comercial foram escassos e pouco satisfatórios. Em 1985, através da importação de Espanha de pós-larvas da espécie *Penaeus japonicus* foi possível desenvolver uma produção a nível comercial, embora sem grande sucesso (Arrobas e Ruano, 1986).

## O CARANGUEJO VERDE *Carcinus maenas*

### CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA

A classificação sistemática do caranguejo verde *Carcinus maenas* (Linneu, 1758) está descrita no quadro seguinte (Williams, 1984).

Quadro 3: Classificação sistemática da espécie *Carcinus maenas* (Williams, 1984).

FILO	Arthropoda
SUB-FILO	Crustacea
CLASSE	Malacostraca
SUB-CLASSE	Eumalacostraca
SUPER-ORDEM	Eucarida
ORDEM	Decapoda
SUB-ORDEM	Pleocyemata
INFRA-ORDEM	Brachyura
SECÇÃO	Brachyrhyncha
FAMÍLIA	Portunidae
GÉNERO	<i>Carcinus</i>
ESPÉCIE	<i>Carcinus maenas</i>

## DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

*Carcinus maenas* é uma espécie de caranguejo do Atlântico Europeu, tendo sido registado desde Marrocos até à Noruega e Islândia. A sua presença também já foi registada no Mediterrâneo Ocidental (Crothers, 1967; Falciai e Minervini, 1996). Apesar de ser uma espécie nativa da costa noroeste europeia, o caranguejo verde encontra-se já amplamente distribuído na costa este do continente americano (Estados Unidos da América, Hawai e Brasil), tendo recentemente invadido o norte do Pacífico, a Austrália e sul de África (Cohen *et al.*, 1995; McCormick, 1999; Mathews *et al.*, 1999). Actualmente, como é possível verificar, esta espécie encontra-se distribuída por todo o mundo, podendo essa distribuição dever-se à capacidade de distribuição das suas larvas e/ou pela sua introdução através da acção directa ou indirecta do Homem (WDFW, 1998; McCormick, 1999).

Em Portugal, esta espécie distribuiu-se por toda a costa continental (oeste e sul), apresentando maior incidência na costa oeste. Nesta mesma costa destacam-se três estudos de caracterização das populações de *Carcinus maenas*, tendo dois desses estudos sido realizados na Ria de Aveiro (Queiroga, 1987; Carvalho *et al.*, 1999) e o outro na Lagoa de Santo André (Fonseca e Luís, 1992). Em ambos os locais atrás referidos, a espécie *C. maenas* apresentou-se em grande número e bem distribuída espacialmente (Queiroga, 1987; Gomes, 1991a; Fonseca e Luís, 1992). No entanto, na Ria de Aveiro, dependendo da época do ano e conseqüentemente da temperatura e salinidade da água, as migrações sazonais destes caranguejos fazem variar a sua abundância de zona para zona (Gomes, 1991b).

## CARACTERÍSTICAS GERAIS E ECOLOGIA

O caranguejo verde possui dez pereópodes, pertencendo por isso à ordem Decapoda (Quadro 3), e movimenta-se predominantemente sobre o fundo. Dos cinco pares de pereópodes (patas), apenas o primeiro par apresenta pinças na extremidade, sendo uma das pinças maior que a outra. Para o caranguejo, as duas pinças representam uma importante “arma” quer de defesa quer de ataque, apresentando também uma importante função na alimentação. Por sua vez, o último par de pereópodes apresenta o dactilo ligeiramente achatado, característica usual dos caranguejos “nadadores” (família Portunidae), apresentando, no entanto, no caso do *C. maenas* uma forma pontiaguda (Kukenthal *et al.*, 1984; McCormick, 1999). O caranguejo apresenta um cefalotórax muito alargado e um

abdómen curto e estreito, mantendo-se este último dobrado de modo a que a sua face ventral se aplique perfeitamente ao cefalotórax. O cefalotórax é coberto por uma carapaça dorsal rígida (fortemente calcificada) que apresenta, no bordo antero-lateral, cinco dentes agudos de cada lado da carapaça. Ainda no bordo frontal temos as fossas oculares (ou orbitáculos) onde se inserem os pedúnculos oculares, que mostram nas extremidades os olhos bastante abaulados. O abdómen permite fazer uma perfeita distinção entre machos e fêmeas (Fig. 1). Na fêmea o abdómen é um pouco mais comprido e muito mais largo do que no macho. Para além disso, enquanto que na fêmea os seis segmentos e o télson do abdómen estão bem separados e móveis entre si, no macho fundiram-se o 3º, 4º e 5º segmentos numa grande peça única em forma de trapézio. As fêmeas apresentam pleópodes (abundantemente dotados de sedas) do 2º ao 5º segmento abdominal, servindo estes pleópodes para a fixação dos ovos fecundados. O caranguejo macho apenas apresenta extremidades abdominais no 1º e 2º segmentos, estando estas extremidades transformadas em aparelhos de copulação. O orifício sexual masculino encontra-se na face ventral do artículo basal da quinta pata locomotora. Por sua vez, o orifício sexual feminino situa-se no segmento da terceira pata locomotora (Kukenthal *et al.*, 1984).

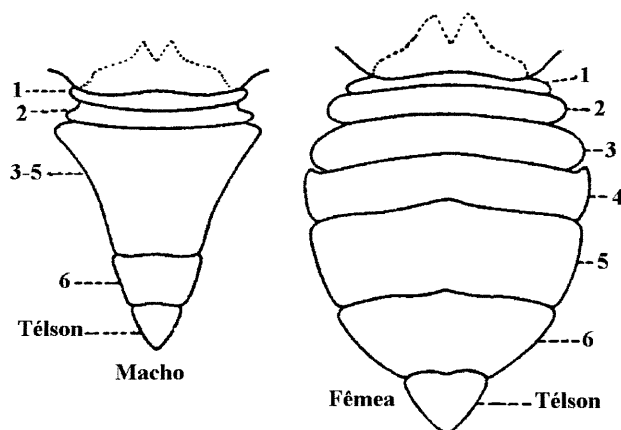


Figura 1: Aspecto do abdómen de um macho e de uma fêmea da espécie *Carcinus maenas* (números de 1 a 6 indicam o número do segmento abdominal) (adaptado de Kukenthal *et al.*, 1984).

*Carcinus maenas* apresenta usualmente uma carapaça verde escura, quase preta, com manchas amarelas ou castanhas (Fig. 2). As fêmeas maduras são vermelhas alaranjadas na sua face ventral, enquanto os machos e as fêmeas imaturas são amarelos ou

verdes na face ventral. Estes caranguejos, no estado adulto, apresentam uma largura de carapaça média de 60mm, podendo atingir um máximo de 80mm (WDFW, 1998; McCormick, 1999).

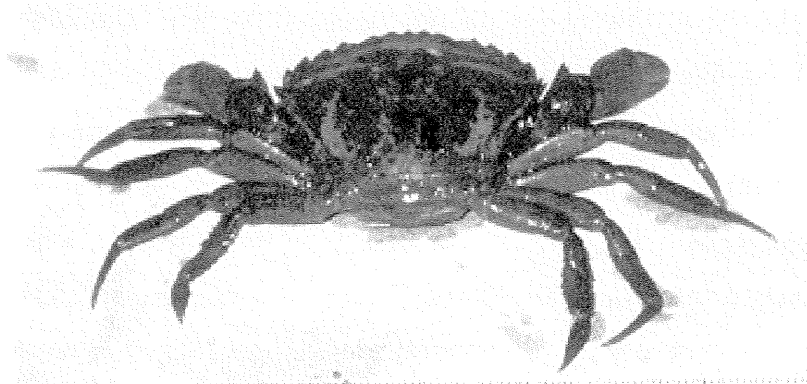


Figura 2: Fotografia de um caranguejo verde (*Carcinus maenas*).

O caranguejo verde ocorre predominantemente em estuários, zonas intertidais abrigadas e habitats subtidais superficiais. Os caranguejos verdes, que habitam a zona intertidal, apresentam um padrão de migração relacionado com as marés, isto é, um largo número de animais movimentam-se para a zona intertidal aquando da preia-mar e voltam à zona subtidal aquando da baixa-mar. No entanto, alguns destes caranguejos mantêm-se na zona intertidal durante a baixa-mar, quer em poços de água nos rochedos quer enterrados no substrato ou sob rochas ou algas (Reid e Aldrich, 1989). Desta forma, esta espécie está bem distribuída em substratos intertidais duros e moles e substratos subtidais (Reid e Aldrich, 1989; Moksnes *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1999).

O caranguejo é um predador voraz alimentando-se de vários tipos de organismos, tais como os moluscos bivalves (berbigão, amêijoas e mexilhões), poliquetas, crustáceos de pequenas dimensões e algas (WDFW, 1998; McCormick, 1999). Os caranguejos que habitam a zona intertidal alimentam-se usualmente de algas, enquanto os subtidais se alimentam maioritariamente de outros animais, realçando-se o importante papel desempenhado por esta espécie como predador de várias espécies de macrofauna, especialmente infauna (organismos que estão enterrados no substrato) (Gomes, 1991a,b). De salientar que nas fases mais importantes da reprodução (fêmeas ovadas) e do

crescimento (pré-muda final e pós-muda) os caranguejos não se alimentam. O principal predador de *Carcinus maenas* é o robalo (*Dicentrarchus labrax*) (McCormick, 1999).

#### CICLO DE VIDA

*C. maenas* possui 5 fases larvares representando dois estádios: zoea (quatro fases) e megalopa (uma fase) (Rice e Ingle, 1975). As zoeas de *C. maenas* são membros típicos do meroplâncton (plâncton temporário), subindo à superfície durante a noite para se alimentarem de pequenos organismos e descendo para locais mais profundos durante o dia. As megalopas, que já apresentam uma forma semelhante a um caranguejo (possui todos os seus apêndices com total funcionalidade – Fig. 3), também são organismos planctônicos e também apresentam migrações verticais. No final do estádio de megalopa, esta desce na coluna de água e procura um substrato adequado (por exemplo: vaza fina) e sofre metamorfose para originar o primeiro estádio de caranguejo juvenil (Crothers, 1967). O juvenil apresenta uma carapaça redonda, surgindo a forma característica da carapaça do caranguejo apenas após a 5ª muda (Fig. 3). A compilação dos resultados de diversos estudos mostrou que o caranguejo juvenil necessita de mudar cerca de 10 vezes para atingir uma largura de carapaça de cerca de 20 mm, mais 5 ou 6 mudas para atingir cerca de 60 mm e mais 7 ou 8 mudas para atingir uma largura de carapaça máxima (cerca de 86 mm) (Crothers, 1967). Na verdade, poucos caranguejos atingem a largura máxima, isto porque após atingirem  $\pm 60$  mm de largura de carapaça estes animais podem entrar em anecdisis terminal (interrupção do crescimento) a qualquer momento (Carlisle, 1957). *C. maenas* apresenta um ciclo de crescimento fechado, isto é, após um determinado número de mudas (Crothers sugere  $\pm 18$ ) o animal entra em anecdisis terminal. Este tipo de ciclo apresenta a vantagem de aumentar a esperança de vida dos jovens adultos (n.º de mudas diminui, logo diminui a possibilidade de eles serem predados quando moles), retirando ao mesmo tempo os caranguejos velhos (a vida do caranguejo é limitada quando este entra em anecdisis terminal) (Crothers, 1967).



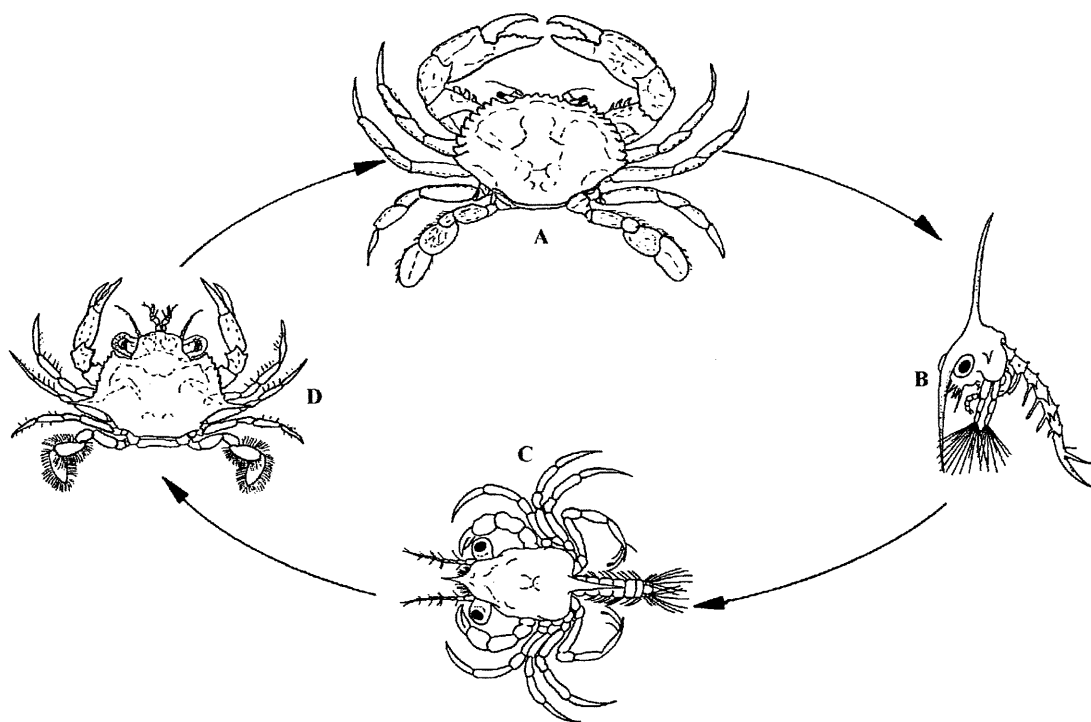


Figura 3: Representação geral do ciclo de vida dos caranguejos. Ovo (não representado) incubado pela fêmea durante 7-25 dias; A) Caranguejo adulto; B) Zoea (4-7 estádios em 12-70 dias); C) Megalopa (1 estágio em 5-7 dias); D) 1º estágio de caranguejo até à maturidade (120-540 dias). (adaptado de Lee e Wickins, 1992).

Nos Braquiura, a maturidade sexual é atingida nas fêmeas mediante uma muda com características particulares denominada de muda da puberdade. Imediatamente após esta muda a fêmea está apta a copular, bem como a iniciar a maturação das gónadas. Esta muda caracteriza-se por variações abruptas dos parâmetros das relações de alometria entre várias estruturas anatómicas (revisão por Demeusy, 1958). A muda da puberdade representa o final do desenvolvimento progressivo das características sexuais, embora possa haver uma acentuação dessas mesmas características mais tarde. Os caracteres sexuais começam a ser visíveis na segunda muda do caranguejo juvenil (após a metamorfose da megalopa em caranguejo), quando um par de pleópodes se desenvolve no segmento abdominal do macho mas não nas fêmeas. Nos últimos estádios, os pleópodes posteriores degeneram, no caso dos machos, ou alongam-se nas fêmeas. Estudos realizados por Demeusy (1958, 1963) permitiram constatar que as fêmeas atingem a puberdade após 11-12 mudas com 16-23 mm de largura de carapaça na Primavera e com 23-31 mm no Verão. Nos machos deste grupo a muda da puberdade não é tão evidente (Hartnoll, 1969). O estudo pormenorizado

das variações morfológicas associadas à muda de puberdade em *C. maenas* (11<sup>a</sup> muda) permitiu constatar que esta se traduz essencialmente num alongamento acentuado do abdómen associado a um espessamento da ornamentação (formação de uma franja densa de sedas longas e flexíveis) e intensificação da pigmentação dos bordos dos segmentos abdominais. Para além disso, verifica-se um alongamento dos pleópodes e o aumento do número e do tamanho das suas sedas. No entanto, estas alterações não são caracteres rigorosos para a identificação da muda da puberdade. O único factor infalível para a identificação desta muda é o levantar do abdómen que permite à fêmea copular pela primeira vez (Demeusy, 1958).

Nos caranguejos, para que possa ocorrer a cópula é necessário que a fêmea apresente um exosqueleto mole (após exuviação) e o macho possua um exosqueleto duro. Para garantir a presença de um macho no momento da cópula, os caranguejos passam por um período de pré-cópula durante o qual o macho transporta a fêmea debaixo de si com a face ventral da fêmea para baixo. Após a muda da fêmea, que pode ser assistida pelo parceiro, dá-se o acto da cópula, sendo que o macho continua a transportar a fêmea debaixo de si até que o tegumento desta se consolide. Durante a cópula, o macho deposita os espermatóforos nas bolsas copulatórias da fêmea, local onde os espermatozóides podem ficar armazenados durante alguns meses. Algum tempo após a cópula, a fêmea põe os ovos, os quais são transportados durante alguns meses presos às sedas dos pleópodes. Durante o tempo em que a fêmea transporta a massa de ovos procede periodicamente à limpeza e arejamento destes adoptando uma atitude erecta e abanando o abdómen, ao mesmo tempo que remexe a massa dos ovos com os pereópodes anteriores. Posteriormente, este tipo de movimentos facilita a eclosão das larvas (Broekhuysen, 1936; Crothers, 1967; Queiroga, 1987).

O valor adaptativo da pré-cópula é extremamente elevado, isto porque o caranguejo é excepcionalmente vulnerável durante o período imediatamente após a muda e normalmente tem tendência a procurar protecção, escondendo-se. Se isto acontecesse, o encontro entre dois parceiros estaria dificultado. Por outro lado, não se escondendo, a fêmea com o exosqueleto mole estaria particularmente sujeita à acção de predadores. Assim, ocorrendo o emparelhamento antes da muda da fêmea, a presença do macho fica assegurada ao mesmo tempo que a fêmea beneficia da sua protecção.

Os mecanismos de selecção do parceiro aquando do acasalamento ainda não são conhecidos com certezas, no entanto, Broekhuysen (1936) defende que o reconhecimento por parte do macho de uma fêmea prestes a mudar se faz através do tacto. Por sua vez, Hartnoll (1969), fazendo paralelismo com comportamentos reprodutores existentes em outros Portunidae, defende que esse reconhecimento é feito através da emissão de uma hormona que é lançada através da urina das fêmeas. Apesar de tudo, Broekhuysen (1936), em observações feitas em fêmeas adultas, constatou que o mecanismo de selecção, seja ele qual for, deve ser bastante eficiente pois todas as fêmeas adultas por ele observadas se encontravam fertilizadas.

#### IMPORTÂNCIA ECONÓMICA

Ao contrário do que acontece na Lagoa de Santo André (Fonseca e Luís, 1992), a captura de caranguejo verde (*C. maenas*) na Ria de Aveiro apresenta algum interesse económico para as comunidades piscatórias locais (Queiroga, 1987; Gomes, 1991a). Actualmente, os dados de exploração desta espécie são muito escassos e pouco fiáveis, quer a nível regional quer a nível nacional. A nível regional (Ria de Aveiro), dados relativos ao início dos anos 80 (1980 a 1984) e respeitantes a desembarques avançam com a existência de capturas de *Carcinus maenas* entre as 300 e as 800 toneladas anuais (Sobral, 1985). Mais recentemente, dados relativos ao final dos anos 80, estimam, por defeito, capturas de cerca de 100 toneladas/mês. Estes dados baseiam-se em valores de exportação desta espécie para Espanha, a qual resultou numa facturação na ordem dos 45-50 mil euros mensais (Gomes, 1991a). Actualmente, o objectivo da captura de caranguejos na Ria de Aveiro, na sua maioria, é a exportação para Espanha, onde é um produto alimentar de consumo humano (Queiroga, 1987; Gomes, 1991a). No mercado nacional, a espécie *C. maenas* vê o seu valor económico aumentar de forma acentuada quando está em pós-muda, isto é, quando a sua carapaça está mole. Quando nestas condições, os caranguejos são muito requisitados como isco para pesca, nomeadamente para a pesca desportiva. Quando mole, um caranguejo pode atingir, no mercado nacional, um valor médio de 0,5€/unidade (pode variar entre 0,3€ e 0,9€, dependendo do tamanho do caranguejo). O valor deste produto é evidenciado quando se compara o preço médio unitário do caranguejo mole com os 1€ a 1,5€ de preço médio de 1 Kg de caranguejos duros (aproximadamente 40 animais). Em alguns países, os caranguejos moles são já

considerados um excelente petisco, nomeadamente nos Estados Unidos da América onde este produto está a ter uma aceitação enorme e em que a produção de caranguejo mole, usando a espécie *Callinectes sapidus*, está a expandir-se muito rapidamente (Andre, 1985; Dupaul, 1985; Oesterling, 1985; Lee e Wickins, 1992).

Finalmente, os caranguejos verdes podem ainda ser utilizados para fazer rações para animais devido ao seu elevado conteúdo proteico, ao nível do cálcio, quitina e pigmentos (Lee e Wickins, 1992). No entanto, esta sua utilização na produção de rações para animais apresenta a desvantagem das farinhas resultantes apresentarem elevados teores em cinzas. A alternativa possível será a incorporação dos caranguejos na produção de uma ração para criação de camarões peneídeos, os quais apresentam uma maior tolerância ao teor em cinzas da ração. Para além disso, a composição em ácidos gordos do *C. maenas*, semelhante à dos camarões peneídeos, tornam esta espécie particularmente favorável e económica para assegurar as necessidades nutritivas de camarões em fase de crescimento (Fonseca e Luís, 1992).

## **ENDOCRINOLOGIA DO CRESCIMENTO**

A maior parte dos conhecimentos relativos ao sistema endócrino dos crustáceos foi adquirido através do estudo de decápodes, assim como de outros dois grupos da classe Malacostraca, os anfípodes e os isópodes. O crescimento dos crustáceos está directamente relacionado com o funcionamento de alguns órgãos endócrinos (Fig. 4), quer neuronais quer não neuronais (glandulares).

### **1) Órgãos Neuro-Endócrinos**

O sistema endócrino dos decápodes consiste em estruturas epiteliais do tipo endócrino não neuronal, como a glândula androgénica, e células neuro-secretoras com componentes do tipo neuronal (neuro-endócrino), como a glândula do seio (Fig. 5). As glândulas neuro-endócrinas dos decápodes são formadas pelas terminações de axónios de células neuro-endócrinas e são estruturas de acumulação e libertação de neuro-hormonas, situadas junto do sistema vascular, razão pela qual possuem a designação de órgãos neuro-hemais (Fingerman, 1992). Contrariamente aos vertebrados, o número de neuro-hormonas

nos decápodes é superior ao das não neuronais (Fingerman, 1987), tendo sido já descritos mais de 20 possíveis factores neuro-hormonais (Van Herp e Payen, 1991).

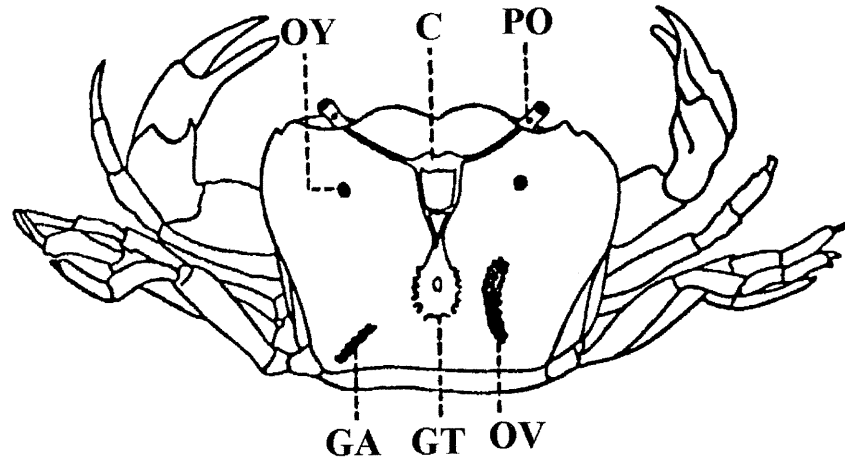


Figura 4: Representação geral de um crustáceo decápode com a localização de diversos centros endócrinos. OY – órgão Y; C - cérebro; PO – pedúnculo ocular; GA – glândula androgénica; GT – gânglio torácico; OV – ovário. (adaptado de Adiyodi e Adiyodi, 1970).

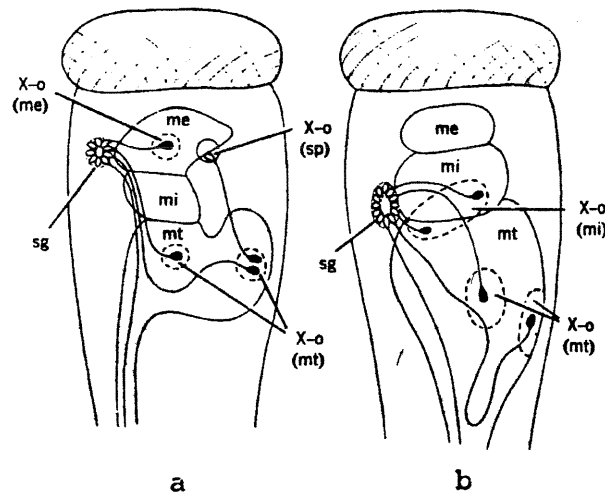


Figura 5: Esquema dos sistemas neuro-secretores do pedúnculo ocular dos crustáceos. a) Camarão, *Palaemon serratus*. b) Caranguejo, *Gecarcinus lateralis*. X-o – órgão X (representam aglomerados de células neuro-secretoras dos quais emergem axónios); sg – glândula do seio (agregado de terminais axónios); mt – medula terminal; mi – medula interna; me – medula externa; sp – poro sensitivo. (Adaptado de Spaziani *et al.*, 1994).

## **Complexo Glândula do Seio – Órgão X**

A glândula do seio e o órgão X são as duas estruturas que formam o principal complexo neuro-endócrino dos crustáceos. Este complexo está localizado nos pedúnculos oculares (Fig. 4 e 5), é responsável pelo controlo de 18 funções (Ogle, 1992) e constitui o local de armazenamento e libertação de uma ampla variedade de hormonas, tais como a hormona inibidora da muda (MIH), hormona inibidora da gónada (GIH), hormona inibidora da vitelogénese, hormona hiperglicémica, hormonas que controlam os cromatóforos e pigmentos da retina e a hormona depressora neuronal (Fingerman, 1987; Spaziani *et al.*, 1994). Vários estudos em diferentes espécies de caranguejos permitiram isolar, a partir de extractos de pedúnculos oculares, dois metabolitos do triptofano – 3-hidroxi-K-quirunenina (3-OHK) e ácido xanturénico (XA) – com capacidade de inibirem a síntese de ecdisteróides pelo órgão Y (Naya *et al.*, 1988). Estes mesmos estudos avançam a hipótese da 3-OHK ser produzida pelo órgão X, composto que será posteriormente convertido a XA quer na hemolinfa quer no órgão Y (Naya *et al.*, 1988).

O complexo glândula do seio - órgão X é constituído por (Fig. 5) (Fingerman, 1987; Spaziani *et al.*, 1994):

- 1) lamina ganglionaris;
- 2) medula externa;
- 3) medula interna;
- 4) medula terminalis.

O órgão X é composto por um grupo de terminais de neurónios neuro-secretóres (Chang, 1991). Por sua vez, a glândula do seio é composta por células da glia e terminais axonais de células neuro-secretoras, realçando-se o facto desta glândula apenas armazenar e libertar neuro-hormonas (não sintetiza hormonas) (Fig. 5) (Fingerman, 1987). As hormonas armazenadas são libertadas essencialmente por exocitose, registando-se a presença de vesículas sinápticas ligadas a este fenómeno (Cooke e Sullivan, 1982).

## **2) Glândulas endócrinas não neuronais**

### **ÓRGÃO Y**

O órgão Y é constituído por um par de glândulas endócrinas ectodérmicas (não neuronais) situadas na região cefálica das espécies pertencentes à classe Malacostraca (Fig.4). As glândulas do órgão Y são estruturas mais ou menos esféricas ou alongadas,

aparentando uma massa esponjiforme, não inervadas e compostas por apenas um tipo de células (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993). No órgão Y do “tipo *Carcinus*” estas glândulas são tipicamente separadas da epiderme, logo a maior parte das células glandulares não estão em contacto com a cutícula (Fig. 6) (Lachaise *et al.*, 1993). O órgão Y caracteriza-se por não apresentar os produtos de secreção nas suas células, isto porque este órgão liberta os produtos à medida que os sintetiza não efectuando o seu armazenamento (Pechenik, 1996). A anatomia, estrutura e ultraestrutura de vários tipos de órgão Y de crustáceos foram revistas por Lachaise *et al.* (1993).

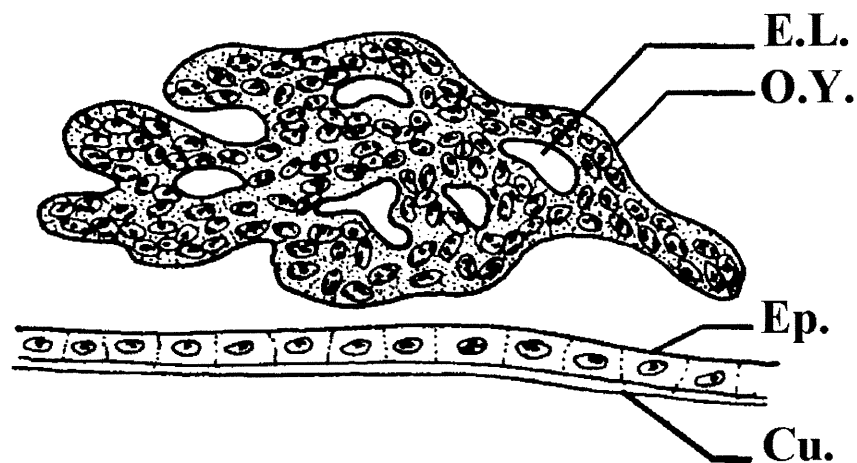


Figura 6: Esquema do órgão Y “tipo *Carcinus*”. Cu - cutícula; el - seio de hemolinfa; ep – epiderme; oy - órgão Y. (Adaptado de Lachaise *et al.*, 1993).

Ao longo do ciclo da muda é possível verificar alterações nas células do órgão Y, salientando-se, na pré-muda, o aumento da dimensão das células, o aumento de volume do núcleo, da actividade mitótica e do tamanho das mitocôndrias. Na pós-muda, as células do órgão Y apresentam as características contrárias às verificadas na pré-muda (Lachaise *et al.*, 1993).

A principal função deste órgão é, por isso, o controlo do ciclo da muda, sendo para tal responsável pela síntese e libertação dos ecdisteróides, nomeadamente a ecdisona (E), a 25-deoxiecdisona (25-DE) e a 3-dihidroecdisona (3-OHE) (Fig. 7) (Lachaise *et al.*, 1993).

Embora se saiba que o órgão Y possui capacidade para sintetizar qualquer um destes ecdisteróides não significa que em todas as espécies de crustáceos ocorra a síntese

de todas estas moléculas. Assim, até ao momento apenas foram identificados os seguintes grupos de secreções de ecdisteróides: a) ecdisona (exemplo: *Cancer antennarius*); b) ecdisona + 25-deoxiecdisona (exemplo: *Carcinus maenas*); c) ecdisona + 3-dihidroecdisona (exemplo: *Procambarus clarkii*). A identificação destes grupos de secreções não exclui a possibilidade de existirem outros grupos. Para além disso, no primeiro caso (secreção de apenas ecdisona), não se pode excluir a hipótese do método utilizado não permitir detectar a 25-DE ou a 3-OHE ou separar a E da 3-DE. Esta última dúvida permite concluir que o método utilizado para isolar e identificar os ecdisteróides é de extrema importância (Lachaise *et al.*, 1993). De forma a suprir essa dificuldade, diversas técnicas de análise de ecdisteróides tem vindo a ser desenvolvidas nos últimos anos, tais como técnicas cromatográficas (revisão por Robards e Towers, 1990), o radio-imuno-ensaio (Kuo e Lin, 1996; Lee *et al.*, 1998; entre outros) e o enzimo-imunoensaio (Porcheron *et al.*, 1989).

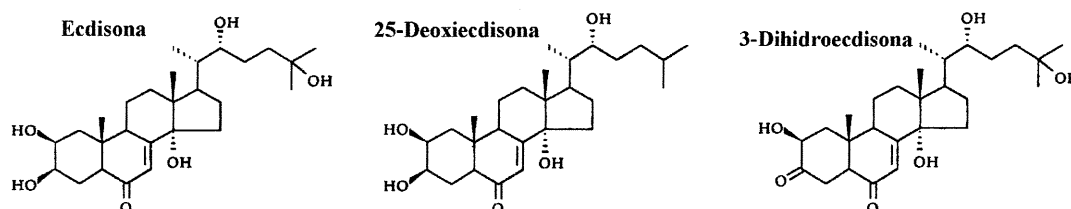


Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais produtos ecdisteróides segregados pelo órgão Y (adaptado de Lachaise *et al.*, 1993).

O órgão Y utiliza o colesterol como precursor da síntese de ecdisteróides. Uma vez que os crustáceos não sintetizam o colesterol, existe a necessidade de utilizar o colesterol dietético presente na hemolinfa. A quantidade de ecdisteróides sintetizada pelo órgão Y está dependente da disponibilidade de colesterol, isto porque as células do órgão Y não conseguem sintetizar o núcleo esteróide ou armazenar o colesterol na forma de éster. O colesterol utilizado encontra-se, na sua totalidade, ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) da hemolinfa. A absorção do complexo colesterol-HDL é mediada pela acção de um receptor membranar (Fig. 8) (Fingerman, 1987; Spaziani *et al.*, 1989; Lachaise *et al.*, 1993). A via metabólica utilizada para a conversão do colesterol em ecdisona apresenta ainda muitas incógnitas, com excepção do 1º (conversão do colesterol a 7-



dihidrocolesterol) e dos três últimos passos (hidroxilações nas posições 25, 22 e 2) (Lachaise *et al.*, 1993). No órgão Y, quer a síntese proteica (produção de ecdisona) quer a entrada e/ou utilização do colesterol são inibidas pela acção da hormona inibidora da muda (MIH). Esta hormona exerce a sua função inibidora através do aumento da concentração do segundo mensageiro AMPc no interior das células-alvo.

### CÉLULA DO ÓRGÃO Y

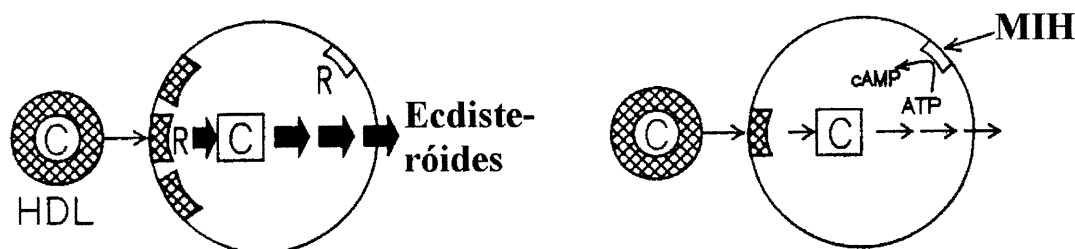


Figura 8: Esquema da utilização do colesterol como precursor da síntese de ecdisteróides pelo órgão Y e sua inibição pela MIH. ATP – adenosina trifosfato; C - colesterol; cAMP – 5'-cíclico adenosina monofosfato; HDL – lipoproteína de alta densidade; MIH – hormona inibidora da muda; R – receptor. (adaptado de Spaziani *et al.*, 1989).

A actividade biossintética destas glândulas relaciona-se com os níveis de ecdisteróides na hemolinfa. Quantidades variáveis de ecdisteróides são segregadas de acordo com a espécie. No caranguejo *Carcinus maenas*, por exemplo, estima-se uma segregação de 5-20 ng/órgão Y/24h (Lachaise *et al.*, 1993).

Após a síntese dos ecdisteróides, o órgão Y (que não tem capacidade de armazenamento) liberta-os para a hemolinfa, onde pelo menos 95% deles circulam na sua forma livre (Fingerman, 1987). Existem três tipos de mecanismos propostos de libertação dos ecdisteróides pelo órgão Y (Fig. 9) (Lachaise *et al.*, 1993):

- 1) difusão simples;
- 2) exocitose de grânulos de secreção (contendo ecdisteróides e proteínas);
- 3) difusão facilitada (ou co-transporte) envolvendo proteínas de membrana.

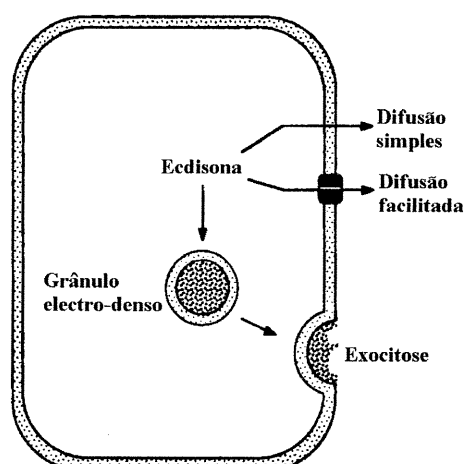


Figura 9: Três processos possíveis de libertação dos ecdisteróides pelo órgão Y (adaptado de Lachaise *et al.*, 1993).

Já em 1990, Birkenbeil demonstrou que a exocitose é um processo utilizado pelo órgão Y para libertar os ecdisteróides (*in* Lachaise *et al.*, 1993). Na exocitose, os grânulos de secreção utilizados para libertar os ecdisteróides apresentam também proteínas, as quais foram interpretadas como sendo proteínas de transporte da ecdisona (à semelhança do que acontece com os esteróides nos vertebrados). No entanto, essa hipótese foi colocada de parte posteriormente. A secreção de ecdisteróides pelo órgão Y através de difusão simples e de difusão facilitada não foi ainda comprovada. O processo de difusão simples está dependente da confirmação da capacidade dos ecdisteróides de atravessarem camadas bilipídicas. Por outro lado, a difusão facilitada, processo utilizado pelas células-alvo para a entrada da hormona da muda activa (20-hidroxiccdisona), pode também ser uma alternativa uma vez que não se descarta a hipótese de um processo idêntico ocorrer na secreção dos ecdisteróides pelo órgão Y (Lachaise *et al.*, 1993).

### ÓRGÃOS MANDIBULARES

O órgão mandibular (MO), é um órgão par situado anteriormente ao órgão Y, na base e lado posterior do músculo adutor mandibular posterior, em posição dorsal aos músculos maxilares. A ultraestrutura do órgão mandibular de diversas espécies de decápodes foi revista por Fingerman (1992). O órgão mandibular é responsável pela produção de compostos terpenóides, o farnezoato de metilo (MF) e o ácido farnesóico. O MF é o precursor da hormona juvenil (JH) dos insectos. Até ao momento não existem

evidências da presença da JH nos crustáceos, no entanto, já foi comprovada a presença de MF (Borst *et al.*, 1987).

Embora a função do MF nos crustáceos ainda não esteja completamente estabelecida, parece ter um papel estimulador no desenvolvimento do ovário e na promoção da vitelogénese (Borst *et al.*, 1987; Fingerman, 1987; Van Herp e Payen, 1991; Fingerman, 1992). A sua influência no ciclo da muda parece indiscutível, tendo sido já demonstrado que o MO apresenta alterações estruturais nas suas células ao longo do ciclo da muda, que a implantação do MO em camarões resulta em intervalos de muda mais curtos e mudas mais frequentes e que na presença de MF existe uma maior produção de ecdisteróides pelo órgão Y (Fingerman, 1987; Chang *et al.*, 1993; Chang, 1995; Rotllant *et al.*, 2000).

### 3) Glândulas Exócrinas

As glândulas exócrinas estão distribuídas por uma grande variedade de locais no interior do corpo dos crustáceos decápodes. Estas glândulas podem fazer parte de outros sistemas, como, por exemplo, o hepatopâncreas, que desenvolve um importante papel na digestão.

As glândulas do tegumento são constituídas por células secretoras e por um ducto que atravessa a cutícula. Estas glândulas estão situadas debaixo da epiderme. As glândulas existentes nos pedúnculos oculares da espécie *Homarus americanus* e nas brânquias da espécie *Palaemonetes pugio* podem ser divididas em dois tipos com base na sua função: um envolvido na osmorregulação e outro no endurecimento da nova carapaça (Fingerman, 1992). As glândulas do tegumento existentes nos pleópodes e urópodes do lavagante *Homarus americanus* poderão estar envolvidas na produção de uma substância necessária para a aderência dos ovos aos pleópodes (Fingerman, 1992).

A entrada de água em grandes quantidades aquando da exuviação deverá ser controlada por ecdisteróides, enquanto que a regulação dos fluxos de água durante a intermuda parece ser controlada por um “factor diurético” proveniente da glândula do seio, ou ainda por dois factores de acções osmorregulatórias antagónicas existentes no cérebro e gânglios torácicos (Fingerman, 1987).

## CRESCIMENTO NOS CRUSTACEA

### 1) O ciclo da muda

Os crustáceos, na sua generalidade, apresentam um exosqueleto rígido que lhes permite regular as perdas de água quando emersos e que serve de protecção aos seus órgãos internos. A presença deste exosqueleto faz com que o crescimento em tamanho dos crustáceos seja descontínuo, pressupondo a necessidade de libertação periódica do exosqueleto. O facto do crescimento em tamanho ser descontínuo não implica que o crescimento tecidual (biomassa) também o seja, pois este ocorre continuamente através da substituição da água por proteínas. Na pré-muda (exosqueleto rígido), as células da epiderme sofrem divisões constantes originando novas células, ficando estas em dobras e pregas até ao momento em que o exosqueleto “velho” é libertado, ocorrendo nessa altura o aumento do tamanho corporal através da entrada de água no corpo do animal (Highnam e Hill, 1977; Pechenik, 1996).

O ciclo da muda é caracterizado pela preparação da libertação do exosqueleto “velho”, a perda deste (exuviação ou ecdisis), o rápido crescimento em tamanho devido à absorção de água e a formação e endurecimento do novo exosqueleto (Fingerman, 1987; Chang, 1991). O ciclo da muda pode ter uma duração e frequência variável. Com base neste facto é possível distinguir dois tipos de ciclo da muda (Adiyodi e Adiyodi, 1970):

- a) Diecdísico – caracterizado pela existência de várias mudas ao longo do ano ou de uma época e no qual a fase de intermuda é muito curta;
- b) Anecdísico – caracteriza-se por uma muda anual, apresentando por isso uma fase de intermuda bastante longa;

Nos ciclos de muda anecdísicos pode-se ainda identificar um tipo específico de ciclo da muda denominado anecdísico terminal ou permanente. Este ciclo é caracterizado pela interrupção do crescimento (deixa de mudar) do caranguejo durante a fase adulta, após atingir uma determinada largura de carapaça (Adiyodi e Adiyodi, 1970). A aneclisis terminal pode ocorrer devido ao animal já ter atingido o tamanho máximo e não ser, por isso, necessário continuar a haver crescimento (Carlisle, 1957). O ciclo da muda apresenta também frequências distintas consoante a espécie, o tamanho e a idade do animal. O caranguejo *Carcinus maenas* apresenta diversas mudas antes e após a maturação sexual,

deixando de se verificar o ciclo da muda cerca de três a quatro anos após atingir o estado adulto (McVean, 1976; Highnam e Hill, 1977).

O processo cíclico de crescimento dos crustáceos é normalmente dividido nos estádios de pós-muda (fase A, subdividida em A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>; fase B, subdividida em B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), de intermuda (fase C, subdividida em C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>) e de pré-muda (fase D, subdividida em D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>) (Fig. 10) (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Drach e Tchernigovtzeff, 1967). O ciclo da muda completa-se num 4<sup>a</sup> estágio denominado por exuviação (ou ecdisis), no qual o animal se liberta do “velho” exosqueleto (Fig. 10) (Lachaise *et al.*, 1993; Pechenik, 1996).

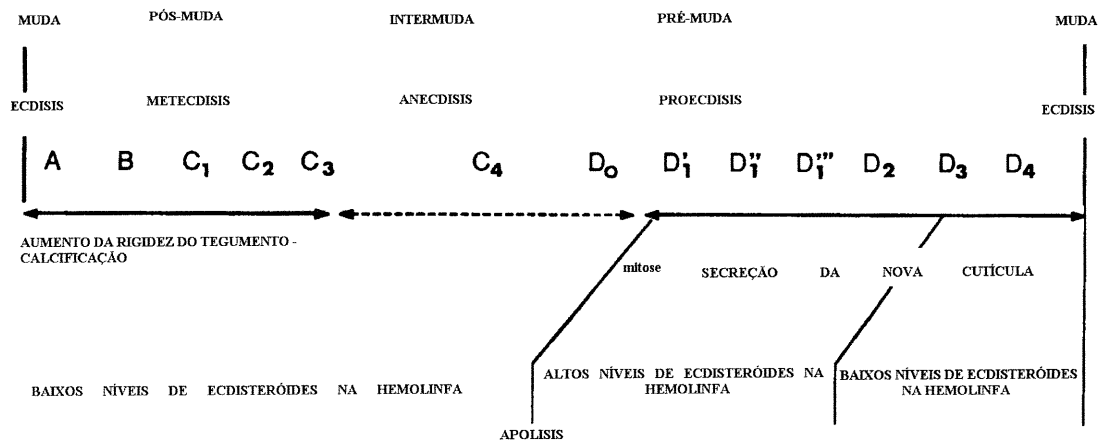


Figura 10: Representação esquemática do ciclo da muda dos Crustáceos e variações dos níveis endógenos de ecdisteróides na hemolinfa (adaptado de Lachaise *et al.*, 1993).

Cada um dos estádios é caracterizado por determinados acontecimentos que tornam possível o desenrolar de todo o ciclo da muda. Os estádios do ciclo da muda caracterizam-se por:

a) **Pré-muda (ou Proecdisis)** – fase em que o caranguejo prepara a libertação do exosqueleto “velho”. No início desta fase as células epidérmicas e o hepatopancreas são activados. As células epidérmicas separam-se da cutícula – apólise - dividem-se e iniciam a segregação do novo exosqueleto (Fig. 11). Ao mesmo tempo, os níveis de cálcio na hemolinfa aumentam devido à utilização das reservas existentes no hepatopancreas e devido à digestão parcial do “velho” exosqueleto (particularmente nos locais pelos quais o

exosqueleto vai abrir para a saída do animal). Na fase terminal desta etapa o animal torna-se inactivo e deixa de se alimentar, recorrendo essencialmente às reservas do hepatopancreas (Highnam e Hill, 1977; Pechenik, 1996).

b) **Exuviação (ou Ecdisis)** – esta etapa caracteriza-se por ser a mais importante e mais curta do ciclo da muda (Chang, 1991). A observação de dois animais da espécie *Carcinus maenas* desde a fase final de D<sub>4</sub> até à exuviação permitiram contabilizar tempos de “muda” de 1h57min e 3h16min (Broekhuysen, 1936). A exuviação ocorre após a separação da cutícula velha da epiderme e da secreção das novas epicutícula e exocutícula (Fig. 11). A exuviação implica uma abertura na parte torácica da carapaça que progressivamente se levanta, abrindo uma fenda pela qual o animal sai do seu “velho” exosqueleto (Kukenthal *et al.*, 1984). Todo o tecido ectodérmico (epicutícula, exocutícula e endocutícula) é mudado na exuviação, incluindo os órgãos respiratórios (brânquias e escafnatites) e a parte anterior do tracto digestivo (esófago, estômago e piloro) (Clemens *et al.*, 1999). Para facilitar a saída do interior do “velho” exosqueleto o animal inicia uma rápida absorção de água através das brânquias, estômago e epiderme, ocorrendo com isso um aumento do volume corporal do animal que está a mudar (Chang, 1991). O mecanismo de absorção de água ainda não é bem conhecido, no entanto, parece que o nível de sais elevado na hemolinfa permite a existência de um gradiente osmótico no qual ocorre a entrada de água. A quantidade de água absorvida pode igualar quase metade do peso do corpo na fase de pré-muda. Esta etapa torna-se extremamente importante devido ao facto da exuviação ser sensível a factores ambientais, tais como a temperatura, o fotoperíodo e outros factores de stress (exemplo: grandes agregados populacionais) (Mattson, 1986; Mattson e Spaziani, 1986a; Koshio *et al.*, 1989; Chang, 1995; Guerin e Stickle, 1997). Para além disso, na exuviação os crustáceos segregam o líquido da muda (composto por aminoácidos, enzimas e outros compostos orgânicos do exosqueleto “velho” parcialmente digerido) que é um forte atractivo para os predadores (Chang, 1991). Tendo em conta todos estes factores e ainda o facto do animal estar mole após a libertação do exosqueleto, a sobrevivência dos crustáceos nesta etapa corre grandes riscos devido à sua incapacidade de se movimentarem e defenderem (Highnam e Hill, 1977; Mattson, 1986; Chang, 1991).

c) **Pós-muda (ou metecdisis)** – inicialmente o animal apresenta-se mole e extensível, continuando a efectuar a absorção de água. Inicia-se a deposição mineral na cutícula. No início desta etapa, o animal continua a não se alimentar compensando esse factor com as

reservas do hepatopaneas. A meio desta etapa ocorre a segregação da endocutícula (Fig. 11) e o animal volta a alimentar-se. O endurecimento da carapaça está dependente do tamanho do animal, da temperatura, do pH e da concentração de cálcio na água, tendo Broekhuysen (1936) registado que são necessários 3 a 6 dias (*Carcinus maenas*, largura de carapaça 17-56mm, temperatura 16°C) para endurecer a carapaça. O crescimento tecidular ocorre, em grande parte, através da substituição da água por proteínas, registando-se uma duplicação do peso seco dos tecidos que vão perdendo água proporcionalmente (Highnam e Hill, 1977).

d) **Intermuda (ou anecdisis)** – nesta etapa, com o finalizar da formação do novo exosqueleto, o animal efectua armazenamento de metabolitos em excesso. Estes metabolitos são normalmente armazenados no hepatopaneas, sendo constituídos na sua maioria por lípidos, podendo ocorrer o armazenamento de glicogénio e proteínas em pequenas quantidades (Highnam e Hill, 1977). Durante toda esta etapa continua a ocorrer o crescimento tecidular através da substituição de água (Highnam e Hill, 1977; Chang, 1991).

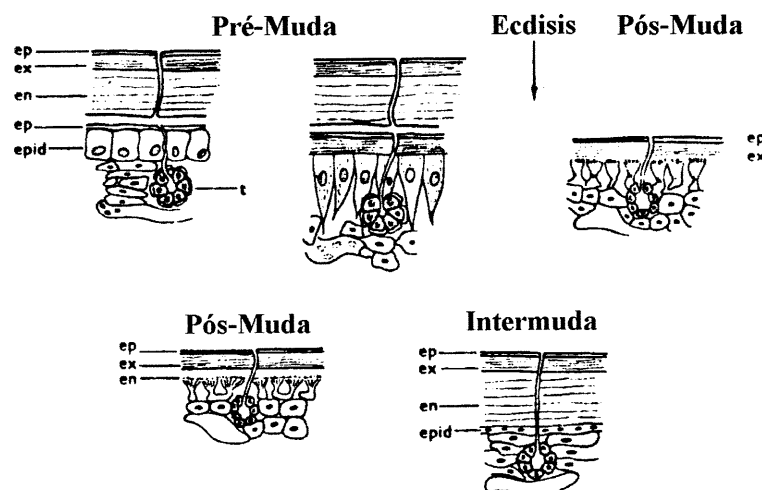


Figura 11: Estrutura do tegumento de um crustáceo nas diferentes fases do ciclo da muda. Na pré-muda as células da epiderme aumentam de tamanho, separam-se da velha carapaça (apólise) e segregam a nova epicutícula. Depois da muda (exuviação), fica completa a formação da exocutícula e é iniciada a produção da endocutícula que fica completa no início da intermuda. En - endocutícula; ep – epicutícula; ex - exocutícula; epid - epiderme; t - glândula do tegumento. (adaptado de Highnam e Hill, 1977).

O ciclo da muda, como é perceptível pelo que foi descrito anteriormente, é um dos grandes acontecimentos metabólicos dos crustáceos, envolvendo uma mobilização cíclica das reservas orgânicas para as células epidérmicas e diversas alterações nos mais diversos órgãos. As alterações bioquímicas e fisiológicas provocadas nos diversos órgãos dos crustáceos decápodes durante o ciclo da muda foram revistas por Chang (1995).

## 2) Hormonas da muda – Ecdisteróides

As hormonas da muda são denominadas ecdisteróides devido à semelhança da sua estrutura química com a dos esteróides, constituindo a família dos esteróides polihidroxiados C<sub>27</sub> (Chang, 1991; Lachaise *et al.*, 1993). Os ecdisteróides são caracterizados por serem solúveis em água, não tendo sido ainda provado se possuem ou não a capacidade de ultrapassar camadas bilipídicas. Nos invertebrados, ao contrário do que se verifica com os esteróides dos vertebrados, os ecdisteróides circulantes na hemolinfa ocorrem maioritariamente na sua forma livre (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993). Os ecdisteróides, para além de serem essenciais no processo do ciclo da muda, exercem também um papel fundamental no endurecimento da carapaça, nas modificações da cor, na regeneração e maturação da gónada, na estimulação do ovário, na síntese proteica e na produção de vitelogenina (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993; Pechenik, 1996).

A denominada hormona da muda (MH) – a ecdisona (2 $\beta$ , 3 $\beta$ , 14 $\beta$ , 22R, 25-pentahidroxi - 5 $\beta$  - coles - 7 - em - 6 - ona, também conhecida por  $\alpha$ -ecdisona) - é um dos ecdisteróides sintetizado pelo órgão Y (Fig. 5). Até ao momento, os dados existentes indicam que a libertação da hormona da muda pelo órgão Y ocorre por exocitose de grânulos de secreção. A ecdisona é a precursora da hormona da muda activa denominada de 20-hidroxiecdisona (20-OHE) (ou crustecdisona,  $\beta$ -ecdisona, ecdisterona). A transformação da ecdisona em 20-OHE é efectuada através de uma hidroxilação realizada na hemolinfa, nas mitocôndrias e/ou nos microssomas dos tecidos periféricos (células epidérmicas) (Chang, 1993; Lachaise *et al.*, 1993). As variações nos níveis circulantes da hormona activa (20-OHE) parecem ser devidas a alterações na taxa de síntese e secreção de ecdisona pelo órgão Y, mais do que pela taxa de hidroxilação da ecdisona a 20-OHE ou ainda pela taxa de degradação e depuração da hormona na hemolinfa (Chang, 1991).



A função da hormona da muda activa (20-OHE) é estimular a preparação da exuvia através da activação das células epidérmicas e do hepatopancreas. Enquanto as células epidérmicas se separam da cutícula externa (apólise) para permitir a libertação do exosqueleto, o hepatopancreas funciona como fonte de reserva energética. Para além disso, a 20-OHE possui ainda a capacidade de inibir a libertação (não a síntese) da hormona inibidora da muda, actuando directamente nas células neuro-secretoras do órgão X ou através da inibição do controlo serotoninérgico de libertação da hormona inibidora da muda pela glândula do seio (Hopkins, 1992; Spaziani *et al.*, 1994).

A ponasterona A é um ecdisteróide que foi identificado na hemolinfa de três espécies de caranguejos, *Callinectes sapidus*, *Carcinus maenas* e *Gecarcinus lateralis* (Lachaise e Lafont, 1984). O aumento da concentração da ponasterona A na hemolinfa, na pré-muda de *Gecarcinus lateralis* e nos ovários de *Carcinus maenas* durante a sua maturação, demonstra a sua influência em dois dos processos mais relevantes dos crustáceos – o crescimento e a reprodução. Nos ovos de caranguejo constatou-se que a ponasterona A era o ecdisteróide principal, particularmente no final do desenvolvimento embrionário (Lachaise e Lafont, 1984).

### 3) Hormona inibidora da muda

Em 1965, Rao mostrou que um neuropéptido, isolado dos pedúnculos oculares, possuía acção inibidora da muda e, mais recentemente, Soumoff e O'Connor (1982) mostraram que a secreção da ecdisona é inibida aquando da injeção de extracto de “glândulas do seio”, glândulas que se localizam nos pedúnculos oculares (*in* Lachaise *et al.*, 1993). Por sua vez, Webster (1986) isolou do pedúnculo ocular de *Carcinus maenas* uma substância termicamente estável que inibia a secreção dos ecdisteróides pelo órgão Y incubados “*in vitro*”.

A hormona inibidora da muda (MIH) é um neuropéptido produzido nos neurónios do órgão X e armazenado na glândula do seio (Mattson, 1986; Chang *et al.*, 1991). Em 1985, descobriu-se que a MIH era estrutural e funcionalmente semelhante aos péptidos neuro-hipofisiais dos vertebrados (vasopressina lisina, vasopressina arginina, vasotocina, oxitocina) e que estes possuem a capacidade de inibirem a produção da hormona da muda (ecdisona) pelo órgão Y (Fingerman, 1987; Mattson, 1986). Mattson (1986), após estudos com *Cancer magister*, demonstrou que a MIH é um neuropéptido com um peso molecular

entre 1000 e 3500 daltons, indicando Webster (1986) um peso molecular entre 6000 e 14000 daltons para a MIH de *Carcinus maenas*. Este neuropéptido, pertence a uma família de neuropéptidos dos crustáceos caracterizada por sequências de 72-78 aminoácidos e 6 cisteínas, caracterizando-se por ser sensível à tripsina e estável ao calor (Lachaise *et al.*, 1993; Webster, 1986).

Após a sua libertação da glândula do seio, a acção da MIH pode ser directa, inibindo a síntese/segregação de ecdisteróides pelo órgão Y (Fig. 12), ou indirecta, agindo antagonicamente na epiderme e regulando a resposta deste tecido à hormona da muda (Mattson e Spaziani, 1986b; Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993; Pechenik, 1996). Os locais de acção da MIH foram comprovados após a identificação e caracterização de receptores da MIH no órgão Y e, em menor número, nas células epidérmicas do caranguejo *Carcinus maenas* (Lachaise *et al.*, 1993). O AMPc (adenosina monofosfato cíclica) é o segundo mensageiro utilizado pela MIH para induzir a supressão da síntese de ecdisteróides. No órgão Y, a acção da MIH traduz-se no aumento do AMPc que inibe quer a entrada quer a utilização do colesterol, assim como a síntese proteica (Fig. 12) (Mattson, 1986; Mattson e Spaziani, 1986b; Chang *et al.*, 1991).

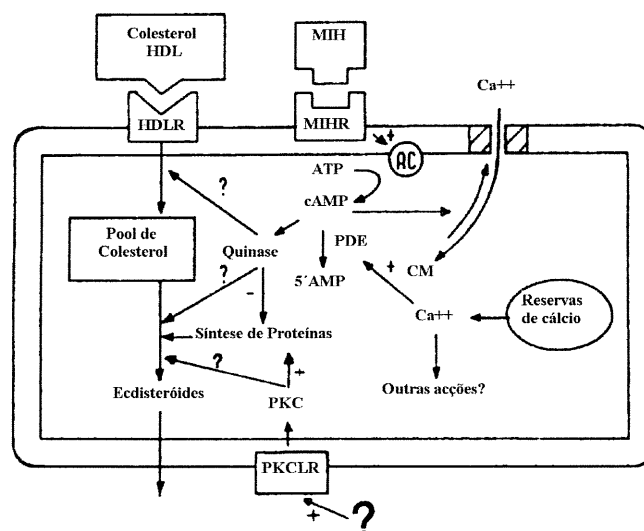


Figura 12: Esquema representativo da acção da MIH sobre a produção de ecdisteróides no órgão Y dos crustáceos. O colesterol circula na hemolinfa ligado a uma lipoproteína de alta densidade (HDL), formando um complexo que possui um receptor (HDLR) na membrana plasmática. A ligação da hormona inibidora da muda (MIH) a receptores celulares (MIHR) leva à activação do adenilato ciclase (AC) e à produção de AMPc. O  $Ca^{2+}$  mobilizado de fontes intra e extracelular estimula a AMPC-fosfodiesterase (PDE), um processo mediado pela calmodulina (CM), e os níveis de AMPc diminuem aumentando a ecdisteroidogénese. A MIH aumenta o efluxo de  $Ca^{2+}$  que reduz o  $Ca^{2+}$  citosólico e estimula a acumulação do AMPc. A activação da proteína quinase C (PKC) por sinais extracelulares através de receptores membranares (PKCLR) leva ao aumento da síntese de ecdisteróides (adaptado de Mattson, 1986).

#### 4) Interação hormonal no controlo do ciclo da muda

Em resumo, o processo de crescimento nos crustáceos é regulado por um conjunto de hormonas, das quais se destacam a hormona da muda (MH) e a hormona inibidora da muda (MIH). A MH é sintetizada no órgão Y enquanto que MIH é produzida e armazenada no complexo glândula do seio - órgão X. Embora o processo de muda seja influenciado por vários factores distintos, as interações entre estas hormonas e estes órgãos são primordiais para a estimulação ou inibição deste processo (Highnam e Hill, 1977; Fingerman, 1987; Chang, 1991; Lachaise *et al.*, 1993; Pechenik, 1996).

A ecdisona é sintetizada no órgão Y a partir do colesterol e é libertada na hemolinfa, onde circula livremente sendo transformada pelos tecidos periféricos na denominada hormona da muda activa – 20-hidroxiecdisona (20-OHE) - através de uma hidroxilação. A 20-OHE vai actuar sobre os tecidos epidérmicos e sobre o hepatopaneas induzindo a preparação da exuviação. Existe ainda a hipótese da 20-OHE actuar sobre a glândula do seio de forma a inibir a libertação da MIH. Para exercer a sua função, a 20-OHE é incorporada nas células-alvo através de um processo de difusão facilitada (co-transporte) que envolve a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, sugerindo desta forma um co-transporte com iões  $\text{Na}^+$  (idêntico ao que ocorre com a glucose e os aminoácidos) (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993).

A estimulação da muda pela 20-OHE pode ser contrariada pela acção da MIH. A MIH, hormona produzida e armazenada no complexo glândula do seio - órgão X, quando em concentrações elevadas na hemolinfa exerce um efeito inibidor sobre o ciclo da muda. Esta hormona actua sobre o órgão Y inibindo a síntese/libertação dos ecdisteróides e também sobre os tecidos epidérmicos antagonizando com a 20-OHE. No órgão Y a actuação desta hormona envolve um aumento da concentração do segundo mensageiro AMPc no interior das células-alvo, o qual inibe quer a entrada quer a utilização de colesterol, assim como a síntese proteica (Fig. 13) (Mattson e Spaziani, 1986b; Lachaise *et al.*, 1993).

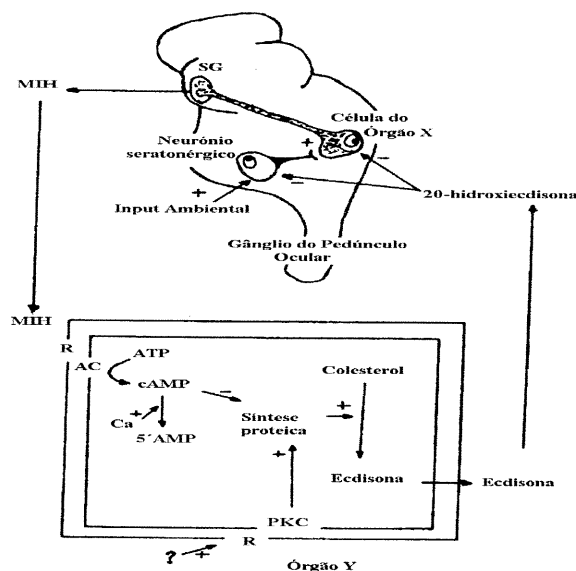


Figura 13: Interação hormonal entre o complexo órgão X – glândula do seio e o órgão Y. Factores ambientais activam os neurónios seratonérgicos estimulando as células neuro-secretórias do complexo órgão X – glândula do seio (SG) a libertar MIH. A MIH na hemolinfa liga-se a receptores (R) celulares do órgão Y resultando na activação do adenilato ciclase (AC) e produção de AMPc. O AMPc inibe a produção de ecdisona. O  $\text{Ca}^{2+}$  antagoniza com o AMPc por activação da AMPc-fosfodiesterase. A redução da libertação de MIH, estimula o órgão Y através do  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou pela proteína quinase C (PKC), aumentando a ecdisteroidogénese. A 20-hidroxicdisona exerce um “feedback” negativo na libertação da MIH pelas células da SG (adaptado de Mattson, 1986).

A concentração dos ecdisteróides na hemolinfa, ao longo do ciclo da muda, sofre variações diversas, variando o perfil final de espécie para espécie. Assim, na transição entre a intermuda e a pré-muda há um ou mais aumentos ligeiros da concentração destas hormonas na hemolinfa, registando-se níveis superiores (3 a 10 vezes) aos da intermuda. Em seguida, no final da pré-muda, ocorre uma subida dramática (100 a 300 vezes) que precede e presumivelmente inicia a exuviação. Mesmo antes da exuviação a concentração de ecdisteróides diminui para níveis muito baixos. Na transição entre a pós-muda e a intermuda os níveis dos ecdisteróides são progressivamente repostos aos níveis habituais da intermuda (Mattson, 1986; Chang, 1991; Chang *et al.*, 1993). De igual forma, o perfil de ecdisona na hemolinfa do caranguejo *Carcinus maenas*, ao longo do ciclo da muda, permite identificar dois períodos principais. Da exuviação até ao final da intermuda os níveis de ecdisona são baixos, registando-se aumentos bastante significativos durante as fases de pré-muda ( $D_0$  a  $D_4$ ). Salienta-se que na fase  $D_3$  os níveis de ecdisona atingem valores cerca de cento e cinquenta vezes superiores aos registados nas fases de intermuda (Fig. 14) (Andrieux *et al.*, 1976).

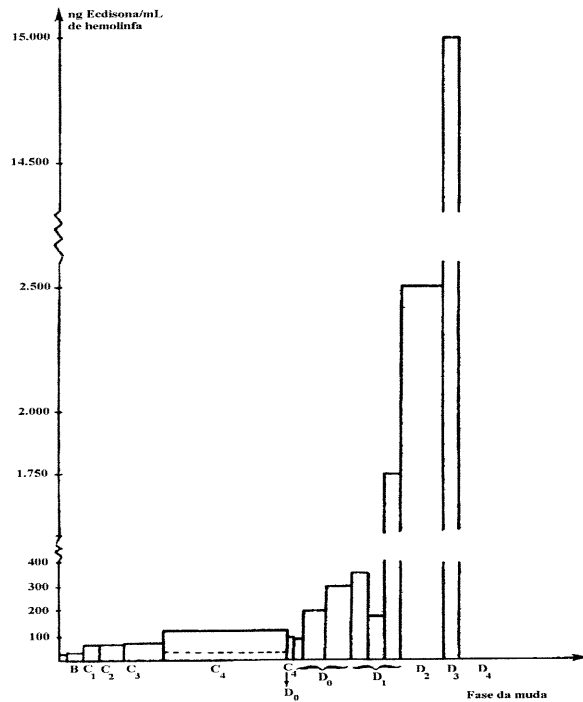


Figura 14: Gráfico dos níveis de ecdisona na hemolinfa, ao longo das diferentes fases do ciclo da muda, do caranguejo *Carcinus maenas* (adaptado de Andrieux *et al.*, 1976).

### 5) Sincronismo hormonal entre o crescimento e a reprodução

O crescimento e a reprodução são dois dos processos biológicos mais importantes dos crustáceos, ocorrendo ambos de forma cíclica. Estudos de endocrinologia do crescimento e da reprodução forneceram evidências da regulação destes dois processos através de um sistema endócrino complexo (revisões por Hasegawa *et al.*, 1993 e Hartnoll, 2001). Desta forma, embora separados no tempo, estes dois processos biológicos estão intimamente relacionados a nível hormonal. Para além disso, ambos os processos envolvem a mobilização de grandes quantidades de reservas orgânicas, sendo que na reprodução essa mobilização se faz para os ovários e no crescimento para os tecidos epidérmicos.

Os vários exemplos de sincronismo entre o ciclo da muda e a reprodução sugerem a possibilidade de que os mecanismos hormonais neles envolvidos sejam os mesmos (em que a hormona inibidora da muda (MIH) e a hormona inibidora da gónada (GIH) representam a mesma hormona) ou que, sendo diferentes, actuam sinergeticamente (Adiyodi e Adiyodi, 1970). De facto, o ciclo da muda é mais longo durante a época reprodutiva do que durante a época de repouso, uma vez que a vitelogenese prolonga o

ciclo (Meusy e Payen, 1988). Ambas as hormonas inibidoras (MIH e GIH) são produzidas e armazenadas no complexo órgão X- glândula do seio (Adiyodi e Adiyodi, 1970; Fingerman, 1997).

Entre os decápodes podem ser distinguidos dois tipos de ciclos de muda: o diecdísico (intermuda curta) e o anecdísico (intermuda longa), considerando-se ainda neste último o anecdísico terminal ou permanente (cessa o ciclo da muda) (ver pág. 32). A continuação do processo reprodutivo nas espécies em anecdisis terminal, ou de várias desovas durante a mesma intermuda que é nesse caso prolongada, constituem um forte argumento para a distinção das duas hormonas inibidoras (MIH e GIH), as quais podem, consoante a fase do ciclo da muda, agir antagónica ou sinergeticamente. O sinergismo aparente da MIH e da GIH, característico da pós-muda, é transformado num antagonismo durante a intermuda, dada a necessária mobilização das reservas metabólicas para o ovário, que se sobrepõe temporariamente ao crescimento tecidular (Fig. 14). De facto, um elevado nível de MIH é essencial para a reprodução, inibindo o funcionamento do órgão Y. Considerando o crescimento dos ovócitos em duas fases, em que na primeira o ovócito cresce até ser capaz de acumular vitelo e na segunda o vitelo é depositado, o controlo por inibição da GIH parece exercer-se apenas na segunda fase, sendo a primeira controlada positivamente pela MH (Adiyodi e Adiyodi, 1970). A possibilidade dos ecdisteróides estarem envolvidos na vitelogénese foi reforçada devido ao isolamento de concentrações relativamente elevadas destes compostos em ovários (Lachaise *et al.*, 1981; Carvalho, 1997), tendo já sido descritas alterações nos níveis de ecdisteróides durante a embriogénese em diferentes espécies de crustáceos (revisão por Chang, 1989). Por exemplo, estudos com o caranguejo *Cancer anthonyi* demonstraram a existência de níveis elevados de ecdisteróides após a fertilização, diminuindo progressivamente até à postura (Chang, 1991). Estes valores são contrários aos níveis de ecdisteróides registados na hemolinfa das fêmeas desta espécie ao longo da embriogénese. Com este estudo, Chang (1991) coloca a hipótese dos ecdisteróides maternos circulantes promoverem a vitelogénese e/ou servirem de reserva para a desova seguinte. Para além disso, o decréscimo dos ecdisteróides maternos na hemolinfa durante o período “entre desovas” poderá reflectir a remoção da hormona da muda da hemolinfa e sendo esta armazenada nos ovos em desenvolvimento (Chang, 1991). Estudos com *Penaeus japonicus* e *P. kerathurus* permitiram verificar a existência de baixos níveis de ecdisteróides totais nos ovários, desde

a previtelogénese até à maturação, aumentando bruscamente na desova (Carvalho, 1997). Na reprodução, e mais concretamente na ovogénese, os ecdisteróides parecem ser necessários para a multiplicação mitótica nas gónadas (Adiyodi e Adiyodi, 1970), ainda que os níveis envolvidos sejam diminutos (Meusy e Payen, 1988). Para além disso, já foi sugerido que os ecdisteróides circulantes podem exercer um papel na regeneração e na maturação da gónada (Adiyodi e Adiyodi, 1970), assim como de estimulação do desenvolvimento do ovário, da síntese proteica e da produção de vitelogenina (Fingerman, 1987; Van Herp e Payen, 1991; Hasegawa *et al.*, 1993). A reiniciação meiótica na maturação do ovócito é a evidência mais forte de uma função directa dos ecdisteróides na reprodução (Lanot e Clédon, 1989).

Em conclusão, o crescimento e a reprodução, como processos inseparáveis e integrados, necessitam de um mecanismo de controlo estreitamente interligado. Este mecanismo consiste na transformação do sinergismo entre a MIH e a GIH, como acontece na pós-muda, para um antagonismo durante a intermuda, possibilitando o desenrolar do processo reprodutivo. A muda é desencadeada quando os níveis de MIH e GSH são baixos e os níveis de GIH e MH são elevados. Por outro lado, o processo reprodutivo é iniciado quando os níveis das hormonas MIH e GSH são elevados e os níveis de GIH e MH são baixos (Fig. 15) (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

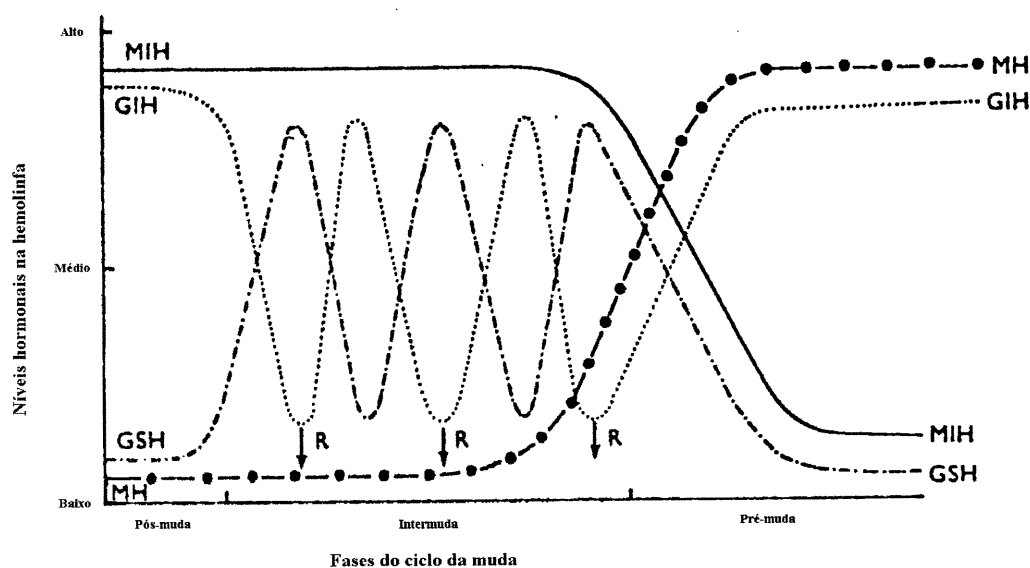


Figura 15: Gráfico mostrando as relações entre a MIH e a MH e entre a GIH e a GSH na reprodução (setas pretas) durante o ciclo da muda (adaptado de Adiyodi e Adiyodi, 1970).

## 6) Factores que influenciam o ciclo da muda

Como já foi descrito anteriormente, o ciclo da muda está directamente dependente da acção de duas hormonas, a da muda (MH) e a inibidora da muda (MIH). O sistema hormonal que controla o crescimento dos crustáceos pode ser alterado através da ablação dos pedúnculos oculares (remoção do complexo órgão X – glândula do seio onde é produzida e armazenada a MIH) ou através da autotomização de patas locomotoras (necessidade de regenerar a(s) pata(s) perdida(s)). No entanto, existem outros factores que permitem estimular ou inibir o normal desencadear do ciclo da muda. Esses factores podem ser divididos em factores ambientais (temperatura, salinidade, hipoxia), biológicos (*Sacculina carcini*) ou químicos (farnezoato de metilo, ácido xanturénico, 5-hidroxitriptamina, dimetil- $\beta$ -propritenina, dimetilacetotenina e fenoxicarbe).

### 6.1.) Ablação dos pedúnculos oculares (PO)

A remoção dos pedúnculos oculares (PO) nos crustáceos permite influenciar quer positiva quer negativamente o desenrolar do ciclo da muda, consoante a fase da muda em que se encontra o animal e conforme a altura do ano em que se realiza a experiência (Fingerman, 1987). Vários autores já comprovaram que a ablação dos PO diminui a duração de um ou mais estádios do ciclo da muda (pós-muda, intermuda e pré-muda) e, conseqüentemente, a duração global deste. No entanto, a aceleração da muda após ablação dos PO não é sistematicamente observada: a) não ocorre quando a fêmea está em vitelogénese avançada; b) durante anecdisis terminal; c) durante a pausa para hibernação; d) quando o animal está parasitado com *Sacculina carcini* (Lachaise *et al.*, 1993; O'Brien, 1999). Alterações no ciclo da muda devido à ablação dos PO já foram observadas em *Carcinus maenas* e *Gecarcinus lateralis* (Skinner e Graham, 1972), *Uca pugilator* (Fingerman e Fingerman, 1974), *Paralithodes camtschatica* (Molyneaux e Shirley, 1988), *Penaeus semisulcatus* (Browdy e Samocha, 1985), *Penaeus vannamei* (Chan *et al.*, 1990), *Penaeus chinensis* (Chu e Leong, 1991) e *Homarus americanus* (Chang e Bruce, 1980; Koshio *et al.*, 1989). A indução da muda ocorre devido à remoção do complexo órgão X - glândula do seio, responsável pela síntese e libertação da MIH e que se localiza nos PO. A diminuição dos níveis circulantes de MIH resulta num aumento da síntese da ecdisona e, conseqüentemente, da disponibilidade de hormona da muda activa (20-OHE). O aumento



dos níveis de 20-OHE na hemolinfa resultam numa estimulação do hepatopâncreas e das células epidérmicas, induzindo desta forma a preparação da exuviação.

### **6.2.) Autotomização de patas locomotoras e/ou pinças**

A autotomização de patas locomotoras (PL) e/ou pinças é um processo que pode influenciar o ciclo da muda dos crustáceos decápodes. A influência positiva ou negativa deste factor depende do número de patas autotomizadas, da fase da muda em que o animal se encontra e da altura do ano em que é realizada a experiência (Fingerman e Fingerman, 1974; Smith, 1990; Chu e Leong, 1991). A autotomização é um processo caracterizado pela libertação voluntária de qualquer uma das PL ou pinças danificadas por uma situação de stress (exemplo: durante uma luta) (Chu e Leong, 1991). A regeneração da(s) pata(s) autotomizada(s) ocorre durante o estágio de intermuda (McVean, 1976). No entanto, para que a regeneração ocorra na sua totalidade, o animal tem que mudar de carapaça para que haja a expansão do broto regenerativo imediatamente após a exuviação (McVean, 1976). Alterações do ciclo da muda devido à autotomização de PL e/ou pinças, processo que apresenta um valor adaptativo extremamente importante para o animal, já foram observadas em *Carcinus maenas* e *Gecarcinus lateralis* (Skinner e Graham, 1972), *Uca pugilator* (Fingerman e Fingerman, 1974; Hopkins, 1993), *Callinectes sapidus* (Smith, 1990), *Pilumnus hirtellus* (Demeusy et al., 1994) e *Penaeus chinensis* (Chu e Leong, 1991).

### **6.3.) Factores ambientais**

A acção de vários factores ambientais sobre o ciclo da muda já foi comprovado por diversos autores. Assim, sabe-se que a temperatura, a salinidade, o fotoperíodo, a disponibilidade de alimento, os agregados populacionais e as marés podem exercer influência sobre o ciclo da muda (Chang, 1995). Nos crustáceos, o aumento de tamanho é um processo cíclico, ocorrendo um aumento brusco da largura e peso do animal em cada uma das sucessivas mudas. Desta forma, os factores ambientais que afectam a taxa de crescimento podem fazê-lo alterando o incremento de tamanho por muda e/ou a frequência da muda (Chittleborough, 1975).

Normalmente, os crustáceos apresentam um aumento quer da frequência de mudas quer do incremento de tamanho por muda quando a temperaturas mais elevadas, no entanto aumentos excessivos de temperatura podem provocar resultados inversos (Chittleborough,

1975; Koshio *et al.*, 1989; Justo *et al.*, 1991). Como exemplo da influência da temperatura no crescimento dos crustáceos, temos os estudos com o lavagante *Homarus americanus* onde se demonstrou que a temperatura alterou a frequência de muda e o peso dos animais. Estes animais evidenciaram um crescimento mais rápido à temperatura de 20°C em comparação com a temperatura de 15°C (Koshio *et al.*, 1989). De igual forma, estudos com a lagosta *Panulirus longipes* apresentaram incrementos por muda bastante superiores a temperaturas de 20°C, sendo que esse incremento diminuiu à medida que a temperatura foi aumentando. No que diz respeito à frequência de muda de *Panulirus longipes*, constatou-se que 26°C foi a temperatura em que se verificou uma maior frequência de muda, logo uma diminuição do período de intermuda (Chittleborough, 1975). Por sua vez, a espécie *Macrobrachium rosenbergii* apresenta uma estimulação do ciclo da muda a temperaturas mais elevadas (28-32°C) (Justo *et al.*, 1991).

A salinidade interferiu com o ciclo da muda de duas espécies de caranguejo, *Callinectes sapidus* e *C. similis*, as quais quando expostas a salinidades de 30‰ e 10‰, respectivamente, sofreram uma indução da muda (redução do período de intermuda). Comparativamente, em meio natural, a espécie *C. sapidus* está presente em locais com salinidades bastante variadas (entre 0 a 25‰), embora mostre preferência por salinidades baixas, enquanto *C. similis* habita em locais com salinidades superiores a 15‰ (Guerin e Stickle, 1997). Contrariamente a estas duas espécies, o lavagante *Homarus americanus* não apresentou qualquer tipo de influência da salinidade no ciclo da muda (Koshio *et al.*, 1989).

Um estudo com a espécie *Macrobrachium rosenbergii* permitiu observar ligeiras influências do fotoperíodo na duração dos intervalos (intermuda) entre a muda reprodutiva e a muda comum (para crescimento) (Justo *et al.*, 1991). Este mesmo autor afirma também que o crescimento desta espécie está relacionado com a interação entre o fotoperíodo e a temperatura, concluindo que a duração do intervalo entre duas mudas reprodutivas é reduzido significativamente quando os animais estão sujeitos a temperaturas elevadas e um fotoperíodo de 12L12D (L-luz; D-escuro) (Justo *et al.*, 1991). Por sua vez, Chittleborough (1975) constatou que as lagostas *Panulirus longipes* vêm a sua frequência de muda diminuir significativamente quando colocadas em permanente escuridão relativamente a fotoperíodos cíclicos de 12 e 6 horas. Finalmente, um estudo com a espécie *Penaeus*

*japonicus* não apresentou qualquer influência do fotoperíodo no ciclo da muda (Nakamura, 1988).

O fornecimento contínuo de alimento aos crustáceos permite-lhes mudarem mais frequentemente, como foi exemplificado pela espécie *Panulirus longipes* em que animais sujeitos a uma alimentação diária apresentaram um período de intermuda menor do que os animais que foram alimentados uma vez por semana e os que o foram três vezes por semana. Para além disso, constatou-se ainda que o incremento de tamanho por muda é inferior nos animais que foram alimentados apenas uma vez por semana (Chittleborough, 1975). Os agregados populacionais também afectam a frequência da muda, realçando-se o facto de já ter sido verificado quer uma diminuição (Chittleborough, 1975 - *Panulirus longipes*) quer um aumento (Skinner e Graham, 1972 - *Gecarcinus lateralis*) do período de intermuda.

Em 1945, Nouvel efectuou um estudo utilizando a espécie *Palaemon serratus* de forma a determinar a possível influência do ciclo lunar no ciclo da muda. Este autor verificou que ao longo do ciclo lunar ocorrem dois picos no número de mudas, coincidindo estes picos com períodos anteriores ao Quarto Crescente e ao Quarto Minguante. Para além disso, também verificou que estes picos de mudas coincidiam com marés vivas, avançando o autor que provavelmente este seria um factor (marés) com capacidade de influenciar o ciclo da muda dos crustáceos marinhos (Nouvel, 1945). Confirmando esta informação, um estudo recente com juvenis de *Carcinus maenas* permitiu constatar que estes animais apresentam elevados números de mudas aquando da preia-mar, nomeadamente aquando das marés vivas. No entanto, salienta-se que estes dados foram obtidos com os animais em laboratório e em condições controladas (temperatura, salinidade e fotoperíodo) tendo-se capturado os animais em alturas específicas do ciclo de marés para registo do número de mudas (Zeng *et al.*, 1999).

Algumas espécies intertidais, como por exemplo *Carcinus maenas*, apresentam adaptações estruturais e fisiológicas que lhes permitem resistir a longos períodos de exposição ao ar (Taylor e Butler, 1978; Johnson e Uglow, 1985). A exposição ao ar é responsável pela ocorrência dos fenómenos de hipoxia (baixos níveis de oxigénio) e hipercápnia (elevados níveis de dióxido de carbono) no interior do animal (Taylor e Whiteley, 1989). O estudo das respostas dos invertebrados a fenómenos de hipoxia ambiental foi revista por Herreid (1980). A importância da disponibilidade de oxigénio no

momento da exuviação é demonstrado por Chittleborough (1975) para a espécie *Panulirus longipes*, sendo que uma concentração mais baixa de oxigénio (saturação de 60-70%) diminui o incremento de tamanho por muda. Clark (1986) constatou que a espécie *Penaeus semisulcatus* quando submetida a baixos níveis de oxigénio – hipoxia – não realiza a exuviação e apresenta uma elevada mortalidade. Após o aumento dos níveis de oxigénio para valores normais, o mesmo autor registou que a taxa de mortalidade diminuía e ocorria um considerável número de mudas. Tendo em conta estes dados, Clark (1986) avança a hipótese de que os animais em condições adversas (hipoxia) não realizam a exuviação, estabilizando numa fase do ciclo da muda que lhes permite mudar assim que as condições sejam favoráveis. De igual forma, um estudo efectuado com *Palaemon serratus* permitiu observar um elevado número de mudas após uma emersão prolongada. Esta emersão resulta numa acidose respiratória (aumento da concentração de CO<sub>2</sub>) e consequente diminuição do pH na hemolinfa, fenómeno semelhante ao que ocorre no início da pré-muda (fase D<sub>0</sub>). O momento da exuviação coincide também com uma acentuada acidose, levantando a hipótese da produção de ácido poder preceder ou mediar a acção hormonal que conduz à muda (Coimbra *et al.*, 1985). Em sequência, um trabalho realizado com as espécies *Palaemon serratus* e *Palaemonetes varians*, permitiu observar um elevado número de mudas induzidas após algumas horas de emersão. Tendo em conta estas observações, os autores deste trabalho avançam igualmente com a hipótese de uma variação do equilíbrio ácido-base ser por si só suficiente para desencadear os factores hormonais necessários para antecipar a exuviação (Carvalho *et al.*, 1989). Para além disso, estes mesmos autores verificaram que a emersão provocou uma “sincronização” do ciclo da muda dos diversos animais, isto é, a emersão provocou a inibição da muda em alguns dos animais e a indução noutros, fazendo com que após a imersão ocorressem uma série de mudas simultaneamente (Carvalho *et al.*, 1989).

#### **6.4.) Factores biológicos - *Sacculina carcini***

O ciclo da muda pode ser inibido quando o animal se encontra parasitado pela *Sacculina carcini*. O género *Sacculina* pertence aos rizocéfalos, uma ordem de cirrípedes que parasitam decápodes e outros Crustacea. Estes parasitas caracterizam-se pela formação de ramificações tecidulares que invadem os órgãos do hospedeiro. Nesta fase do desenvolvimento os rizocéfalos mantêm-se no interior do hospedeiro, período durante o

qual o hospedeiro continua a realizar a exuvia normalmente. Numa determinada fase do desenvolvimento do parasita, uma massa visceral interna emerge do abdómen do hospedeiro, ocorrendo com isso a inibição do seu ciclo da muda (O'Brien,1999). Os parasitas rizocéfalos "sacculinídeos" podem induzir uma série de alterações no hospedeiro das quais se destacam as seguintes (O'Brien,1999): a) castração parasítica (gónadas do hospedeiro não atingem a maturação); b) maturação precoce; c) feminização dos machos (adquirem o típico abdómen largo das fêmeas) e hiperfeminização das fêmeas; d) aneclisis parasítica (o caranguejo com o parasita visível externamente não efectua a ecdisis, mantendo-se na intermuda).

Como foi referido, salienta-se o facto da ecdisis apenas ser inibida quando o parasita já é visível externamente. Andrieux *et al.* (1981) realizaram experiências com *Carcinus maenas* parasitados e não parasitados por *Sacculina carcini* de forma a determinar se havia diferenças significativas nos níveis de ecdisteróides. Os autores avançam com três hipóteses para explicar a inibição da muda após a externalização do parasita (Andrieux *et al.*, 1981):

1. É possível que o produto identificado como 20-hidroxiecdisona possa ser um isómero que poderá ser modificado pelo parasita tornando-o inactivo. Uma vez que não consegue exercer a sua função, o composto permaneceria nos tecidos onde deveria actuar, justificando os elevados valores de 20-hidroxiecdisona na epiderme.
2. É possível que ocorra uma inactivação enzimática por acção do parasita.
3. É possível que o parasita exerça a sua acção inibidora por via nervosa.

#### **6.5.) Factores químicos**

Diversos estudos realizados constataram que existem alguns compostos químicos (farnezoato de metilo (MF), ácido xanturénico (XA) e 5-hidroxitriptamina (5-HT)) produzidos e armazenados no organismo dos crustáceos e outros (dimetil- $\beta$ -propríotenina (DMPT) e dimetilacetotenina (DMT)) existentes em outros organismos aquáticos que podem exercer uma acção directa ou indirecta sobre o ciclo da muda. Para além disso, existem alguns produtos químicos que constituem os denominados pesticidas da 3ª geração (RH-5992, RH-5849 e Fenoxicarbe) que exercem a sua acção sobre o crescimento dos

insectos e que, devido às analogias entre o crescimento dos insectos e crustáceos (Chang, 1993; Lachaise *et al.*, 1993), podem influenciar o ciclo da muda dos crustáceos.

### **Farnezoato de metilo**

O farnezoato de metilo (MF) é o precursor da hormona juvenil (JH) dos insectos e é produzido no órgão mandibular. Até ao momento não existem evidências da presença da JH nos crustáceos, no entanto, já foi comprovada a presença do MF - hormona terpenóide homóloga da JH dos insectos (Borst *et al.*, 1987). O MF presente nos crustáceos desempenha, segundo diversos autores (Chang, 1993; Lafont, 2000), um papel semelhante ao desempenhado pela JH nos insectos. A influência do MF no ciclo da muda parece indiscutível (Chang *et al.*, 1993; Chang, 1995; Rotllant *et al.*, 2000), no entanto ainda é necessário determinar se este composto actua no órgão Y através da estimulação da síntese e/ou libertação da ecdisona ou se estimula a libertação de outro ecdisteróide (Lachaise *et al.*, 1988; Spaziani *et al.*, 1989). Uma experiência com MF exógeno demonstrou que larvas de *Homarus americanus* expostas a este composto mostraram níveis significativamente mais elevados de ecdisteróides do que os animais não sujeitos ao MF (Chang *et al.*, 1993). Apesar de tudo o que foi referido anteriormente, a influência do MF sobre o crescimento dos crustáceos em geral e do *Carcinus maenas* em particular tem que ser estudada com bastante precaução, isto porque experiências revelaram a existência de elevados níveis de MF na hemolinfa de *C. maenas* aquando da sua exposição a diversos factores de stress (temperatura, salinidade, anoxia e manuseamento). Estes níveis podem ser resultado de um efeito directo do stress ou podem fazer parte de um mecanismo adaptativo ao stress (Lovett *et al.*, 1997; Lovett *et al.*, 2001)

### **Ácido xanturénico**

O ácido xanturénico (XA) é um metabolito da 3-hidroxi-L-quinurenina (3-OH-K), composto que foi isolado a partir de pedúnculos oculares (PO) (Naya *et al.*, 1988). O facto de se ter isolado a 3-OH-K a partir dos PO e o XA ser um metabolito do composto anterior levantou a hipótese de estes compostos apresentarem uma actividade semelhante à MIH. Experiências realizadas com *Callinectes sapidus* demonstraram que o XA possui uma capacidade de inibir a síntese de ecdisteróides “in vitro” de forma mais evidente que o seu precursor. Os resultados obtidos permitiram ainda concluir que ambos os compostos referidos anteriormente (XA e 3-OH-K) exercem a sua actividade inibidora no órgão Y

(Naya *et al.*, 1988). Estudos efectuados com a espécie *Procambarus clarkii* sugerem que a 3-OH-K, que é segregada pelo complexo órgão X – glândula do seio dos crustáceos, é libertada para a hemolinfa, acumulada na superfície do órgão Y e convertida na sua forma activa, o ácido xanturénico (Naya *et al.*, 1989).

### **5-Hidroxitriptamina**

Mattson e Spaziani (1986a) constataram que a 5-hidroxitriptamina (5-HT) estimulava a libertação da MIH. Os mesmos autores, em trabalhos realizados anteriormente verificaram este mesmo resultado em experiências efectuadas em pedúnculos oculares isolados. Presume-se, por isso, que este composto tenha uma influência indirecta no controlo dos níveis de ecdisteróides da hemolinfa dos crustáceos. Este composto é libertado pela glândula do seio, podendo a sua acção ser inibida através da utilização de p-clorofenilalanina (PCPA) (inibe a síntese deste composto) ou de ciproheptadina (CPH) (antagonista deste composto). A inibição da acção da 5-HT, visto que deixa de estimular a libertação da MIH, poderá resultar numa indução do ciclo da muda (Mattson e Spaziani, 1986a).

### **Dimetil- $\beta$ -propritenina e Dimetilacetona**

A dimetil- $\beta$ -propritenina (DMPT) é o precursor de um cheiro marinho (dimetilsulfato) e ocorre em diversos organismos aquáticos. O seu papel nesses organismos ainda não é muito conhecido, com excepção da sua acção como osmoregulador nas algas. A utilização deste composto em pequenas concentrações como parte integrante da dieta de diversos peixes (marinhos e dulce-aquícolas) resultou na aceleração do crescimento desses animais (Nakajima, 1991). Tendo em conta estes factos, Nakajima (1991) procurou determinar se este composto possui o mesmo efeito sobre o crescimento e muda do crustáceo *Palaemon paucidens*. A utilização de diversas concentrações permitiu concluir que à concentração de 0,1 mM de DMPT ocorria um aumento quer do crescimento quer da frequência de muda. Utilizando a mesma espécie, o mesmo autor realizou experiências com a dimetilacetona (DMT) e a vitamina U, compostos que apresentam uma semelhança estrutural com o DMPT, incluindo a presença de sulfato na sua composição. Quer o DMT quer a vitamina U apresentaram resultados muito inferiores aos registados para o DMPT (Nakajima, 1991).

## **Fenoxicarbe, RH-5992 e RH-5849**

Devido às semelhanças existentes na endocrinologia do ciclo da muda de insectos e crustáceos, nomeadamente ao nível dos ecdisteróides, é possível que compostos com efeitos ao nível do crescimento dos insectos possam influenciar igualmente o crescimento dos crustáceos (Chang, 1993; Lachaise *et al.*, 1993). Nos últimos anos tem-se sintetizado diversos compostos químicos denominados de “terceira geração de pesticidas” – os reguladores de crescimento dos insectos (IGRs). Três exemplos de IGRs são o fenoxicarbe (2 (fenoxi-fenoxi)-etil carbamato), o RH-5849 (1,2-dibenzoil-1-tert-butilhidrazina) e o RH-5992 (N'-t-butil-N'-[3,5-dimetilbenzoil]-N-[4-etilbenzoil] hidrazina). Os dois últimos compostos referidos são agonistas da hormona da muda (ecdisona) (Sundaram *et al.*, 1993; Tateishi *et al.*, 1993). O fenoxicarbe, um carbamato não-neurotóxico, é um composto que apresenta uma forte actividade de hormona juvenil, no entanto, também apresenta outros efeitos não específicos das hormonas juvenis. Este tipo de compostos químicos, reguladores do crescimento dos insectos, tentam reduzir o impacto de pesticidas especificando o seu modo de acção e reduzindo a sua toxicidade para com os vertebrados. Vários estudos efectuados com este composto abordam a sua acção sobre o crescimento dos insectos (revisão por Grenier e Grenier, 1993), no entanto a possível interferência do fenoxicarbe no ciclo da muda de crustáceos nunca foi estudada. Por sua vez, estudos realizados em insectos sugeriram que o RH-5849 actuava directamente na epiderme como agonista da 20-OHE induzindo a formação da nova cutícula, no entanto, o animal acabava por não conseguir realizar a exuviação (Tateishi *et al.*, 1993). Recentemente, a utilização do RH-5849 permitiu concluir que este composto actuava sobre a glândula da muda mediando um “*feedback*” negativo na produção de ecdisteróides (Jiang e Koolman, 1999).

## **LINHA DE INVESTIGAÇÃO E OBJECTIVOS**

### **PRODUÇÃO CARANGUEJO MOLE – ESTADO ACTUAL**

A produção, a nível industrial, de caranguejo mole (caranguejos em pós-muda) nos Estados Unidos da América tem vindo a aumentar progressivamente nos últimos 20 anos, verificando-se a distribuição de caranguejos moles pelos mais importantes restaurantes americanos e a exportação em grande escala para o mercado asiático (DuPaul, 1985). A espécie utilizada é o caranguejo *Callinectes sapidus* (“blue crab” - caranguejo azul), a qual



possui um fácil e rápido método de identificação da fase da muda. A existência de um método simples para identificar a fase da muda facilita a separação dos animais em pré-muda e o seu acompanhamento até à exuviação fazendo com que o processo de produção seja bastante simples. A indústria americana de caranguejo mole usa quase exclusivamente o caranguejo azul, no entanto, pensa-se que a aplicação dos mesmos métodos, com ligeiras alterações, noutras espécies (*Cancer irroratus*, *C. magister* e *C. borealis*) pode dar resultados idênticos (Lee e Wickins, 1992).

#### RAZÕES DA ESCOLHA DA ESPÉCIE

Uma das principais razões que nos levou a optar pela espécie *Carcinus maenas* foi a sua elevada abundância e distribuição na Ria de Aveiro, bem como a proximidade das infra-estruturas utilizadas para a execução das experiências da referida Ria. Assim, a disponibilidade e a facilidade com que podia ser obtida faz com que esta espécie fosse ideal para a execução deste estudo. Para além disso, a forte expansão apresentada pela produção de caranguejo mole nos E. U. da América e os potenciais mercados existentes na Europa e Ásia, constituíam um estímulo à produção de caranguejos moles da espécie *Carcinus maenas*.

Na Ria de Aveiro, o valor comercial do caranguejo verde sobe quando este está nas fases de pré-muda (prestes a largar a carapaça) e pós-muda (mole), sendo vendido a pescadores desportivos para utilização como isco. Assim, uma eventual produção de caranguejos moles terá como objectivos principais, em primeiro lugar e com maior incidência, a sua utilização para alimentação humana (à semelhança do que acontece com a espécie *Callinectes sapidus* nos E.U.A.) e, num segundo plano, a utilização dos animais moles, não aproveitados para a alimentação, como isco para a pesca (desportiva e/ou profissional).

#### DIFICULDADES E ALTERNATIVAS

Para melhor conhecer a população de caranguejos com a qual se pretendia trabalhar, foi previamente efectuado um estudo de caracterização da população de caranguejo verde (*Carcinus maenas*) da Ria de Aveiro (Carvalho et al., 1999). Neste estudo, para além do registo das características gerais (sexo, peso, cor, largura da carapaça, actividade, dureza da carapaça e fase da muda) dos caranguejos capturados por duas artes

de pesca distintas, procurou-se um método simples, directo e não-invasivo de identificação da fase da muda do animal. Para tal, aquando da observação dos caranguejos procurou-se sinais exteriores aos quais se pudesse associar cada uma das diferentes fases da muda, tendo-se também medido o peso específico de caranguejos em diferentes fases da muda de forma a averiguar se este parâmetro variava de forma directa com as diferentes fases. No entanto, não foi identificado nenhum novo método de identificação da fase da muda no caranguejo verde. A ausência de um método mais fácil e prático de identificar as fases da muda fez com que não fosse possível a utilização do processo de produção de caranguejos moles semelhante ao utilizado com o caranguejo azul *Callinectes sapidus* (observação directa da existência ou não da retracção da matriz ao longo do bordo das últimas duas secções achatadas do último par de pereópodes). A utilização deste método faz com que a produção de caranguejo mole seja feita de forma simples: os caranguejos são capturados no meio ambiente, identifica-se a fase da muda em que se encontram através da observação da sua pata natatória, faz-se a separação dos animais em pré-muda e intermuda e colocam-se os animais em tanques separados com sistemas fechados de circulação de água (Oesterling, 1985). A monitorização é feita frequentemente (4 em 4 horas) em ambos os tanques com o objectivo de separar os animais em pré-muda e os que mudaram (Lee e Wickins, 1992). O método utilizado, com *Callinectes sapidus*, para verificar qual a fase da muda dos caranguejos não foi utilizado em *Carcinus maenas* porque esta espécie não possui os últimos segmentos do último par de pereópodes tão achatados. Nos caranguejos *C. maenas*, o método utilizado implica a remoção de uma peça bucal (endopódito do 1º maxilípede) e observação da sua estrutura ao microscópio óptico segundo os critérios de Drach e Tchernigovtzeff (1967). Uma vez que estamos na presença de um método moroso e invasivo, não é possível identificar a fase da muda de forma fácil para se poder efectuar facilmente a separação dos animais em pré-muda (fases D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Esta impossibilidade de identificação da fase da muda de forma simples, fácil e não invasiva fez com que não se efectuassem estudos, com vista à indução da muda, em cada uma das fases da muda específicas.

Apesar de não se ter encontrado um novo método de identificação da fase da muda, os resultados obtidos no estudo de caracterização da população de *Carcinus maenas* realizado anteriormente (Carvalho et al., 1999) permitiram obter dados relevantes relativos às fases da muda, tendo sido úteis para o delinear desta investigação. Assim, a utilização de

duas artes de pesca (arrasto e nassas) nesse estudo resultou em diferenças significativas das diferentes fases da muda capturadas em cada uma das artes utilizadas, isto é, constatou-se que o arrasto permitia capturar caranguejos em todas as fases do ciclo da muda (pós-muda (A e B) (6%), intermuda (C) (80%) e pré-muda (D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) (14%)) enquanto que nas nassas 88% dos caranguejos estavam em intermuda, 1% em pós-muda e 11% em pré-muda inicial (D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>). Tendo em conta estes dados, na realização das diferentes experiências efectuou-se a separação dos animais consoante a arte de pesca utilizada (arrasto e nassas), obtendo-se assim dois grupos de caranguejos com proporções de fases da muda distintas.

Para além da separação por artes, também se fez a separação dos caranguejos por sexo (machos e fêmeas). Foram duas as razões que levaram à separação dos sexos: - no estudo de caracterização atrás referido foram capturados mais machos ( $\approx 3\%$ ) nas fases de pós-muda do que fêmeas ( $\approx 1\%$ ); - machos e fêmeas apresentam ritmos de crescimento diferentes, realçando-se o facto das fêmeas verem o seu ciclo de crescimento ser influenciado de forma mais significativa pelo ciclo reprodutivo que os machos.

## OBJECTIVOS

A importância das interacções hormonais no ciclo da muda faz com que o estudo das hormonas da muda seja de extrema importância para um melhor conhecimento deste processo biológico. Uma vez que, com este estudo, se pretende aprofundar os conhecimentos do ciclo da muda de forma a encontrar um estímulo para o induzir, é necessário saber o que ocorre a nível hormonal, em especial qual a importância de cada uma das hormonas da muda (ecdisteróides). Para aprofundar o conhecimento das concentrações das hormonas da muda na espécie *Carcinus maenas* durante o ciclo da muda realizou-se um estudo das concentrações dos ecdisteróides (hormonas da muda) circulantes na hemolinfa. Inicialmente efectuou-se uma quantificação dos ecdisteróides totais, tendo-se posteriormente separado e quantificado os ecdisteróides mais relevantes do ciclo da muda – ecdisona (hormona da muda) e 20-hidroxiecdisona (hormona da muda activa). A realização deste estudo serviu também para ajustar e otimizar as técnicas aplicadas ao estudo dos ecdisteróides (HPLC e EIA). Esta optimização tem como objectivo a utilização destas técnicas no estudo hormonal de animais em que seja induzida a muda. Desta forma, quando forem obtidos resultados positivos na indução da muda, estas técnicas poderão ser

utilizadas na verificação das alterações ocorridas a nível hormonal, essencialmente ao nível dos ecdisteróides.

Diversas experiências foram planeadas com o objectivo de avaliar o efeito de diversos estímulos na sobrevivência e frequência da muda no caranguejo verde (*Carcinus maenas*). Tendo em conta o que já foi referido anteriormente, existem diversos factores que influenciam o ciclo da muda, quer a nível hormonal quer a nível ambiental. A nível ambiental, efectuou-se uma experiência em que se expôs ao ar (hipoxia) os caranguejos durante diferentes períodos de tempo. A ablação de patas locomotoras foi testada devido à necessidade que os caranguejos apresentam de mudar logo após a perda de patas e/ou pinças, isto porque é durante a muda que estes animais formam um broto regenerativo que originará o(s) pereiópode(s) perdido(s). Por sua vez, a nível hormonal, planearam-se duas experiências, uma em que se interferiu indirectamente no processo hormonal através da ablação dos pedúnculos oculares e outra em que se interferiu directamente através da injeção da hormona da muda activa (20-hidroxiecdisona) e/ou inibidores da hormona inibidora da muda (MIH). No primeiro caso, a ablação dos pedúnculos oculares deve-se à presença nessas estruturas do complexo glândula do seio - órgão X, o qual é responsável pela produção e armazenamento da hormona inibidora da muda (MIH). No segundo caso, pretendeu-se conjugar vários estímulos, estimulando a muda ao injectar a hormona da muda activa (20-OHE) ao mesmo tempo que se removia a origem da MIH (ablação de pedúnculos oculares) ou se injectava compostos que inibissem a acção desta hormona. Finalmente, injectou-se também um insecticida – fenoxicarbe - que influencia o ciclo de crescimento dos insectos, podendo por isso também o fazer nos crustáceos.



# **MATERIAL E MÉTODOS GERAL**



## **MONTAGEM DO CIRCUITO SEMI-FECHADO PARA A REALIZAÇÃO DAS EXPERIÊNCIAS**

O sistema experimental foi montado numa estação experimental em Ílhavo, nas instalações de uma piscicultura semi-intensiva propriedade da empresa MATERAQUA, Lda.. Foi construído um edifício em tijolo com uma área total de aproximadamente 67 m<sup>2</sup> (comprimento - 10,83 m, largura - 6,20 m). Um pequeno laboratório, para apoiar o trabalho realizado, ocupa uma área de 5,76 m<sup>2</sup>. Na área experimental, junto do laboratório, foi montada a zona de filtração com uma área de 9,14 m<sup>2</sup>. A área restante (52,27 m<sup>2</sup>) foi utilizada para montar uma fila com 15 pilhas de 10 caixas e para instalar as canalizações necessárias para fazer a distribuição da água e do ar (Anexo I).

Para facilitar a compreensão das instalações experimentais e do circuito de água apresenta-se, em anexo, uma representação esquemática de todo o sistema (Anexo II).

### **Circulação da água**

#### **1. Captação da água**

A água necessária para todo o sistema foi retirada do reservatório de saída da piscicultura, situado próximo ao edifício da estação experimental. Para se proceder à captação da água foi instalada uma electrobomba submersível F-4''-FT-7-I (1,5 kW) no referido reservatório de saída. Esta bomba possuía capacidade para bombear aproximadamente 20m<sup>3</sup> de água/h. A água bombeada era armazenada no reservatório principal, localizado no exterior do edifício entre este e o reservatório de saída da piscicultura (Anexo III), sendo o funcionamento da bomba controlado por uma bóia de nível existente no reservatório principal.

#### **2. Circulação da água**

O reservatório principal tinha uma capacidade de 1,5 m<sup>3</sup> (comprimento - 2 m; diâmetro - 1 m) e era feito de poliéster reforçado com fibra de vidro. Dentro do reservatório foi instalada outra electrobomba submersível (F-4''-FT-5F, 0,55 kW) com capacidade para bombear 10 m<sup>3</sup> de água/h, sendo o seu funcionamento controlado por uma bóia de nível existente nas tinas de biobolas. A água bombeada era conduzida a um filtro de tambor através de um tubo de plástico flexível (2'').



### 3. Filtragem da água

Após um período de sedimentação prévia no reservatório principal, a entrada da água no filtro de tambor iniciava o processo de filtração (Anexo IV).

3.1. Filtro de tambor - era um filtro de tambor giratório (Faivre - tipo 2-60) que apresentava um fluxo de  $9,7 \text{ m}^3/\text{h}$  (a  $100 \text{ }\mu\text{m}$ ), uma superfície de filtração de  $0,50 \text{ m}^2$  e  $0,60 \text{ m}$  de diâmetro do tambor. A rotação do tambor era possível devido à ação de um motor com  $180 \text{ W}$ . A superfície exterior do tambor era constituída por várias armações de aço cobertas com malha de aço de  $100 \text{ }\mu\text{m}$ . O filtro de tambor, girando lentamente, retinha os sólidos suspensos maiores que  $100 \text{ }\mu\text{m}$  e descarregava-os por um canal localizado no topo do tambor. Os sólidos retidos no filtro eram eliminados através de um chuveiro colocado por cima do tambor e que utilizava uma bomba magnética Iwaki MD ( $70 \text{ rpm}$ ).

3.2. Tinas de “Biobolas” – a água proveniente do filtro de tambor entrava numa série de três tinas ligadas entre si através de tubo de PVC (2”). Cada uma das tinas ( $1,20 \times 1,00 \times 0,55 \text{ m}$ ) apresentava uma capacidade total de  $0,66 \text{ m}^3$  de água, totalizando o conjunto das três tinas cerca de  $2 \text{ m}^3$ . Nestas tinas foram colocadas “biobolas”, isto é, suportes artificiais de grande superfície para fixação de bactérias (responsáveis pela filtração biológica). As “biobolas” eram azul escuras com um diâmetro de  $4 \text{ cm}$  garantindo uma superfície máxima de  $300 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Nas nossas instalações foram colocados  $1,4 \text{ m}^3$  de “biobolas” distribuídas igualmente pelas três tinas (aproximadamente  $0,47 \text{ m}^3$  por tina).

3.3. Filtro de areia - com o propósito de clarear a água, a passagem da água pelo filtro de areia permitia a retenção de partículas em suspensão e também, em menores dimensões, a adsorção de bactérias nos grãos de areia. O filtro de areia tinha um reservatório de  $50 \text{ litros}$  com aproximadamente  $30 \text{ Kg}$  de areia do mar no seu interior. A entrada de água neste filtro era feita através da ação de uma bomba (tipo 60.57.30,  $0,5 \text{ kW}$ ) com capacidade de bombear  $10 \text{ m}^3/\text{hora}$ , captando a água na última tina das três existentes.

3.4. Filtros de cartucho – após passagem no filtro de areia, a água entrava em dois filtros de cartucho ligados em paralelo. Estes filtros eram constituídos por um copo “Big Blue” (20”) e um cartucho “Big Blue” (20”) de  $50 \text{ }\mu\text{m}$ . O copo tinha uma entrada de  $1\frac{1}{2}$ ”,  $60,6 \text{ cm}$  de altura e  $18,6 \text{ cm}$  de largura (volume  $\approx 16 \text{ dm}^3$ ). Os cartuchos utilizados foram os “Genuine Harmsco” tipo H317 (HB-20-50w). A passagem da água por estes

filtros permitia a retenção de sólidos em suspensão superiores a 50 µm, o que implicava uma limpeza periódica para remoção do material retido ou mesmo a substituição do filtro.

3.5. Filtros ultravioletas (esterilizadores) - cada um dos filtros de cartucho estava ligado a um filtro ultravioleta. Os dois filtros ultravioletas, também instalados em paralelo, apresentavam características idênticas. Os dois esterilizadores “De Bary”, modelo AN-55/0 (volume - 3,5 litros), apresentavam um fluxo máximo de 6 m<sup>3</sup>/h e usavam uma lâmpada ultravioleta do tipo G55T8. Os raios ultravioletas evitavam a proliferação de microorganismos patogénicos (bactérias, parasitas, vírus, fungos) através da morte destes por exposição aos referidos raios. Os filtros ultravioleta são um método reconhecido e muito eficiente de esterilizar a água.

#### 4. Distribuição da água

A água de ambos os filtros ultravioletas era recolhida num tubo hidronil PVC de 3” que funcionava como distribuidor principal da água. Antes das saídas de água para cada uma das pilhas de caixas havia uma válvula para controlar o fluxo de água. O tubo principal de distribuição de água apresentava quinze saídas (catorze delas em uso simultâneo, sendo que a posição livre tinha por objectivo permitir a rotação das pilhas de caixas nos processos de limpeza, verificação e/ou alimentação) para um tubo hidronil PVC de 1½” (Anexo II). Em cada uma das saídas era possível colocar o máximo de 10 caixas empilhadas. Para fazer a distribuição por cada uma das caixas da pilha respectiva, existia uma redução para ½” onde foi colocado um tubo de plástico flexível ½” com 25-50 cm que permitia a queda da água no interior da caixa respectiva. No tubo de plástico flexível colocou-se um adaptador de plástico com doze posições (sem fluxo - máximo fluxo) para assegurar um fluxo de água aproximadamente igual em todas as caixas (Anexo V).

#### 5. Drenagem da água

As caixas possuíam um orifício em cada um dos lados das pegadas da caixa. Este orifício era usado para escoar a água que transbordava das caixas devido à inclinação do chão e da entrada contínua de água. Este processo permitia uma renovação constante da água das caixas. A água que transbordava das caixas era recolhida numa calha em PVC com 25 cm de diâmetro. Esta calha estava ligada ao tubo de drenagem principal (diâmetro -

25 cm) que por sua vez fazia o transporte da água para o reservatório principal existente no exterior da estação experimental, fechando desta forma o ciclo de água (Anexo VI).

## 6. Caixas

As caixas (Domplex LR, ref. 615) usadas na estação experimental eram feitas de polipropileno alimentar e possuíam as seguintes medidas: comprimento - 80 cm; largura - 45 cm; altura - 15 cm. Estas caixas tinham capacidade para cerca de 40 dm<sup>3</sup> de água. As caixas foram dispostas em pilhas de dez, isto porque as caixas utilizadas permitiam a sua sobreposição deixando o interior da caixa inferior livre. As pilhas de caixas estavam organizadas numa fila com possibilidade de colocar 14 pilhas simultaneamente, sobrando uma posição livre para permitir a rotação das pilhas de caixas. No interior das caixas colocou-se uma estrutura em rede (polietileno resistente a ultravioletas) que dividia o espaço existente em 24 compartimentos aproximadamente iguais (Anexo VII). Resumindo, havia um total de 140 caixas e a possibilidade de trabalhar com 3360 caranguejos (24 caranguejos/caixa) simultaneamente.

## 7. Rede de arejamento

O arejamento da água foi efectuado através da utilização de um compressor Effepizeta SCLV6 (2,2 kW, 267 m<sup>3</sup>/h). Este compressor possuía um filtro de ar Effepizeta (tipo Fl6, cartucho de substituição CF6) que efectuava a filtração do ar utilizado pelo compressor. Um tubo hidronil PVC de 2" efectuava a distribuição do ar pelas dezoito saídas existentes: - três dessas saídas efectuavam o arejamento das três tinas de "biobolas" através do uso de um tubo de plástico flexível perfurado (1"); - as outras quinze saídas tiveram como função o arejamento das diferentes pilhas de caixas. As caixas eram arejadas através de um processo semelhante ao descrito para a distribuição da água, sendo que a única diferença registada foi a colocação, na extremidade livre do tubo flexível, de 3-4 cm de tubo poroso (Anexo V).

## AMOSTRAGENS

Os caranguejos verdes (*Carcinus maenas*) utilizados neste estudo foram capturados na Ria de Aveiro através da utilização de duas artes de pesca – o arrasto e as nassas.

### RIA DE AVEIRO

A Ria de Aveiro é um complexo sistema de canais onde é possível identificar três canais principais com várias ramificações, ilhas e bancos intertidais (Fig. 16) (Queiroga, 1987). Esta laguna possui uma extensão total de cerca de 45 Km (N-S) paralelamente ao Oceano Atlântico, apresentando uma largura máxima de cerca de 10Km (Gomes, 1991; Queiroga, 1987). A Ria de Aveiro possui uma ligação artificial ao oceano, permitindo por isso que este ecossistema esteja sob a influência das marés. Desta forma, este sistema lagunar cobre uma área de 47 km<sup>2</sup> durante a preia-mar e uma área de 43 Km<sup>2</sup> durante a baixa-mar (Queiroga, 1987). De forma geral, todos os canais apresentam profundidades pequenas, com excepção dos canais de navegação onde é possível encontrar profundidades de cerca de 15 metros (Gomes, 1991b).

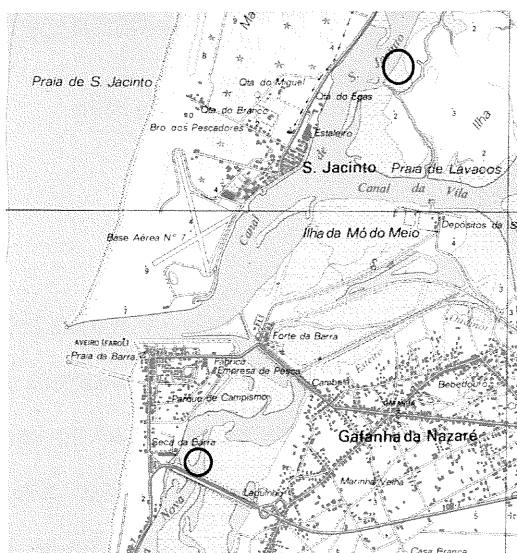


Figura 16: Mapa da Ria de Aveiro.

## ARTES DE PESCA

### Nassas

A nassa é um aro de ferro com 55,5 cm de diâmetro, do qual está suspenso um saco de rede com malha esticada de 30 mm (Fig. 17). Colocado de um lado ao outro, no centro da nassa, encontrava-se um saco de rede onde era possível colocar o isco (exemplo: sardinha) (Anexo VIII). Finalmente, a nassa estava presa a uma corda, a qual possui na outra extremidade uma bóia (para ser possível efectuar a localização da nassa aquando da sua colocação na água) (Anexo IX). Neste estudo, a pesca com nassas foi realizada durante cerca de 40 minutos.

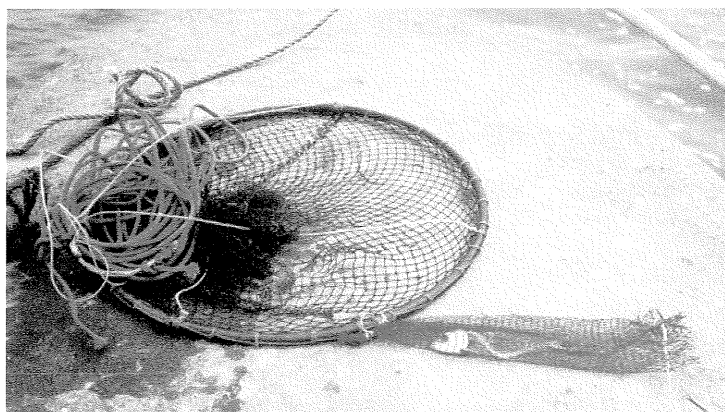


Figura 17: Aspecto de uma nassa.

### Arrasto

O arrasto é uma arte que utiliza uma rede de malha esticada de 30 mm, rede esta que é presa a duas portas (Anexo X) que permitem a abertura do saco aquando do arrasto (Fig. 18). As portas referidas anteriormente, eram presas ao barco através da utilização de cabos e eram depois rebocadas fazendo com que a rede arrastasse pelo fundo. Após o arrasto, içava-se a rede para o interior do barco e procedia-se à separação da captura, isto porque, no arrasto capturavam-se outras espécies (linguado, ruivo, peixe-aranha, choccos, etc.) não necessários ao estudo realizado. O tempo total de arrasto foi de 20 minutos.



Figura 18: Aspecto da rede de arrasto.

#### PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

Uma vez que o ciclo lunar e as marés exercem influência no desenrolar do ciclo de crescimento dos crustáceos (ver pág. 48), optou-se por amostragens em dias de fases da lua idênticas. Esta decisão teve como principal objectivo retirar a possível influência destes factores – ciclo lunar e marés – sobre os resultados obtidos, procurando-se obter os caranguejos sempre em condições semelhantes relativamente a estes dois factores. Desta forma, as amostragens foram efectuadas mensalmente coincidindo com a fase lunar quarto-crescente.

Já na estação experimental, efectuou-se o registo do sexo, peso e largura da carapaça (distância entre as extremidades do 5º dente do bordo antero-lateral de cada lado) de uma amostra aleatória de 50 animais, realizando-se este registo em todas as amostragens. Nesses mesmos 50 animais efectuou-se ainda a identificação das fases da muda através da observação ao microscópio óptico do endopódito do 1º maxilípede, segundo os critérios de Drach e Tchernigovtzeff (1967).

Posteriormente, os animais foram separados tendo em conta quer a arte de pesca quer o sexo, dependendo da experiência a realizar. A separação por arte de pesca (arrasto e nassas) foi efectuada com base em dados obtidos num estudo de caracterização da população de caranguejo verde (*C. maenas*) da Ria de Aveiro. A caracterização da população desta espécie de caranguejos baseou-se em amostragens mensais nas quais se efectuou o registo de diversas características dos animais, realçando-se a identificação da fase da muda (Carvalho *et al.*, 1999). Um dos objectivos dessa caracterização foi procurar/identificar um ou mais sinais exteriores que permitissem uma identificação rápida

e simples da fase da muda, no entanto esse objectivo não foi alcançado. No estudo de Carvalho *et al.* (1999) foram utilizadas como artes de pesca o arrasto e as nassas, à semelhança do que acontece no estudo aqui descrito. A utilização de duas artes de pesca permitiu registar diferentes proporções de animais nas várias fases da muda. Assim, foi possível concluir que a pesca com nassas apresentava a quase totalidade dos animais na fase C (intermuda), aparecendo esporadicamente alguns animais nas fases de pré-muda inicial ( $D_0$  e  $D_1$ ). Por sua vez, a pesca com rede de arrasto apresentou uma maior variedade de fases da muda, apesar de a fase C continuar a ser a mais representativa. Desta forma, esta arte de pesca permitiu capturar animais em todas as fases, inclusive animais em pós-muda (fases A e B) e na pré-muda final ( $D_2$  e  $D_3$ ). Estes dados, ao permitirem obter informação dos estádios da muda representados em cada uma destas artes de pesca, fornecem indicações sobre os possíveis resultados a obter em experiências de estimulação da muda. Isto porque, este tipo de experiências está dependente da fase da muda em que o animal se encontra. Por sua vez, a separação dos caranguejos por sexo durante as experiências realizadas deveu-se a três factores: - os machos e as fêmeas apresentam taxas de crescimento distintas; - verificou-se que as proporções das diferentes fases da muda em ambos os sexos eram semelhantes, com excepção de se ter registado um maior número de caranguejos machos nas fases de pós-muda (fases A e B) do que fêmeas; - de facto, as fêmeas vêem o seu ciclo de crescimento ser mais influenciado pelo seu ciclo reprodutivo do que os machos.

Aquando da separação dos caranguejos, os animais que apresentavam ausência de uma ou mais patas/pinças e/ou a presença de *Sacculina carcini* (externamente visível) foram rejeitados, uma vez que já foi comprovado que em ambos os casos existe uma influência directa sobre o ciclo de crescimento dos caranguejos (ver págs. 45 e 49).

## Planeamento das experiências

### NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS

Inicialmente, efectuou-se um estudo da dimensão da amostra (número de caranguejos a utilizar) necessária para a execução das experiências com um grau de erro baixo (razoável – 10%). Numa amostragem casual simples (sem replicação) a escolha das amostras é feita de forma a que todos os elementos tenham igual probabilidade de pertencer à amostra. Numa amostra deste tipo, visto que a probabilidade de sucesso (caranguejo pertence à amostra) é igual à probabilidade de falha (caranguejo não pertence à amostra) temos que  $p = q = 0,5$ . Para a determinação do número de animais a utilizar em cada situação das experiências calculou-se o valor de  $n$  (número de animais a utilizar) para três diferentes graus de confiança (95, 90 e 85%), concluindo-se que, com uma confiança de 90%, deveria utilizar-se um número de caranguejos razoável ( $n = 68$  animais). Tendo em conta este número e as condições em que se realizou as experiências, procurou-se determinar o número definitivo de caranguejos a utilizar. Para tal, teve-se em conta dois factores, em primeiro lugar considerou-se a possibilidade de existirem algumas mortes e em segundo foi necessário considerar o número máximo de caranguejos por caixa. Desta forma, considerando que poderia ocorrer, em alguns casos, taxas de mortalidade elevadas e uma vez que a capacidade máxima das caixas era de 24 animais, decidiu-se utilizar 4 caixas (cada caixa leva 24 caranguejos) para cada estímulo, isto é, 96 caranguejos. Para os animais controlo foram utilizadas metade das caixas ( $2 * 24 = 48$  caranguejos). No entanto, este número de caranguejos não foi utilizado nas primeiras experiências, isto porque o número de animais disponíveis não o permitia. Apesar disso, houve a preocupação de, no caso de se registarem resultados positivos ao nível da indução da muda, se realizar uma nova experiência utilizando o número de caranguejos atrás referido. Com este procedimento, para além de se fazer a confirmação dos resultados positivos, efectuou-se essa análise com um número de caranguejos suficiente para garantir um grau de confiança de 90%.

### TRATAMENTOS APLICADOS

As experiências realizadas abordaram três formas de tratamento dos caranguejos verdes (*Carcinus maenas*) de forma a estudar os efeitos na sobrevivência e na frequência



de muda. Os tratamentos utilizados tiveram em consideração a possível indução da muda através da exposição ao ar, da ablação dos pedúnculos oculares (PO) e/ou patas locomotoras (PL) e da injeção da hormona da muda activa (20-OHE) e de compostos químicos com possível inibição da produção/libertação da hormona inibidora da muda (MIH).

### **Exposição ao ar (hipoxia)**

A emersão (exposição ao ar) durante algumas horas e re-imersão de alguns crustáceos permitiu concluir que ocorriam alterações na frequência da muda. A exposição ao ar provoca uma acidose respiratória, estado fisiológico que se assemelha ao que ocorre no ciclo da muda normal dos crustáceos no início da pré-muda e no momento da exuviação (ver pág. 48-49). Em primeiro lugar efectuou-se uma experiência para obter o valor de LT50 (período de tempo após o qual morrem mais de 50% dos animais) do caranguejo verde na estação experimental. As experiências de LT50 foram efectuadas com duas caixas de caranguejos (48 caranguejos) por grupo de estudo (machos/arrasto (MA), fêmeas/arrasto (FA), machos/nassas (MN) e fêmeas/nassas (FN)). De seguida, numa segunda experiência, com base nos valores de LT50 encontrados, definiram-se vários períodos de exposição ao ar (inferiores aos valores de LT50), no fim dos quais era reposta a circulação de água nas caixas. Nesta segunda experiência utilizaram-se duas caixas controlo (48 caranguejos) (animais intactos e colocados em caixas com circulação de água desde o início da experiência) e duas caixas por cada grupo de estudo (MA, FA, MN e FN)/período de exposição (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas).

### **Ablação dos pedúnculos oculares e/ou autotomização de patas locomotoras**

A produção e armazenamento da MIH no complexo órgão X – glândula do seio, que se localiza nos pedúnculos oculares (PO), conduz a que a ablação dos PO possa resultar numa indução da muda (ver pág. 45). Uma vez que a formação do broto regenerativo apenas ocorre durante a muda, faz com que o animal que autotomizou uma ou mais patas locomotoras (PL) seja estimulado a mudar para regenerar essa(s) pata(s) (ver pág. 45). Um primeiro ensaio teve em conta os dois tratamentos separados para todos os grupos de estudo (MA, FA, MN e FN) e, apenas num só grupo de estudo (FN), se efectuou os dois tratamentos em simultâneo. Assim, para cada grupo de estudo (MA, FA, MN e FN) foram utilizadas 2 caixas de controlo (48 caranguejos) e duas caixas por cada um dos

tratamentos (ablação PO ou autotomização de PL). No grupo FN colocaram-se mais 2 caixas de controlo e duas caixas com caranguejos com os dois tratamentos em simultâneo (ablação de PO e autotomização de PL). Devido à obtenção de resultados positivos nos primeiros 15 dias deste primeiro ensaio no grupo de estudo machos/nassas com a autotomização de PL, realizou-se um segundo ensaio com o intuito de reproduzir os resultados do primeiro. Assim, de acordo com o que já foi referido anteriormente (ver pág. 67), utilizaram-se duas caixas controlo (48 caranguejos) e quatro caixas (96 caranguejos) com caranguejos com autotomização de PL.

### **Injecção de 20-OHE e compostos químicos inibidores da MIH**

A influência da injecção da 20-OHE (hormona da muda activa) no ciclo da muda já foi comprovada, sendo que a sua influência está dependente da fase da muda em que se encontra o animal e da época do ano em que se realiza a experiência. Outros compostos químicos podem também influenciar o ciclo da muda devido à sua acção directa ou indirecta sobre a produção/libertação da MIH (ver pág. 50-53). Nas experiências realizadas foram utilizados dois controlos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>), sendo o C<sub>1</sub> constituído por animais intactos enquanto no C<sub>2</sub> os animais foram injectados com solução Pantin (solução salina preparada segundo Hoar e Hickman (1978) - solução composta por NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaSO<sub>4</sub> e NaBr), a qual foi utilizada como veículo das substâncias a ser testadas. Nesta experiência realizaram-se dois ensaios onde se teve em consideração o sexo dos caranguejos e as substâncias a injectar, realçando-se o facto de todos os caranguejos utilizados terem sido capturados por arrasto. Em ambos os ensaios, para cada um dos sexos, foram utilizadas 2 caixas para o C<sub>1</sub> (48 caranguejos), duas para o C<sub>2</sub> (48 caranguejos) e quatro caixas para cada um dos tratamentos (injecção de hormona e outras substâncias químicas) (96 caranguejos). Os dois ensaios diferiram entre si pelas concentrações distintas com que as diversas substâncias foram injectadas, tendo-se injectado concentrações superiores no segundo ensaio.

As concentrações dos compostos foram definidas de forma a injectar-se o menor volume possível. Assim, considerando que um caranguejo verde tem aproximadamente 1 ml de hemolinfa, optou-se por efectuar os cálculos das concentrações de forma a injectar um volume total de 10 µl (100 vezes inferior ao volume total). Para além disto, a concentração da 20-hidroxiecdisona foi calculada de forma a que após a injecção a sua

concentração fosse superior aos valores circulantes determinados neste estudo (ver capítulo I). O facto de se estar a trabalhar, na sua maioria, com caranguejos na fase C, fez com que se optasse por efectuar duas injeções separadas por 5-7 dias (Dall e Barclay, 1977). Assim, a concentração da 20-OHE foi calculada de forma a que a primeira injeção resultasse numa concentração da hormona circulante semelhante à determinada na fase D<sub>0</sub> (indução da pré-muda) e a segunda induzisse uma concentração semelhante à da fase D<sub>3</sub> (indução da exuviação). Assim, em ambas as injeções (1<sup>a</sup> = 1000 ng/ml; 2<sup>a</sup> = 10000 ng/ml) a concentração injectada foi cerca de 100 vezes superior às concentrações determinadas para cada uma das fases da muda atrás referidas (D<sub>0</sub> = 9,2 ng/ml; D<sub>3</sub> = 121 ng/ml) (capítulo I). Os cálculos das concentrações dos outros compostos a testar foram efectuados tendo em conta a bibliografia consultada, sendo que as concentrações das substâncias injectadas foram sempre massivas quando comparadas com as fisiológicas (Mattson e Spaziani, 1986a; Nakajima, 1991; Grenier e Grenier, 1993).

## TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A maioria das análises estatísticas efectuadas neste estudo envolveram a utilização de análises de variância (ANOVA). A ANOVA é um teste de hipóteses que permite conhecer o efeito que um ou mais factores têm sobre a variável em estudo. As análises de variância efectuadas diferiram entre si no número de factores em estudo, tendo-se realizado ANOVAs com um factor (unifactoriais), dois factores (bifactoriais) (comparação entre os diferentes sexos e os diferentes tratamentos) ou três factores (trifactoriais) (comparação entre os diferentes sexos, as duas artes de pesca e os diferentes tratamentos). A ANOVA unifactorial foi efectuada para analisar as possíveis diferenças existentes entre as concentrações de ecdisteróides em cada uma das fases da muda (capítulo 1). Neste caso, o factor independente foi as diferentes fases do ciclo da muda (7 níveis – fase A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) enquanto que o factor dependente foi a concentração de ecdisteróides. A normalização dos dados neste caso foi efectuada através do logaritmo da concentração. A ANOVA bifactorial foi efectuada para comparar as taxas de mortalidade e as frequências de muda segundo o sexo (2 níveis – machos e fêmeas) e diferentes substâncias injectadas (8 níveis – controlo 1, controlo 2, 20-OH-ecdisona, 20-OH-ecdisona e ablação de pedúnculos oculares, 20-OH-ecdisona e *p*-clorofenilalanina, 20-OH-ecdisona e ciproheptadina, dimetil- $\beta$ -proprionina e dimetilacetona) (capítulo 5). Assim, os factores independentes foram o sexo e aos diferentes tratamentos realizados, enquanto que o factor dependente foram as taxas de mortalidade ou as frequências de muda. A ANOVA trifactorial analisou as diferenças existentes entre os valores de mortalidade e muda segundo a arte de pesca (2 níveis – arrasto e nassas), o sexo (2 níveis – macho e fêmeas) e os tratamentos efectuados (capítulo 3: 8 níveis – controlo, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144 e 168h de exposição ao ar; capítulo 4: 3 níveis – controlo, ablação de pedúnculos oculares e ablação de patas locomotoras). Neste caso, os factores independentes foram o sexo, a arte de pesca e os tratamentos, sendo o factor dependente a mortalidade ou as mudas. Em todos os casos em que se trabalhava com proporções (taxas de mortalidade e frequências de muda), foi necessário normalizar os dados através da utilização da transformação arcsen da raiz quadrada da respectiva proporção.

Em todos os testes ANOVA efectuados, a homogeneidade de variâncias foi testada pelo teste de Cochran, referindo-se, sempre que necessário, a existência de um teste

significativo (heterogeneidade de variâncias). Quando a ANOVA apresentava diferenças significativas, quer em factores individuais quer em interacções, o teste de comparações múltiplas HSD (honest significant difference) de Tukey foi utilizado para detectar quais os grupos responsáveis por essas diferenças (Fowler e Lou Cohen, 1990). Com excepção do capítulo 1, as tabelas de Tukey resultantes dos testes ANOVA, devido a serem bastante extensas, são apresentadas em anexo. Todas as análises de variância foram realizadas utilizando o software “STATISTICA”, considerando-se sempre diferenças significativas quando  $p < 0.05$  (grau de confiança de 95%).

A determinação do LT50 para os diferentes grupos de estudo foi efectuada através da análise probit. Esta análise envolve quatro passos principais: - a linearização da curva de sobrevivência (neste estudo aplica-se a transformação logarítmica (base 10) aos dias e a transformação probit às mortalidades ou mudas); - normalização das variáveis; - obtenção da recta de regressão; - obtenção do LT50. A transformação probit é utilizada porque, para além de linearizar a curva de sobrevivência, tem a capacidade de normalizar os valores percentuais. Após a linearização da curva e a normalização dos dados, é possível aplicar um dos melhores métodos paramétricos de relacionamento de variáveis – a regressão linear. Esta análise estatística foi efectuada através da utilização do programa “Probit”, o qual foi concebido pelo Professor Doutor António Nogueira (Universidade de Aveiro).

## **RESULTADOS**



# **PARTE I - ENDOCRINOLOGIA**





## **CAPÍTULO 1**

**Extracção, purificação e quantificação dos  
ecdisteróides ao longo das fases do ciclo da muda  
da espécie *Carcinus maenas***



## 1. INTRODUÇÃO

Os ecdisteróides são hormonas presentes nos artrópodes, estando envolvidos na regulação da muda e no desenrolar do ciclo reprodutivo (Lachaise *et al.*, 1981; Lachaise *et al.*, 1993, entre outros). Uma grande variedade de técnicas cromatográficas (cromatografia de papel, cromatografia de camada fina, cromatografia líquida, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa) têm sido utilizadas na análise de diversos compostos esteróides, nomeadamente os ecdisteróides, em diversas espécies (revisão por Robards e Towers, 1990; Wilson *et al.*, 1990). Desde uma primeira utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no estudo dos ecdisteróides, à cerca de 30 anos atrás, este método tem vindo a ser utilizado cada vez mais frequentemente pois combina uma melhor selectividade com uma alta recuperação (Lafont *et al.*, 1982; Lafont e Kaouadji, 1994). Esta técnica permite analisar as referidas hormonas após a sua extracção e purificação a partir de diversos materiais biológicos (por exemplo: todo o corpo, um determinado órgão ou hemolinfa) (Lafont *et al.*, 1982; Kubo e Komatsu, 1986; Wilson *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1994). Alguns métodos espectrométricos (espectrometria de absorção de ultravioleta (UV), espectrometria de infravermelhos, espectrometria de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa) para detecção e quantificação dos ecdisteróides costumam ser utilizados juntamente com a cromatografia (Hilde *et al.*, 1988).

Estudos de esteróides e ecdisteróides em crustáceos realizados anteriormente a este trabalho permitiram desenvolver uma técnica de extracção e purificação de hormonas ecdisteróides no laboratório de Fisiologia Geral do ICBAS-UP (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto). A técnica desenvolvida foi aplicada aos estudos em *Carcinus maenas* e consiste numa extracção em metanol e purificação em fase sólida (SPE – solid phase extraction) com mini-colunas de fase reversa C18, a qual permite extrair pequenas quantidades de amostras biológicas (100 a 300 mg de tecido liofilizado ou 150 µl de hemolinfa) com recuperações superiores a 90% (Carvalho *et al.*, 1994). No entanto, devido ao limite de detecção do HPLC (5 a 10 ng) (Carvalho, 1997) e à complexidade dos extractos biológicos, as hormonas são posteriormente quantificadas por enzimo-imuno-ensaio (EIA). O método de extracção desenvolvido é constituído por 3 fases principais: extracção metanólica da matriz, ressuspensão do resíduo metanólico em tampão fosfato e purificação por extracção em fase sólida (SPE) (Carvalho, 1997). Este e outros

métodos de purificação de amostras biológicas em fase sólida para efectuar a determinação cromatográfica de ecdisteróides foram revistos por Wilson *et al.* (1990).

O estudo dos ecdisteróides no desenvolvimento dos artrópodes requer métodos específicos e sensíveis de identificação e quantificação (Porcheron *et al.*, 1989). Durante vários anos foram utilizados diversos métodos com este objectivo, realçando-se a cromatografia de gás – espectrometria de massa, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) – espectrometria de ultravioleta (Harmatha e Dinan, 1997) e o radio-imuno-ensaio (RIA) (Kuo e Lin, 1996, entre outros). Mais recentemente, o método de quantificação por enzimo-imuno-ensaio (EIA) foi desenvolvido por Porcheron e colaboradores, em 1989, utilizando a acetilcolinesterase como marcador. Este método demonstrou ser de fácil aplicação pois envolve reagentes com prazos de validade longos e não implica a manipulação de material radioactivo. O EIA apresentou uma sensibilidade cerca de quatro vezes superior ao RIA devido à alta actividade específica da acetilcolinesterase e ao uso de um segundo anticorpo que reduz o número de ligações não específicas (Porcheron *et al.*, 1989). Apesar do EIA apresentar as vantagens anteriormente descritas, em grande parte dos trabalhos realizados continua-se a utilizar o RIA para efectuar a quantificação de ecdisteróides (Kuo e Lin, 1996; Lee *et al.*, 1998; entre outros).

Na espécie *Carcinus maenas*, o perfil de variação dos níveis de ecdisteróides na hemolinfa pode ser aferido a partir das variações apresentadas pela ecdisona, verificando-se valores menores durante a pós-muda e intermuda seguidos de aumentos ligeiros no início e bruscos no final da pré-muda (Andrieux *et al.*, 1976). De igual forma, no caranguejo *Pachygrapsus crassipes* regista-se um ou mais aumentos ligeiros da concentração dos ecdisteróides, na hemolinfa, na transição entre a intermuda e a pré-muda, registando-se níveis superiores (3 a 10 vezes) aos da intermuda. Em seguida, no final da pré-muda, ocorre uma subida dramática (100 a 300 vezes) que precede e presumivelmente inicia a exuviação. Neste momento crítico do ciclo da muda (exuviação), a concentração de ecdisteróides diminui para níveis muito baixos, sendo progressivamente reposta até aos níveis habituais da intermuda (Chang, 1991). De forma semelhante à registada para o caranguejo *Pachygrapsus crassipes*, os níveis de ecdisteróides circulantes do camarão *Palaemon serratus* sobem gradualmente ao longo do ciclo da muda atingindo um máximo no final da pré-muda (fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>), para logo baixar antes da exuviação (Baldaia *et al.*, 1984). Está comprovado que uma subida inicial dos ecdisteróides circulantes e uma

descida rápida e coordenada no final da pré-muda é absolutamente necessário para uma exuviação bem sucedida (Chang *et al.*, 1993).

Um dos objectivos deste trabalho foi obter o perfil de ecdisteróides da hemolinfa do caranguejo verde *Carcinus maenas* da Ria de Aveiro, ao longo do ciclo da muda. Outro dos objectivos foi testar, ajustar e otimizar as técnicas de extracção, purificação e quantificação dos ecdisteróides totais e, após separação, das hormonas ecdisona, 20-OHE e ponasterona A na hemolinfa, ao longo das diferentes fases do ciclo da muda. Visto que os métodos utilizados já tinham sido aplicados em outros crustáceos, apenas foi necessário efectuar alguns ajustes aos referidos métodos de acordo com a espécie (*C. maenas*) em estudo. Para além disso, pretendeu-se também criar metodologias seguras e fiáveis para serem utilizadas na compreensão do modo de acção, a nível hormonal, de um determinado tratamento que venha a resultar na indução da muda.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### a) Extracção, purificação e separação dos ecdisteróides

Os caranguejos utilizados neste estudo foram capturados na Ria de Aveiro através da utilização de duas artes de pesca (arrasto e nassas). Após a identificação da fase da muda (ver pág. 65), foram recolhidos “pools” de hemolinfa para cada uma das fases do ciclo da muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>), centrifugados a 4500 rpm, a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante resultante foi decantado e mantido a -20 °C para se proceder posteriormente à respectiva extracção dos ecdisteróides.

#### Extracção e purificação das amostras de hemolinfa

De cada “pool” de hemolinfa correspondente a cada uma das fases da muda foram retiradas três alíquotas para extracção e purificação dos ecdisteróides. Com o fim de estudar a reproductibilidade do método efectuaram-se extracções de cinco réplicas da fase de muda D<sub>3</sub>. A hemolinfa (250 µL) foi extraída com metanol (4 mL). O extracto metanólico obtido foi evaporado até à secura através de corrente de azoto a 50 °C e ressuspenso em tampão fosfato (5 mL; 0,2M, pH = 7,4). Em seguida, efectuou-se a purificação das amostras por extracção em fase sólida (SPE) em mini-colunas de fase reversa (C18; 500 mg). Assim, os ecdisteróides foram eluídos nas mini-colunas previamente acondicionadas com 2,5 mL de MeOH e 5 mL de H<sub>2</sub>O. Finalmente, as

amostras foram evaporadas para posterior separação e identificação cromatográfica dos ecdisteróides e quantificação por enzimo-imuno-ensaio (EIA).

#### Separação cromatográfica dos ecdisteróides

Os componentes existentes em cada uma das três réplicas de cada uma das fases da muda foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As características do HPLC utilizado foram as seguintes: Gilson – bombas 305 e 306; Detector Universal UV 117 de comprimento de onda variável; Câmara de Mistura – Dynamic mixer 811C; Manometric Module 805 Max. Press. – 60 Mpa; Coluna HPLC com enchimento C18, Merck 50833, RP-18 – 25 cm x 0.46 cm tipo Lickrocart® 250-4; Diâmetro da Partícula – 5 µm; Injector – Rheodyne 7125 – 081; Loop – 20 µL.

Os extractos já purificados foram ressuspensos em metanol (80 µL) e injectados 2x20µL no HPLC. Os ecdisteróides foram separados e eluídos da coluna através de um gradiente acetonitrilo/água (de 20:80 a 35:65), durante 20 minutos. O registo e comparação dos tempos de retenção na injeção de padrões autênticos dos vários ecdisteróides e na injeção do material experimental permitiu fazer a identificação dos diferentes ecdisteróides em estudo. Durante a separação cromatográfica, oito fracções foram recolhidas por um colector de fracções, de forma a que três das fracções correspondessem exactamente aos três ecdisteróides em estudo (ecdisona, 20-OHE e ponasterona A).

#### **b) Quantificação dos ecdisteróides**

A técnica utilizada para determinar os níveis de ecdisteróides em amostras biológicas foi desenvolvida por Porcheron *et al.* (1989). A técnica de enzimo-imuno-ensaio (EIA) utiliza a enzima acetilcolinesterase como marcador ligada covalentemente à derivada 20-hidroxi-ecdisona-6-carboximetoxima. As reacções imunológicas ocorrem em placas de microtitulação de 96-poços (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp F96) pré-revestidas com um anticorpo secundário. Anticorpos puros de cabra anti-coelho IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) foram imobilizados em placas de microtitulação da seguinte forma: as placas foram revestidas com 200 µL de uma solução 1,25 µg/mL de anticorpos puros de cabra anti-coelho IgG (H+L) em 50mM de tampão (pH = 7,4). Durante a noite, as placas foram incubadas à temperatura ambiente. No dia seguinte, para proceder à saturação das placas, adicionou-se 100 µL de tampão EIA modificado (tampão fosfato 1M com BSA

– albumina bovina 0,1%) a cada um dos poços das placas. De seguida, as placas foram cobertas com uma folha de plástico adesiva e foram armazenadas a 4°C até à sua utilização. As placas, antes de serem utilizadas, foram lavadas com tampão de lavagem (tampão fosfato 0,1 M; 0,5 mL/L de Tween 20) de forma a retirar todos os anticorpos secundários não ligados. Os ensaios foram realizados num volume total de 150 µL, dos quais 50 µL de padrão de ecdisteróides ou extracto biológico; 50 µL de hormona marcada (“tracer”) diluída e 50 µL de uma diluição apropriada de um antisoro específico. Todas as diluições foram efectuadas em tampão EIA (solução composta por tampão fosfato 1M, NaN<sub>3</sub>, NaCl, Na-EDTA e BSA, com pH = 7,3). O antisoro específico (AS4919) utilizado nas experiências foi generosamente cedido por P. Porcheron (ENS, Paris) e o marcador (G4-AchE) foi adquirido a SPI-Bio, França. Inicialmente, as placas foram lavadas: a mistura de incubação foi retirada e adicionou-se tampão de lavagem a cada poço (este processo é repetido 5-6 vezes). A actividade enzimática foi determinada através da adição de 200 µL de reagente de Ellman (tampão fosfato 1M; iodeto de acetilcolina 0,069M; ácido 5-5' ditiobis-2-nitrobenzóico-DTNB 0,054M) a cada um dos poços. A intensidade da cor amarela resultante do tionitrobenzoato (reação entre o grupo sulfídrico da tiocolina, resultante da hidrólise da acetilcolina, e o DTNB) foi medida 2-3 horas mais tarde, a 405nm, num leitor de micro placas (Micro plate reader) (Labsystems, Multiskan EX). As ligações não específicas (NSB) foram determinadas utilizando uma mistura de incubação na qual o anticorpo primário e o padrão de ecdisteróides foram substituídos por 100 µL de tampão EIA. A actividade enzimática das ligações do marcador na ausência de competidor (B<sub>0</sub>) foram determinadas em poços contendo 50 µL de tampão EIA em substituição do padrão de ecdisteróides. Todas as medições foram realizadas em duplicado para ligações não específicas, padrão ou amostras, e em quadruplicado para B<sub>0</sub>. Os resultados obtidos foram expressos como B/B<sub>0</sub>×100 em função do logaritmo da dose. B representa a absorvância medida na fracção ligada na presença do competidor. O ajuste da curva padrão foi realizado utilizando a transformação linear log-logit.



### 3. RESULTADOS

#### a) Extracção, purificação e separação dos ecdisteróides

A separação cromatográfica dos ecdisteróides da hemolinfa permitiu a obtenção de três fracções correspondentes às hormonas ecdisona, 20-hidroxecdisona e ponasterona A. Estas três fracções foram recolhidas em todas as fases do ciclo da muda, com excepção da fase A devido à falta de material biológico. Os cromatogramas obtidos para cada uma das cinco réplicas correspondentes à fase D<sub>3</sub> (Fig. 1.1) demonstraram que os métodos de extracção e separação utilizados foram altamente reprodutíveis, garantindo a recolha das fracções de forma idêntica para todas as fases da muda.

Foram estabelecidas técnicas cromatográficas de HPLC que permitiram obter cromatogramas de referência de cada uma das fases da muda, podendo estes servir de comparação em futuros estudos hormonais a realizar em animais com indução da muda através de qualquer tipo de estímulo.

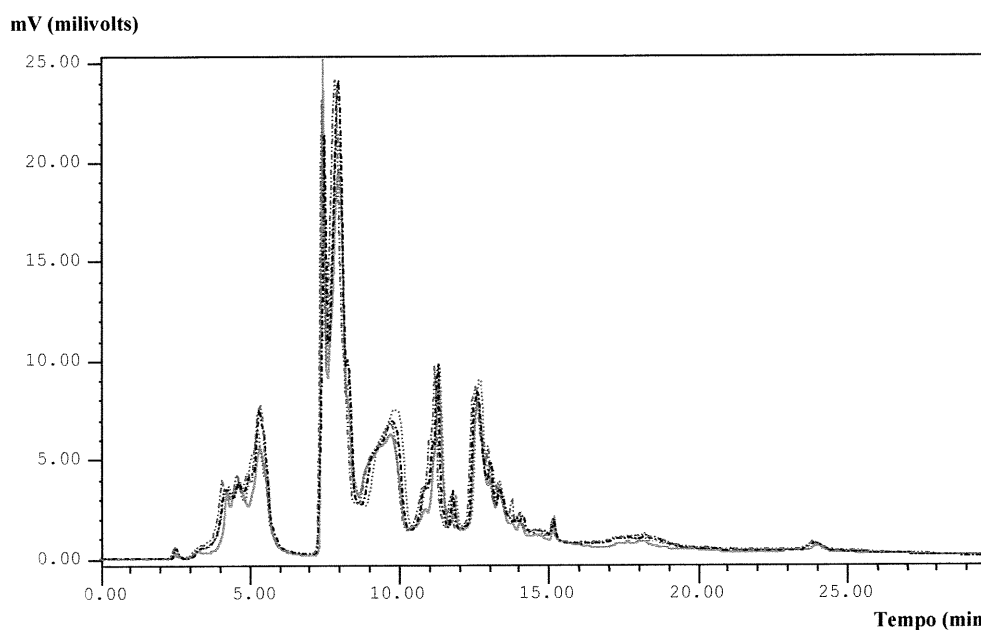


Figura 1.1: Comparação dos cromatogramas das cinco réplicas de extractos de hemolinfa do *Carcinus maenas* na fase de muda D<sub>3</sub>.

#### b) Quantificação dos ecdisteróides

Os ecdisteróides totais, bem como os resultantes da separação cromatográfica foram doseados nas diferentes fases do ciclo da muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>).

A quantificação dos ecdisteróides totais foi efectuada nas três réplicas de cada fase da muda. As fases de pós-muda (fases A e B) apresentam ecdisteróides totais em menores quantidades, registando-se valores ligeiramente superiores na fase de intermuda (fase C) e nas fases iniciais da pré-muda (fases D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>). A transição do início para o final da pré-muda (fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) é acompanhada por um aumento brusco dos ecdisteróides totais, registando-se um pico da concentração destas hormonas na fase D<sub>3</sub> (Quadro 1.1 e Fig. 1.2).

Quadro 1.1: Ecdisteróides totais (ng ecdisona eq./mL) na hemolinfa para as diferentes fases da muda, em *Carcinus maenas*.

Fase do Ciclo da Muda	Ecdisteróides totais $\pm$ desvio padrão (ng ecdisona eq./mL)
A	9,78 $\pm$ 2,91
B	7,18 $\pm$ 3,26
C	15,86 $\pm$ 6,95
D <sub>0</sub>	16,44 $\pm$ 4,41
D <sub>1</sub>	45,12 $\pm$ 17,64
D <sub>2</sub>	210,32 $\pm$ 84,37
D <sub>3</sub>	306,78 $\pm$ 42,40

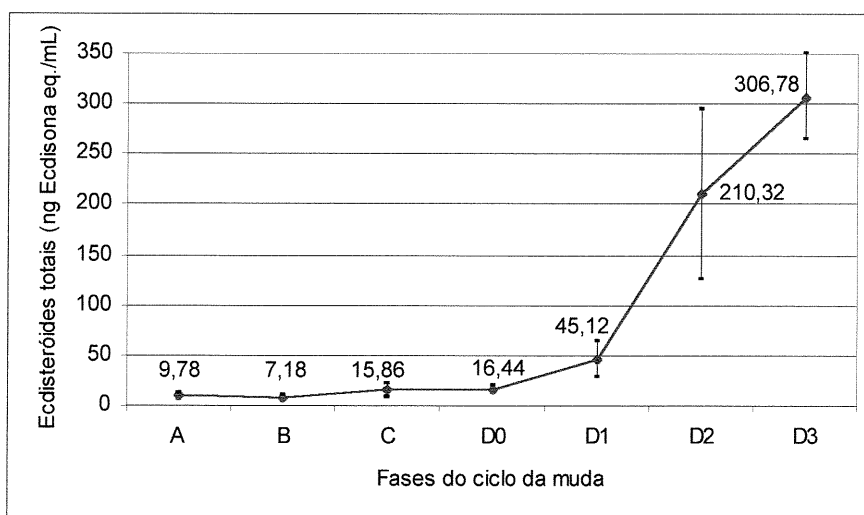


Figura 1.2: Perfil dos ecdisteróides totais (ng de ecdisona equivalente/mL) na hemolinfa de caranguejo verde *Carcinus maenas* (barras verticais representam os valores de desvio padrão).

A análise das concentrações totais de ecdisteróides em cada uma das fases da muda apresentou diferenças significativas (ANOVA unifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 1.1). Estas diferenças advêm dos valores bastante mais elevados de ecdisteróides registados nas fases finais da pré-muda ( $D_2$  e  $D_3$ ), sendo estes significativamente superiores às concentrações de ecdisteróides totais observadas em todas as outras fases do ciclo da muda (Teste de Tukey, Tab. 1.2). Apesar de na fase  $D_1$  já se registar um aumento considerável dos níveis de ecdisteróides relativamente à intermuda, essa diferença não é significativamente superior às fases de pós-muda (A e B), intermuda (C) ou à fase  $D_0$  (Teste de Tukey, Tab. 1.2).

Tabela 1.1: Resumo da análise de variância (ANOVA) unifactorial – fases da muda - relativamente às concentrações de ecdisteróides ( $p < 0,05$  – azul – diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Fases da muda	6	261165,68	43527,61	32,79	0,0000002	2,85
Erro	14	18585,83	1327,56			
Total	20	279751,51	44855,17			

Tabela 1.2: Tabela resultante do teste de Tukey referente às fases da muda após análise das concentrações de ecdisteróides por ANOVA unifactorial ( $p < 0,05$  – azul – diferença significativa).

	Fase A	Fase B	Fase C	Fase D0	Fase D1	Fase D2	Fase D3
(média)	9,78	7,18	20,03	16,44	45,12	210,32	306,78
Fase A		1,0000	0,9998	1,0000	0,8876	0,0003	0,0002
Fase B	1,0000		0,9993	0,9999	0,8522	0,0003	0,0002
Fase C	0,9998	0,9993		1,0000	0,9756	0,0004	0,0002
Fase D0	1,0000	0,9999	1,0000		0,9540	0,0004	0,0002
Fase D1	0,8876	0,8522	0,9756	0,9540		0,0012	0,0002
Fase D2	0,0003	0,0003	0,0004	0,0004	0,0012		0,0679
Fase D3	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0679	

Das diferentes fracções obtidas na separação por HPLC foram quantificadas por EIA as fracções correspondentes a tempos de retenção das hormonas ecdisona (E) e 20-hidroiecdisona (20-OHE). Em todas as fases do ciclo da muda foram quantificadas estas duas hormonas com excepção da fase A, na qual o número reduzido de animais capturados não permitiu obter material biológico suficiente para fazer a separação por HPLC e, conseqüentemente, a quantificação pretendida. A quantificação da ponasterona A (25-

deoxi-20-hidroxiectidisona) apenas foi efectuada na fase C. Uma vez que apenas 43% desta hormona é reconhecida através deste método (Porcheron *et al.*, 1989), pretendeu-se verificar se esta hormona era ou não detectável através do referido método e se apresentava valores elevados (Quadro 1.2).

Quadro 1.2: Quantificação dos diferentes ecdisteróides, na hemolinfa de *C. maenas*, nas diferentes fases da muda (na fase A não foram quantificadas devido à inexistência de material biológico suficiente).

	20-OH-Ecdisona (ng ecdisona eq./mL)	Ecdisona (ng ecdisona eq./mL)	Ponasterona A (ng ecdisona eq./mL)
B	4,04	0,84	
C	0,12	0,38	0,016
D <sub>0</sub>	9,20	3,20	
D <sub>1</sub>	22,81	1,53	
D <sub>2</sub>	51,56	1,25	
D <sub>3</sub>	121,38	8,82	

A quantificação dos dois principais ecdisteróides em estudo – 20-OHE e ecdisona – foi efectuada em todas as fases do ciclo, com excepção para a fase A. Apenas na intermuda se verificaram níveis superiores de ecdisona relativamente à 20-OHE. Em todas as restantes fases (pós-muda e pré-muda), a 20-OHE apresentou valores mais elevados. O perfil apresentado pela 20-OHE ao longo do ciclo da muda é semelhante ao dos ecdisteróides totais, isto é, valores baixos na pós-muda e na intermuda, representando os níveis registados na pré-muda inicial (D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>) a transição para o pico máximo registado na fase D<sub>3</sub> (Fig. 1.3). Por sua vez, o perfil da ecdisona apresenta duas diferenças relativamente aos perfis anteriormente descritos: - subida da concentração de ecdisona na fase D<sub>0</sub> seguida de uma descida para valores semelhantes à intermuda nas fases D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>; - apesar do valor mais elevado ser registado na última fase de pré-muda (D<sub>3</sub>), o pico verificado não é tão significativo como o registado quer nos ecdisteróides totais quer na 20-OHE (Fig. 1.4).

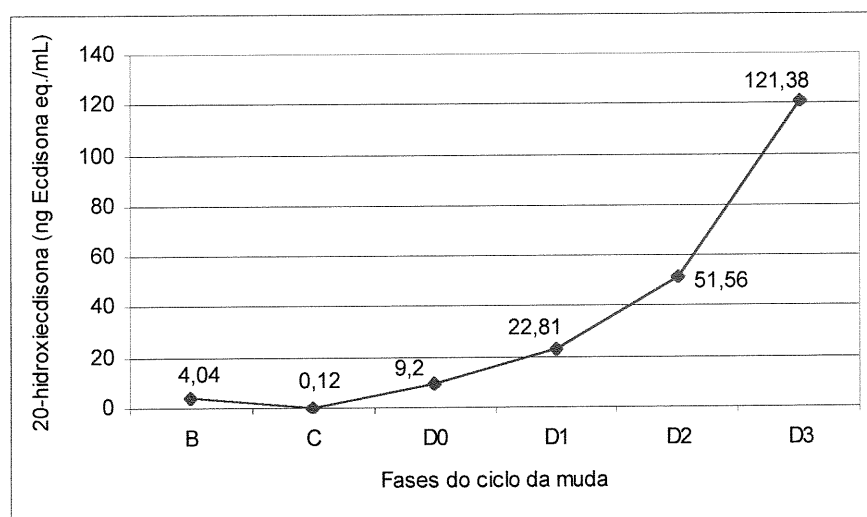


Figura 1.3: Perfil da concentração de 20-hidroxicdisona (ng ecdisona eq./mL) na hemolinfa do caranguejo verde *Carcinus maenas*.

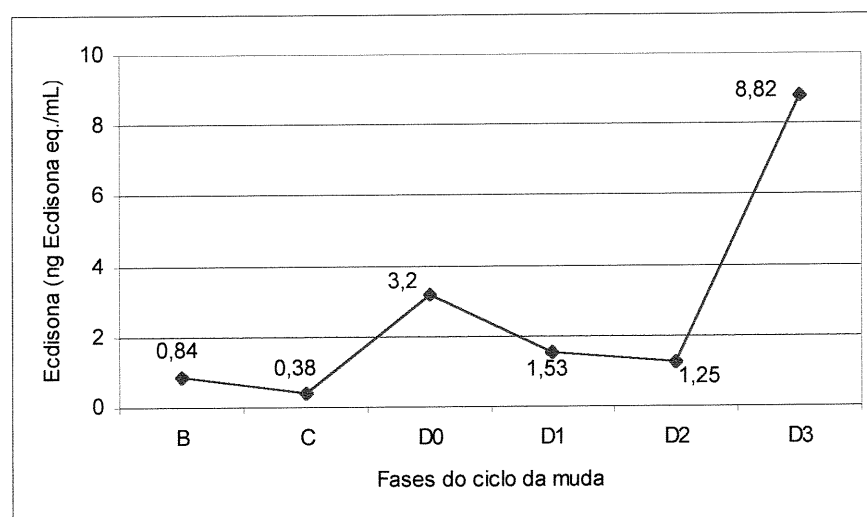


Figura 1.4: Perfil da concentração de ecdisona (ng de ecdisona eq./mL) na hemolinfa do caranguejo verde *Carcinus maenas*.

#### 4. DISCUSSÃO

A quantificação dos ecdisteróides totais na hemolinfa do caranguejo verde (*Carcinus maenas*) mostrou a existência de um aumento drástico destes compostos na parte final do estágio de pré-muda (fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) (Fig. 1.2). Os valores mais baixos foram observados nas fases do estágio de pós-muda (fase A – 9,78 ng/mL; fase B – 7,18 ng/mL). O valor registado na fase C (15,86 ng/mL) representa uma transição entre as fases de pós-muda (valores mais baixos) e as fases de pré-muda (valores mais elevados), apresentando,

no entanto, valores cerca de 20 vezes menores relativamente ao pico máximo registado na fase D<sub>3</sub> (306,78 ng/mL) (Fig. 1.2).

A presença de níveis baixos de ecdisteróides nas fases de pós-muda foram registados em diversas espécies de crustáceos (*Pachygrapsus crassipes* – Chang, 1991; *Palaemon serratus* – Baldaia *et al.*, 1984; *Siriella armata* – Cuzin-Roudy *et al.*, 1989; *Astacus leptodactylus* – Durliat *et al.*, 1988; *Penaeus monodon* – Kuo e Lin, 1996; *Callinectes sapidus* – Lee *et al.*, 1998; *Penaeus japonicus* – Okumura *et al.*, 1989). Dependendo das espécies, a variação dos níveis de ecdisteróides apresenta uma subida (Kuo e Lin, 1996; Durliat *et al.*, 1988; Okumura *et al.*, 1989) ou descida (Lee *et al.*, 1998) entre as fases de pós-muda e a intermuda. Um estudo realizado por Andrieux e colaboradores (1981) com *C. maenas* em intermuda (fase C) registou um valor (59,5 ng/mL) de ecdisteróides bastante superior comparativamente aos dados obtidos neste trabalho (15,86 ng/mL), podendo essa diferença dever-se à utilização de diferentes métodos analíticos (extracção, purificação, separação, quantificação). De forma inversa, o caranguejo *Callinectes sapidus* (Lee *et al.*, 1998) e o camarão *Penaeus monodon* (Kuo e Lin, 1996) apresentam valores de ecdisteróides muito inferiores ao registado neste estudo.

Em todos os trabalhos realizados, com diversas espécies de crustáceos, foram observados, nas fases de pré-muda, picos de ecdisteróides antecipando a exuviação. O pico máximo de ecdisteróides foi geralmente detectado nas fases finais da pré-muda – fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>. Por sua vez, o caranguejo *Pilumnus hirtellus* para além do pico máximo em D<sub>2</sub>, apresenta também um pico em D<sub>0</sub> (Demeusy *et al.*, 1994). Realça-se o facto de ocorrer uma queda acentuada dos níveis de ecdisteróides pouco antes da exuviação em todas as espécies estudadas (Baldaia *et al.*, 1984; Durliat *et al.*, 1988; Okumura *et al.*, 1989; Demeusy *et al.*, 1994). Neste estudo, realizado com *Carcinus maenas*, também se regista uma diminuição abrupta dos ecdisteróides entre a última fase (D<sub>3</sub> = 306,78 ng/ml) da pré-muda e a primeira fase (A = 9,78 ng/ml) da pós-muda. No entanto, não é possível afirmar se essa diminuição dos ecdisteróides circulantes ocorre antes, durante ou após a exuviação pois não foi quantificada a concentração de ecdisteróides nesses momentos específicos do ciclo da muda.

A quantificação dos principais ecdisteróides envolvidos no ciclo da muda (ecdisona e 20-OHE) demonstrou que a hormona da muda activa é a mais abundante, na hemolinfa de *Carcinus maenas*, em todas as fases da muda com excepção da fase C (Quadro 1.2).

Este facto não foi registado por Lachaise e Lafont (1984) que, estudando o *C. maenas*, detectaram um valor de ponasterona A (350 pmol/mL) superior ao registado para a 20-OHE (250 pmol/mL) na pré-muda. Na fase C registaram-se níveis de ecdisona ligeiramente superiores aos da 20-OHE, registando ambas as hormonas valores extremamente baixos (ecdisona = 0,38 ng/mL; 20-OHE = 0,12 ng/mL). O registo da predominância da hormona 20-OHE foi também constatado em *Penaeus monodon* (Kuo e Lin, 1996) e *Penaeus japonicus* (Okumura *et al.*, 1989). Em ambas as espécie atrás referidas os valores de ecdisona variam entre 0,3 e 5 ng/mL, estando de acordo com os registos em *Carcinus maenas* deste trabalho, com excepção da fase D<sub>3</sub> onde apenas se registou 8,82 ng/mL de ecdisona. No presente estudo, a quantificação da ponasterona A apenas foi realizada na fase C, na qual apresentou um valor extremamente baixo (0,016 ng/mL). Este valor bastante baixo está de acordo com o resultado obtido por Lachaise e Lafont (1984) com a mesma espécie, onde não foi detectada ponasterona A em caranguejos na intermuda (fase C). No entanto, como já foi referido anteriormente, estes autores constataram que a ponasterona A (350 pmol/mL) era a hormona mais abundante na pré-muda (ecdisona = 25 pmol/mL; 20-OHE = 250 pmol/mL). A realização de experiências com *Carcinus maenas* permitiu a Lachaise e Lafont (1984) concluírem que a ponasterona A estava presente nas fases de pré-muda, levantando a hipótese desta ser um potencial precursor da 20-OHE (a 25-hidroxilação da ponasterona A origina a 20-OHE).

Com base nos resultados do presente estudo, confirma-se a importância da hormona da muda activa (20-OHE) no ciclo da muda em geral e na preparação da exuviação em particular (20-OHE representa cerca de 40% dos ecdisteróides circulantes na fase D<sub>3</sub>).

Os perfis apresentados pela 20-OHE (Fig. 1.3) e pela ecdisona (Fig. 1.4) são semelhantes em *C. maenas*, em *Penaeus monodon* (Kuo e Lin, 1996) e em *Penaeus japonicus* (Okumura *et al.*, 1989). Estes perfis coincidem também com o perfil de ecdisteróides totais (Fig. 1.2) onde se verificam valores mais baixos na pós-muda e intermuda e valores bastante mais elevados na pré-muda.

**PARTE II – EFEITO DE ESTÍMULOS  
HORMONAIS E/OU QUÍMICOS NA  
FREQUÊNCIA DE MUDA DE *Carcinus  
maenas***





## **CAPÍTULO 2**

**Determinação do LT50 na exposição permanente  
ao ar do caranguejo *Carcinus maenas***



## 1. INTRODUÇÃO

Ao contrário da maioria dos animais, os crustáceos possuem a capacidade de respirar quer em ambiente terrestre quer em ambiente aquático. No entanto, quando expostos ao ar por longos períodos de tempo, estes organismos aquáticos necessitam de controlar as suas perdas de água. A taxa de desidratação depende, além da espécie, da humidade relativa, da temperatura ambiente e do tamanho corporal. Algumas espécies intertidais, tais como o caranguejo verde (*Carcinus maenas*), apresentam adaptações estruturais e fisiológicas que lhes permitem resistir a longos períodos de exposição ao ar (Johnson & Uglow, 1985; Taylor & Butler, 1978). Estas adaptações permitem aos caranguejos verdes sair do meio aquático para o meio terrestre quando expostos a condições adversas (altas temperaturas ou baixos níveis de oxigénio) no meio aquático (Taylor e Whiteley, 1989). Dependendo da espécie, o período de tempo durante o qual o animal consegue sobreviver à exposição ao ar é variável. Por exemplo, o lavagante *Homarus americanus*, animal predominantemente subtidal, sobrevive entre 72 a 96 horas após ser retirado do meio aquático (Taylor e Whiteley, 1989).

A exposição ao ar provoca alterações importantes a nível interno, nomeadamente fenómenos de hipoxia (diminuição do conteúdo de oxigénio) e hipercápnia (aumento do conteúdo de dióxido de carbono) (Taylor e Whiteley, 1989). A exposição ao ar de *Carcinus maenas* durante 3 horas, resultou em diminuições de cerca de 70% da pressão parcial de oxigénio e do conteúdo em oxigénio da hemolinfa (Taylor e Butler, 1978). Por sua vez, o lavagante *Homarus americanus* apresenta uma quebra de 40% e 76% no conteúdo em oxigénio e na pressão parcial de oxigénio, respectivamente, após três horas de exposição ao ar. Nesta mesma espécie, após 14 horas de exposição ao ar, o conteúdo em oxigénio na hemolinfa é repostado até aos valores existentes em submersão, mas mantém-se uma hipoxia sistémica (Taylor e Whiteley, 1989).

Nesta experiência procurou-se determinar o valor de LT50 (tempo letal mediano - período de tempo necessário para que 50% dos animais sujeitos a um determinado tratamento morram), para os quatro grupos de estudo (Machos/Arrasto (MA), Fêmeas/Arrasto (FA), Machos/Nassas (MN) e Fêmeas/Nassas (FN)), quando se submetem os caranguejos (*Carcinus maenas*) a uma exposição permanente ao ar. O principal objectivo desta determinação é obter dados para o planeamento da experiência seguinte – “Estudo dos efeitos da exposição ao ar no ciclo da muda do caranguejo *Carcinus maenas*”

(capítulo 3). Para além disso, pretendeu-se também identificar possíveis diferenças entre os quatro grupos de estudo relativamente à resistência à exposição aérea.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta experiência foram utilizados 176 animais, dos quais 32 eram Machos/Nassas (MN), 48 Fêmeas/Nassas (FN), 48 Machos/Arrasto (MA) e 48 Fêmeas/Arrasto (FA). Os animais foram distribuídos por oito caixas, duas réplicas de 24 animais para cada um dos grupos de estudo (com excepção dos machos/nassas onde as réplicas foram de apenas 16 caranguejos, pois foram capturados poucos animais neste grupo de estudo), que foram mantidas sem água na estação experimental.

A experiência decorreu durante os dias necessários para que fosse possível determinar o valor de LT50 para cada um dos grupos de estudo. Durante o período experimental, a temperatura média do ar registada foi de  $15,22 \pm 1,27$  °C. Uma vez que estes animais não se alimentam nestas condições, optou-se por não fornecer alimento durante o período experimental.

Nesta experiência registou-se o número de animais mortos bem como a existência de mudas. Este registo foi efectuado em todas as caixas diariamente.

A determinação dos valores de LT50 implicou a utilização da transformação PROBIT (ver pág. 72), seguida da execução de uma regressão linear. Nesta experiência foram registados vários “0%” e “100%”, isto é, observações em que a mortalidade foi nula e total, respectivamente. Uma vez que, na transformação PROBIT quer os 0% quer os 100% não apresentam significado (não é atribuído nenhum valor de probit a estes valores), optou-se por excluir esses valores da análise estatística. Finalmente, o valor final de LT50 corresponde ao valor médio obtido a partir dos valores de LT50 calculados em cada uma das réplicas (duas) de cada grupo de estudo.

## **3. RESULTADOS**

Os caranguejos machos capturados por nassas (MN) registaram os valores de mortalidade mais baixos durante um maior período de tempo relativamente a todos os outros grupos de estudo (fig. 2.1). Os animais do grupo de estudo MN foram os que apresentaram uma maior resistência à exposição ao ar, levando a que se registasse um

valor médio de LT50 de  $8,78 \pm 0,91$  dias (Anexo XI). Durante todo o período experimental não se registaram quaisquer mudas.

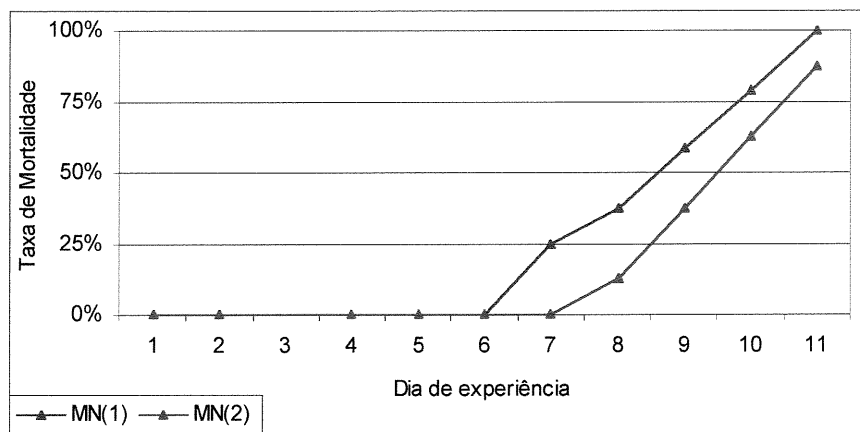


Figura 2.1: Variação da taxa de mortalidade cumulativa durante o período experimental, nas duas réplicas dos machos/nassas (MN).

Os machos capturados por arrasto (MA) apresentaram também valores de mortalidade relativamente baixos no início da experiência. Apesar disso, as mortalidades foram superiores às registadas para os machos/nassas, resultando num valor de LT50 inferior ao dos MN. O valor de LT50 dos MA foi  $7,21 \pm 0,76$  dias (Anexo XII). À semelhança do grupo MN, também nos MA não foram registadas quaisquer mudas.

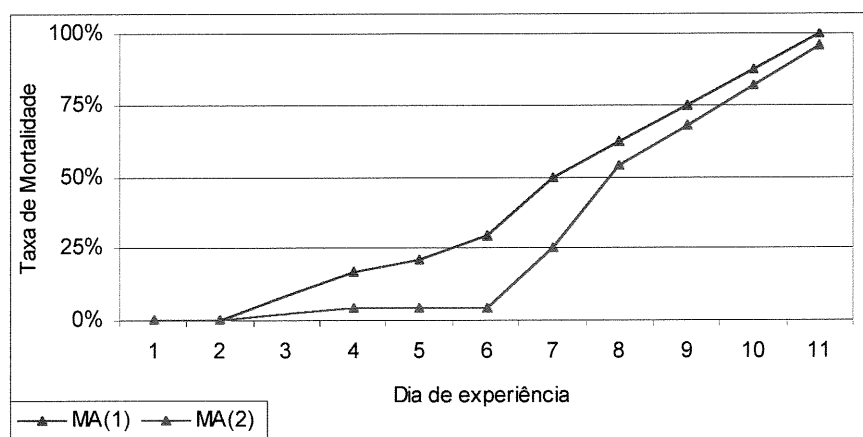


Figura 2.2: Variação da taxa de mortalidade cumulativa durante o período experimental, nas duas réplicas dos machos/arrasto (MA).

Ambos os grupos de estudo constituídos por fêmeas (FN e FA) apresentaram aumentos na mortalidade após um menor número de dias de experiência do que no caso dos grupos de estudo constituídos por machos (MN e MA) (fig. 2.3 e 2.4). Os valores de LT50 das FN ( $6,04 \pm 0,04$  dias – Anexo XIII) e FA ( $6,22 \pm 0,46$  dias – Anexo XIV) foram muito semelhantes. De forma idêntica ao observado para os grupos de estudo constituídos por machos (MN e MA), também nas fêmeas (FN e FA) não se registraram quaisquer mudas.

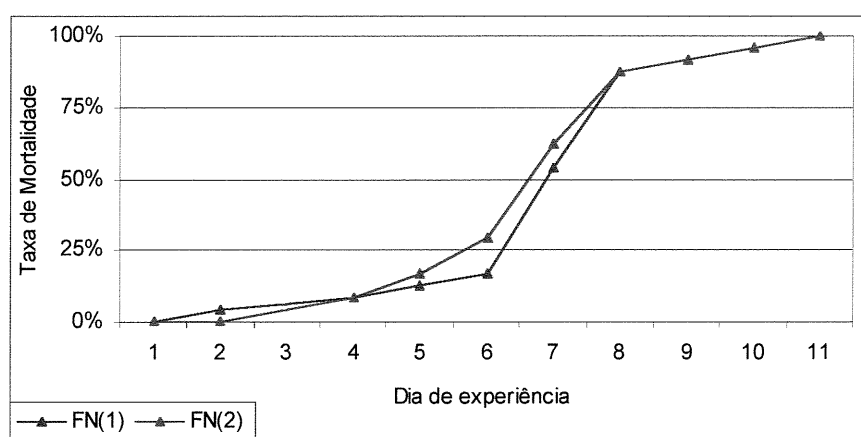


Figura 2.3: Variação da taxa de mortalidade cumulativa durante o período experimental, nas duas réplicas das fêmeas/nassas (FN).

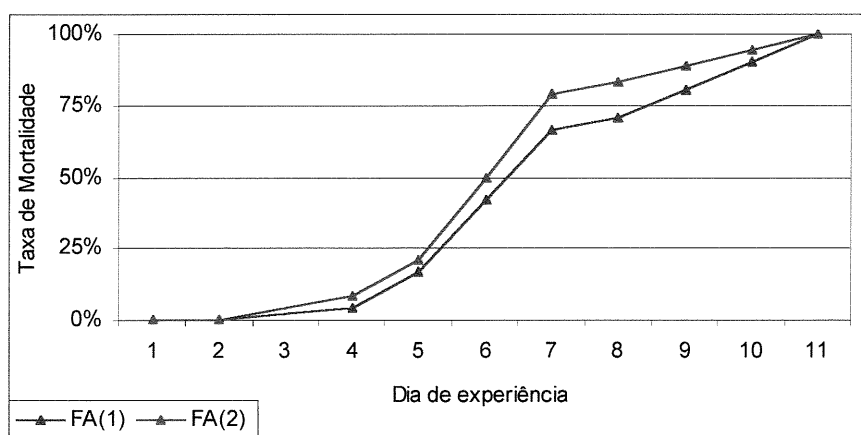


Figura 2.4: Variação da taxa de mortalidade cumulativa durante o período experimental, nas duas réplicas das fêmeas/arrasto (FA).

#### 4. DISCUSSÃO

Não foram registadas quaisquer mudas em todos os grupos de estudo, facto que é compreensível pois não existem condições para que tal ocorra. Assim, como os caranguejos não estão submersos na água não lhes é possível efectuar a absorção de água, processo fundamental para que ocorra a exuviação. Os resultados obtidos permitiram verificar que os caranguejos machos apresentaram valores médios de LT50 (entre 7 e 9 dias), para exposição ao ar, ligeiramente superiores relativamente às fêmeas (6 dias). Os animais mais resistentes foram os machos provenientes das capturas com nassas (8,78 dias) enquanto os menos resistentes foram os caranguejos fêmeas obtidos através da captura com nassas (6,04 dias). Apesar de nos caranguejos fêmeas não se terem registado diferenças entre os animais capturados por arrasto e por nassas, nos machos verificou-se uma resistência superior dos capturados por nassas (8,78 dias). Os diferentes valores obtidos nas duas artes de pesca estudadas poderão ser influenciados pelo estado físico apresentado pelos animais após a sua captura, sendo que os animais arrastados sofrem um “stress” superior relativamente aos capturados com as nassas. Para além disso, um estudo de caracterização da população de *Carcinus maenas* na Ria de Aveiro (Carvalho *et al.*, 1999) permitiu concluir que os animais capturados com nassas são mais activos que os capturados com arrasto. O facto dos animais capturados com nassas serem mais activos pode estar directamente relacionado com a existência de uma quase totalidade de caranguejos na fase C, os quais procuram activamente alimento. Ao contrário, nos animais capturados por arrasto, existem alguns caranguejos que não apresentam muita actividade pois estão em fases de pré-muda final (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) e pós-muda (A e B), altura do ciclo da muda em que o caranguejo deixa de se alimentar.

Os resultados obtidos, a uma T<sub>ar</sub> de 15,22 ± 1,27 °C, confirmam os resultados obtidos por Johnson & Uglow (1985) com *C. maenas*, onde não foi registada qualquer morte num período de 24 horas, a 15°C. O lavagante *Homarus americanus* (animal subtidal) apresenta uma sobrevivência entre 72 e 96 horas quando exposta permanentemente ao ar (Taylor e Whiteley, 1989). Uma vez que o *Carcinus maenas* é um animal predominantemente intertidal espera-se que apresente uma maior resistência à exposição aérea do que o lavagante. Os dados obtidos neste trabalho, onde os valores de LT50 variaram entre 144 (6 dias) e 216 horas (9 dias), comprovam a elevada resistência do caranguejo verde à exposição ao ar.



Como já foi referido anteriormente, a execução desta experiência permitiu determinar os valores de LT50 para cada um dos grupos de estudo, fornecendo desta forma dados importantes para o delinear da experiência seguinte, nomeadamente na definição da duração dos períodos de exposição ao ar.

## **CAPÍTULO 3**

**Estudo do efeito da exposição ao ar na  
frequência de muda do caranguejo verde  
*Carcinus maenas***



## 1. INTRODUÇÃO

A exposição ao ar provoca fenómenos de hipoxia (diminuição do conteúdo de oxigénio) e hipercápnia (aumento do conteúdo de dióxido de carbono) no sangue dos crustáceos (Taylor e Whiteley, 1989). Vários trabalhos foram realizados de forma a verificar as respostas fisiológicas de diferentes espécies de crustáceos à hipoxia. Nestes estudos houve uma maior incidência nos efeitos da hipoxia na fisiologia respiratória (camarão *Palaemon elegans* – Morris e Taylor, 1985; lagostas *Munida rugosa* e *Munida sarsi* – Zainal *et al.*, 1992). Para além disso foram também estudadas as respostas a variações ambientais de hipoxia de *Carcinus maenas* com duas colorações da carapaça distintas (verde e vermelha) (Reid e Aldrich, 1989). Nesta espécie são ainda conhecidos os efeitos da hipoxia ao nível do balanço ácido-base e da regulação iónica (Truchot, 1980; Johnson e Uglow, 1985).

Por vezes, os caranguejos habitam locais sujeitos a variações ambientais acentuadas (temperatura, salinidade, exposição ao ar), o que implica a necessidade de controlar o equilíbrio ácido-base nos líquidos corporais de forma a manter a homeostase (Truchot, 1980; Truchot, 1988). Neste tipo de habitats os níveis de oxigénio dissolvido variam bastante, atingindo por vezes situações de hipoxia (Johnson e Uglow, 1985). A exposição ao ar provoca também situações de hipoxia nestes animais, provocando fortes alterações ao nível do equilíbrio ácido-base, nomeadamente acidoses respiratórias (aumento da concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ )) e metabólicas (aumento de hidrogénios ( $\text{H}^+$ )) que combinadas reduzem o pH da hemolinfa (Taylor e Whiteley, 1989). No decurso do ciclo da muda verificam-se alterações importantes no equilíbrio ácido-base, tanto na hemolinfa como no chamado líquido da muda, coincidindo a pré-muda com uma acentuada acidose metabólica (Coimbra *et al.*, 1985). O estudo da espécie *Palaemon serratus* permitiu identificar períodos de alcalose metabólica (após a muda até à fase C) e acidose metabólica (em  $\text{D}_0$  e na exuviação) (Coimbra *et al.*, 1985). Na exuviação, a acidose metabólica (aumento de  $\text{H}^+$ ) é acompanhada por uma acidose respiratória (aumento da concentração do  $\text{CO}_2$ ), isto porque a libertação do “velho” exosqueleto implica a renovação das brânquias e das escafognatites (exopóditos – produzem a corrente respiratória através das câmaras branquiais). Apesar de já existirem novas brânquias formadas por baixo da “velha” cutícula, os seus tecidos necessitam de algum tempo para ficarem suficientemente espessos para funcionar correctamente. Neste período de tempo,

as alterações sofridas ao nível do sistema respiratório impedem a normal difusão do oxigénio e a deterioração da bombagem por parte das escafognatites. Para além disso, a entrada de água aquando da exuvia dilui o sangue fazendo com que haja uma diminuição da capacidade de transporte do oxigénio (Clemens *et al.*, 1999).

Clark (1986) constatou que a espécie *Penaeus semisulcatus* quando submetida a baixos níveis de oxigénio (hipoxia) não realizava a muda (ecdysis) e apresentava uma elevada mortalidade. Após o aumento dos níveis de oxigénio para níveis normais, o mesmo autor registou que a taxa de mortalidade diminuía e ocorria um considerável número de mudas. Tendo em conta estes dados, Clark (1986) avança a hipótese destes animais em condições adversas (hipoxia) não realizarem a ecdysis, estabilizando numa fase do ciclo da muda que lhes permite mudar assim que as condições ambientais são favoráveis.

Esta experiência teve como objectivo avaliar a resposta dos diferentes grupos de estudo (MA, FA, MN e FN) do caranguejo verde a diferentes períodos de exposição ao ar ao nível da frequência de muda.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A duração dos diferentes períodos de exposição ao ar foram estabelecidos tendo em conta os resultados obtidos na experiência “Determinação do LT50 na exposição permanente ao ar do caranguejo verde *Carcinus maenas*” (Capítulo 2). Na referida experiência, os valores médios de LT50 (tempo letal mediano) variaram entre os seis e os nove dias. Inicialmente, de acordo com os dados obtidos, calculou-se o valor médio total de LT50 em cada um dos quatro grupos de estudo, tendo-se posteriormente calculado o valor médio total de LT50. Uma vez que o valor médio total de LT50 foi 7,06 dias, optou-se pela utilização de períodos de exposição entre 24 horas (controlo) e 168 horas (7 dias), com intervalos de 24 horas.

Nesta experiência foram utilizados 1334 animais, dos quais 240 eram MN (machos/nassas), 336 FN (fêmeas/nassas), 384 MA (machos/arrasto) e 384 FA (fêmeas/arrasto). O controlo deste ensaio era constituído por duas caixas de caranguejos (48 animais), nas quais foi colocada água a circular desde o início do ensaio (0 horas de exposição). Os caranguejos foram distribuídos de acordo com sete períodos diferentes de exposição ao ar (24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 168 horas), tendo-se efectuado duas réplicas por cada período (48 animais, 24 animais/caixa). No fim

de cada um dos períodos de exposição respectivos a circulação de água no interior das caixas foi reposta.

Num estudo anterior (Carvalho *et al.*, 1999), constatou-se que os diferentes estádios da muda apresentavam proporções distintas consoante a arte de pesca utilizada na captura dos caranguejos. Desse estudo realça-se o facto de nos caranguejos capturados por arrasto terem sido identificados animais em todos os estádios de muda (pós-muda, intermuda e pré-muda) enquanto que nos capturados por nassas a quase totalidade dos caranguejos estava em intermuda (fase C). Nos caranguejos utilizados nesta experiência verificou-se uma situação semelhante. Assim, os caranguejos capturados por arrasto apresentaram 10,5% de animais em pós-muda (fases A e B), 75,0% em intermuda (fase C), 13,0% em pré-muda inicial (fases D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>) e 0,5% em pré-muda final (fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Por sua vez, os caranguejos capturados através de nassas apresentaram 0,5% de animais em pós-muda, 89,5% em intermuda, 10,0% em pré-muda inicial e 0% em pré-muda final.

A experiência teve uma duração total de 30 dias, incluindo os períodos de exposição ao ar, tendo-se registado diariamente o número de mortos e o número de mudas em todas as caixas. Durante o período experimental foi registada uma temperatura média do ar de  $17,09 \pm 1,81$  °C, uma humidade relativa média do ar de  $75,10 \pm 4,42\%$ , uma temperatura média da água de  $17,50 \pm 1,74$  °C, uma salinidade média de  $22,84 \pm 3,98$  ‰ e um conteúdo médio em oxigénio dissolvido de  $7,98 \pm 0,67$  mg/L.

Nesta experiência foram considerados três factores distintos: o sexo (machos e fêmeas), a arte de pesca (arrasto e nassas) e o tratamento (diferentes períodos de exposição). Para efectuar a análise estatística dos resultados realizou-se uma ANOVA trifactorial considerando os três factores referidos como factores independentes e a taxa de mortalidade ou a frequência de muda como factor dependente (ver pag. 71). Saliente-se que a realização da análise estatística implicou a normalização dos dados através da transformação arcsen da raiz quadrada da taxa de mortalidade ou frequência de muda (arcsen (RQ mortalidade ou muda)).

### **3. RESULTADOS**

Nesta experiência foram obtidos dados relativos às taxas de mortalidade e frequências de muda de caranguejos submetidos a diferentes períodos de exposição ao ar

(entre 24 horas e 168 horas), tendo em conta os quatro diferentes grupos de estudo (MA, MN, FA e FN) (Quadro 3.1).

Quadro 3.1: Resumo das taxas de mortalidade e frequências de muda obtidos no controlo e nos diferentes períodos de exposição ao ar segundo os grupos de estudo (MA, FA, MN e FN), após 30 dias de experiência.

Controlo e Períodos De hipoxia	ARRASTO								NASSAS							
	Mortalidades (médias)				Mudas (médias)				Mortalidades (médias)				Mudas (médias)			
	Machos *		Fêmeas *		Machos *		Fêmeas *		Machos **		Fêmeas *		Machos **		Fêmeas *	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Controlo (0 h)	7,5	31,25	2,0	8,33	4,5	18,75	3,5	14,58	3,5	23,33	9,5	39,58	1,5	10,00	0,5	2,08
24 horas	7,5	31,25	5,0	20,83	2,5	10,42	1,0	4,17	1,0	6,67	6,0	25,00	1,0	6,67	0,5	2,08
48 horas	4,5	18,75	5,0	20,83	4,0	16,67	2,0	8,33	6,5	23,33	5,0	20,83	1,0	6,67	0,0	0,00
72 horas	8,0	33,33	2,5	10,42	2,5	10,42	1,0	4,17	2,0	13,33	4,5	18,75	1,5	10,00	1,5	6,25
96 horas	9,0	37,50	3,5	14,58	4,0	16,67	3,0	12,50	6,5	43,33	4,0	16,67	1,5	10,00	0,5	2,08
120 horas	3,0	12,50	9,5	39,58	4,5	18,75	2,5	10,42	12,0	80,00	7,0	29,17	0,5	3,33	0,0	0,00
144 horas	14,5	60,42	12,0	50,00	0,0	0,00	4,5	18,75	11,0	73,33	5,5	22,92	0,0	0,00	1,5	6,25
168 horas	12,5	52,08	9,5	39,58	1,5	6,25	1,5	6,25	13,5	90,00	----	----	0,0	0,00	----	----

\* - Total de 48 caranguejos.

\*\* - Total de 30 caranguejos.

## MORTALIDADE

No grupo de estudo fêmeas/nassas, os animais controlo (0 horas), ao contrário do que era esperado, foram os que registaram a taxa de mortalidade superior (39,6%) (Fig. 3.1). De todos os grupos de estudo, os caranguejos controlo (8,3%) fêmeas/arrasto registaram a taxa de mortalidade mais baixa comparativamente com os caranguejos sujeitos aos diferentes períodos de exposição (Fig. 3.2).

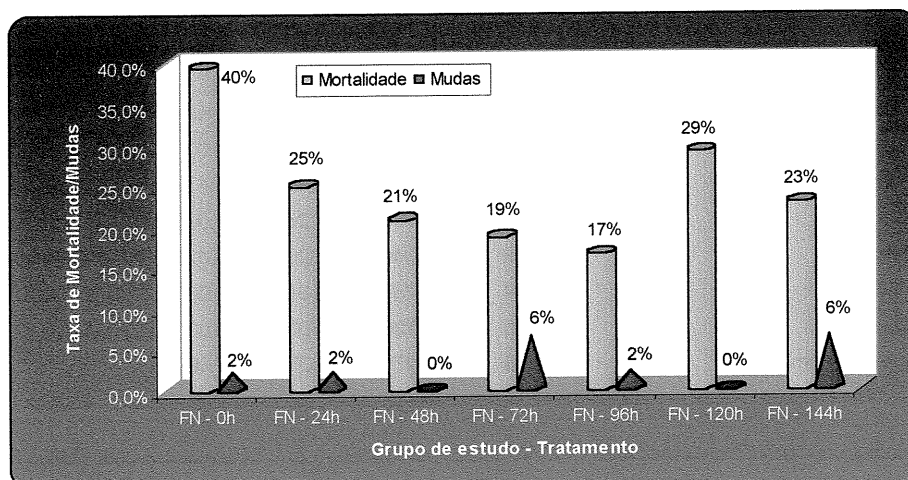


Figura 3.1: Taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 30 dias de experiência) do grupo de estudo FN (fêmeas/nassas) nos diferentes períodos de exposição ao ar (nota: o período de exposição 168h não foi efectuado devido à inexistência de animais suficientes).

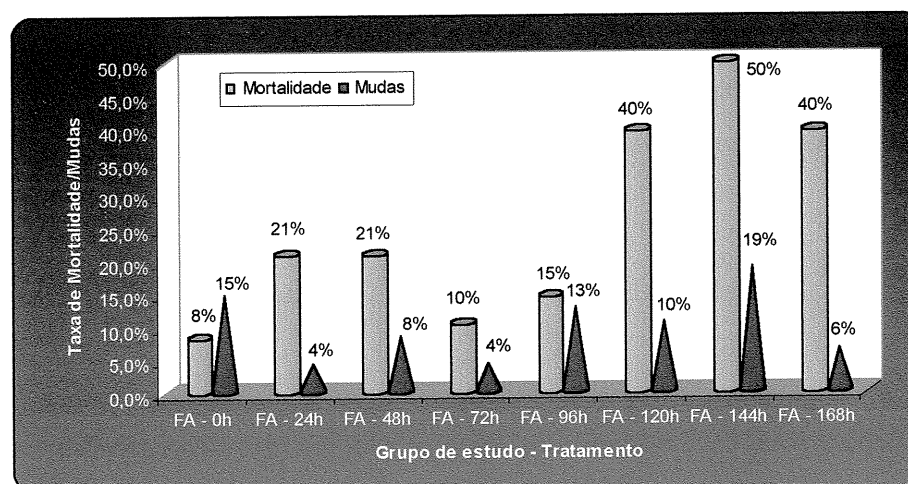


Figura 3.2: Taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 30 dias de experiência) do grupo de estudo FA (fêmeas/arrasto) nos diferentes períodos de exposição ao ar.

Os resultados obtidos nesta experiência envolveram três factores de estudo – sexo, arte de pesca e tratamento, registando-se nas taxas de mortalidade diferenças significativas no sexo e nos tratamentos, assim como na interacção dos diferentes factores em estudo (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 3.1).



Tabela 3.1: Resumo da análise de variância (ANOVA) trifatorial – sexo, arte de pesca e tratamento - relativamente à mortalidade ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,59911	0,59911	31,5965	0,000003	4,149
Arte	1	0,00450	0,00450	0,23741	0,629401	4,149
Tratamento	7	0,96481	0,13783	7,269	0,000031	2,313
Sexo - Arte	1	0,11049	0,11049	5,82685	0,021680	4,149
Sexo - Tratamento	7	0,82174	0,11739	6,19111	0,000125	2,313
Arte - Tratamento	7	0,35880	0,05126	2,70322	0,025507	2,313
Sexo - Arte - Tratamento	7	1,27898	0,18271	9,63597	0,000002	2,313
Erro	32	0,60676	0,01896			
Total	63	4,74520				

Como era esperado, os períodos de exposição mais longos (120h, 144h e 168h) apresentaram mortalidades mais elevadas (entre 40 e 90%), independentemente do grupo de estudo. No entanto, as mortalidades registadas pelos machos capturados por nassas em animais expostos 120h (80,0%), 144h (73,3%) e 168h (90,0%) foram, regra geral, significativamente superiores às mortalidades obtidas nestes e nos outros períodos de exposição dos restantes grupos de estudo (Fig. 3.3 e Anexo XV).

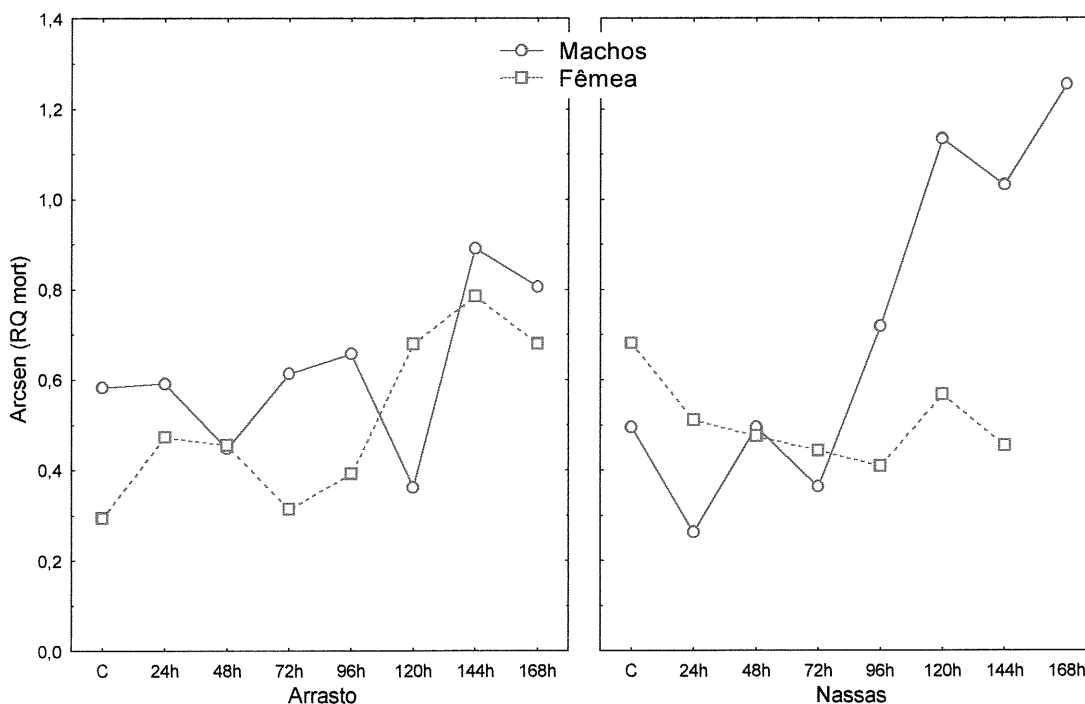


Figura 3.3: Valores transformados de taxas de mortalidade (arcsen (RQ mort)) tendo em conta o sexo, a arte de pesca e o tratamento (nota: o período de exposição 168h não foi efectuado nas fêmeas/nassas).

Os períodos de exposição 48h e 120h dos machos/arrasto, que se previa apresentarem valores de mortalidade superiores aos registados em períodos de exposição menores, registaram as mortalidades mais baixas deste grupo de estudo (18,8% e 12,5%, respectivamente) (Fig. 3.4). De igual modo, no grupo de estudo fêmeas/nassas também foi num período médio de exposição – 96h – que se registou a taxa de mortalidade inferior (16,7%), no entanto, salienta-se o facto de todos os outros períodos de exposição terem apresentado mortalidades apenas ligeiramente superiores (Fig. 3.1).

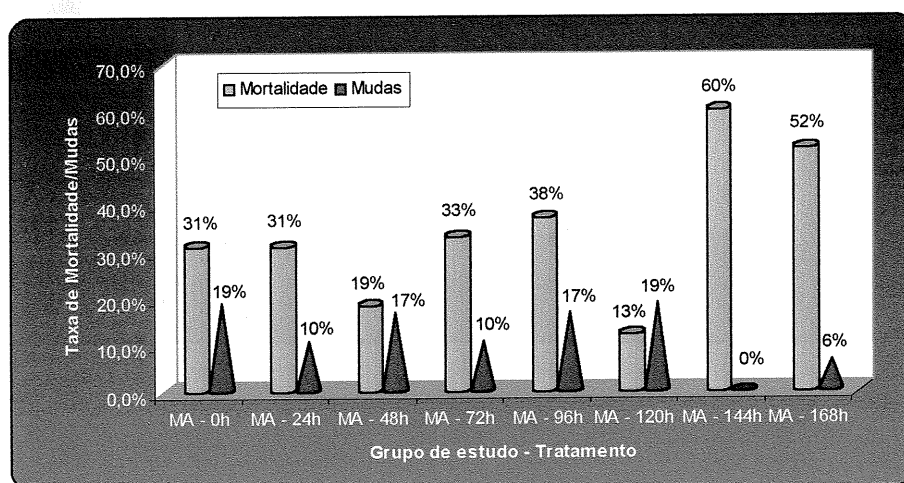


Figura 3.4: Taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 30 dias de experiência) do grupo de estudo MA (machos/arrasto) nos diferentes períodos de exposição ao ar.

Considerando apenas o factor sexo, verificou-se que os machos apresentaram taxas de mortalidade superiores às fêmeas (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 3.1), isto provavelmente devido a terem-se obtido taxas significativamente superiores nos períodos mais longos de exposição ao ar (96h, 120h, 144h e 168h) dos machos capturados com nassas (Fig. 3.1 e 3.3). Por sua vez, a comparação entre os diferentes períodos de exposição permitiram verificar que a exposição por períodos de tempo mais longos (144h e 168h) provocou taxas de mortalidade significativamente superiores aos restantes períodos de exposição, provavelmente pela mesma razão atrás referida (Fig. 3.1 e 3.3).

## MUDAS

Os caranguejos controlo (0h) machos/arrasto e machos/nassas registaram as frequências de muda mais elevadas nos seus respectivos grupos de estudo (18,8% e 10,0%, respectivamente) (Fig. 3.4 e 3.5).

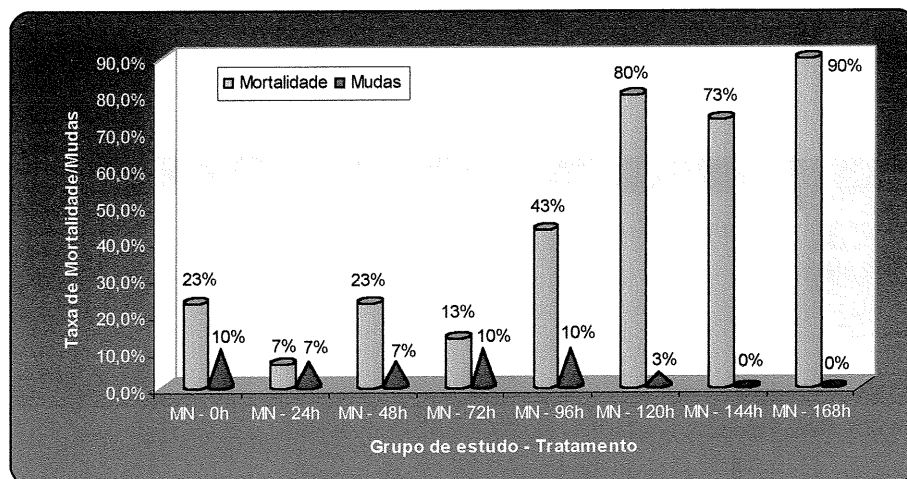


Figura 3.5: Taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 30 dias de experiência) do grupo de estudo MN (machos/nassas) nos diferentes períodos de exposição ao ar.

Considerando os três factores em estudo (sexo, arte de pesca e tratamento), verificou-se que apenas a arte de pesca e a interacção sexo-tratamento influenciaram significativamente as frequências de muda registadas (ANOVA trifactorial,  $p < 0,05$ ) (Tab. 3.2).

Tabela 3.2: Resumo da análise de variância (ANOVA) trifactorial – sexo, arte de pesca e tratamento - relativamente à frequência de muda ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,05070	0,05070	2,49176	0,124279	4,149
Arte	1	0,40834	0,40834	20,06916	0,000089	4,149
Tratamento	7	0,31107	0,04444	2,18404	0,062508	2,313
Sexo – Arte	1	0,00997	0,00997	0,49001	0,488982	4,149
Sexo – Tratamento	7	0,37449	0,05350	2,62933	0,028951	2,313
Arte – Tratamento	7	0,15435	0,02205	1,08374	0,396473	2,313
Sexo - Arte – Tratamento	7	0,03324	0,00475	0,23341	0,973930	2,313
Erro	32	0,65110	0,02035			
Total	63	1,99326				

Assim, de acordo com o que foi referido anteriormente relativamente às artes de pesca, os caranguejos dos grupos de estudo em que os animais foram capturados por arrasto evidenciaram frequências de muda significativamente superiores (11,1%) aos que foram capturados com nassas (4,1%) (Fig. 3.5 e 3.6). A frequência de muda superior (18,7%) foi registada nos períodos de exposição 144h para as fêmeas/arrasto e 120h para os machos/arrasto (Fig. 3.2 e 3.4). A interacção entre sexo e tratamento registou também diferenças significativas devido à frequência de muda dos machos expostos durante 144h ter sido significativamente inferior à registada pelo controlo (Fig. 3.5).

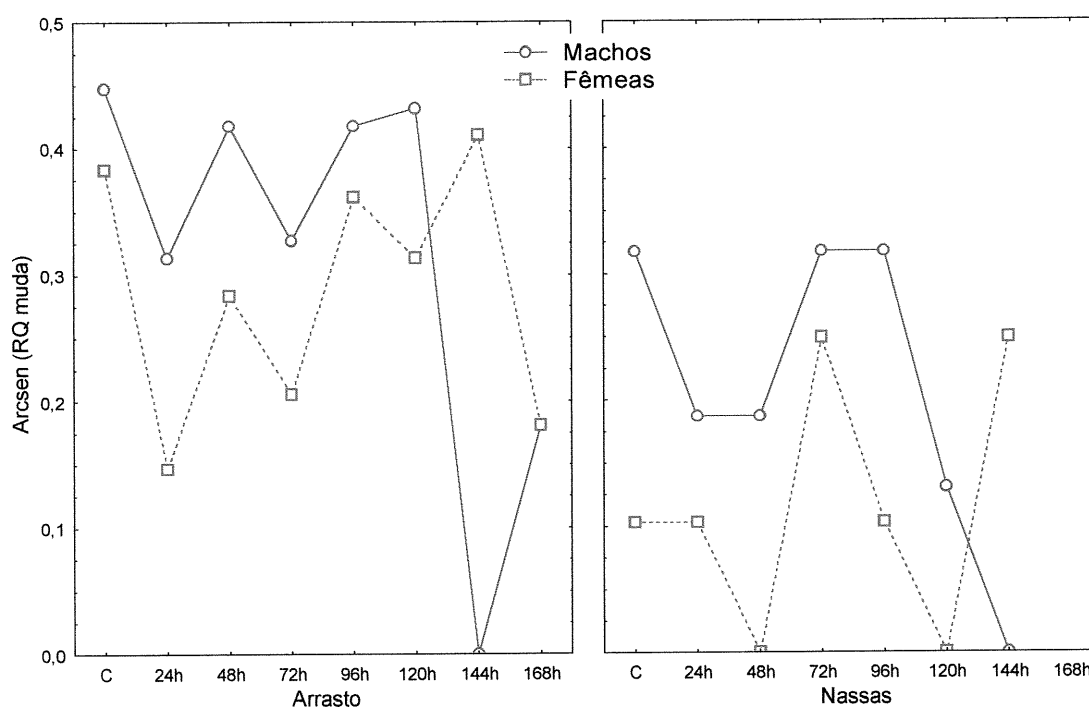


Figura 3.5: Valores transformados de frequências de muda (arsen (RQ muda)) tendo em conta o sexo, a arte de pesca e o tratamento (nota: o período de exposição 168h não foi efectuado nas fêmeas/nassas).

#### 4. DISCUSSÃO

Diversos autores, em estudos realizados em diferentes espécies de crustáceos, verificaram que a exposição ao ar provoca uma redução do oxigénio (hipoxia) na hemolinfa pós-branquial e um decréscimo do pH associado a um aumento do dióxido de carbono (*Carcinus maenas* e *Liocarcinus puber* – Taylor e Butler, 1978 e Johnson e

Uglow, 1985; *Homarus gammarus* – Taylor e Whiteley, 1989 e Clemens *et al.*, 1999). As variações de pH da hemolinfa na espécie *Palaemon serratus* mostraram ser muito acentuadas e relacionadas com o ciclo da muda. Assim, desde a pós-muda até à intermuda o pH aumenta progressivamente (alcalose metabólica), registando-se uma descida do pH (acidose metabólica) no início da pré-muda (D<sub>0</sub>). Nas fases seguintes de pré-muda dá-se uma ligeira alcalose metabólica, coincidindo a exuviação com uma acentuada acidose (Coimbra *et al.*, 1985).

Considerando que a exuviação é acompanhada por uma acentuada acidose, foi colocada a hipótese da exposição ao ar poder simular a acidose que acompanha a muda (Coimbra *et al.*, 1985; Carvalho *et al.*, 1989). A existência de fenómenos de hipoxia e/ou hipercápnia na hemolinfa nas espécies *Palaemon serratus*, *Palaemonetes varians* e *Penaeus semisulcatus* mostraram influenciar positivamente a muda (Coimbra *et al.*, 1985; Clark, 1986; Carvalho *et al.*, 1989). No entanto, será de realçar que, o facto de se expor os animais a baixos níveis de oxigénio poderá resultar em mortalidades elevadas (Clark, 1986). Apesar de tudo o que foi referido anteriormente, será importante salientar que os dados obtidos dizem respeito a três espécies de camarão, as quais apresentam um ciclo da muda com diferentes durações dos estádios (pós-muda, intermuda e pré-muda) do ciclo da muda relativamente ao caranguejo *Carcinus maenas* (nosso objecto de estudo). Como se sabe, os camarões apresentam um ciclo de muda diecdísico, ao contrário do ciclo anecdísico apresentado pelos caranguejos. O camarão, ao apresentar um ciclo de muda em que a ecdisis é mais frequente faz com que o período de pré-muda seja mais longo que o período de intermuda, verificando-se precisamente o contrário nos caranguejos, isto é, intermuda mais longa que a pré-muda (Adiyodi e Adiyodi, 1970).

Esta experiência de exposição ao ar do caranguejo *C. maenas* registou taxas de mortalidade mais elevadas nos machos, sendo as mortalidades dos períodos de exposição mais longos (96h, 120h, 144h e 168h) superiores, nomeadamente nos caranguejos capturados por nassas. Estas taxas de mortalidade diferem dos dados obtidos na experiência em que se calculou o LT50 (tempo letal mediano) para os diferentes grupos de estudo (ver Capítulo 2). A experiência de exposição permanente ao ar de caranguejos machos e fêmeas permitiu concluir que os machos (LT50 = 7 – 9 dias) seriam mais resistentes que as fêmeas (LT50 = 6 dias), o que não se verificou na actual experiência pois as taxas de mortalidade superiores foram apresentadas por caranguejos machos (entre 73 e

90%) quando expostos ao ar durante 5 a 7 dias. A diferença registada pode dever-se às diferentes condições ambientais em que se realizou cada uma das experiências, tendo-se registado uma temperatura do ar superior cerca de 2°C nesta experiência relativamente à experiência anterior (Capítulo 2). O facto da humidade relativa do ar não ter sido registada na experiência do capítulo anterior, não permite fazer uma comparação, podendo no entanto pressupor-se que a humidade tenha atingido valores inferiores pois as mortalidades foram superiores às registadas nesta experiência. Um maior número de mortalidades foram também observadas em camarões *Penaeus semisulcatus* após exposição a água com baixas concentrações de oxigénio (hipoxia) durante 17 dias, não se registando durante este período qualquer muda. Após uma subida dos níveis de oxigénio da água, a mortalidade é reduzida e o número de mudas é muito elevado (Clark, 1986).

Ao contrário do que foi verificado com a espécie *Palaemon serratus* (Coimbra et al., 1985), na actual experiência não se verificou uma indução da muda após exposição ao ar seguida de imersão em água. A espécie *Palaemon serratus* mostrou que após algumas horas de emersão são necessários 7 a 10 dias de imersão para que 80% dos animais entrem nas fases de pré-muda (Coimbra et al., 1985). Igualmente, foi descrito para a espécie *Penaeus semisulcatus* um grande número de mudas após exposição a níveis baixos de oxigénio dissolvido (hipoxia) (Clark, 1986). No presente trabalho, embora se tenham verificado frequências de muda próximas dos 20%, após 30 dias de experiência, estas não foram superiores às registadas nos animais controlo. As fêmeas capturadas por arrasto expostas ao ar durante 144h (18,8%) e os machos, também capturados por arrasto, expostos durante 120h (18,8%) apresentaram as frequências de muda mais elevadas. No entanto, estes valores foram idênticos ou apenas ligeiramente superiores aos registados pelos controlos (18,8% e 14,6%, respectivamente). Desta forma, a exposição ao ar de caranguejos *Carcinus maenas* por períodos compreendidos entre 24h e 168h, com consequente re-imersão, não mostrou ser um método de indução da muda.

No que diz respeito às frequências de muda é ainda possível salientar o facto dos caranguejos capturados por arrasto terem apresentado valores superiores aos caranguejos capturados com nassas. Considerando o que já foi referido anteriormente, isto é, que a separação dos caranguejos em duas artes de pesca resulta em dois grupos de animais com proporções distintas dos diferentes estádios do ciclo da muda (ver pág. 55), é possível realçar que nesta experiência as duas artes de pesca originaram diferenças significativas

nos resultados obtidos. Desta forma, no arrasto, onde existia uma maior diversidade de animais nas fases de pós-muda (10,5%) e pré-muda (13,5%) (ver pág. 99), obteve-se frequências de muda superiores em todos os tratamentos. Por sua vez, nas capturas com nassas, maioritariamente constituídas por animais em intermuda (89,5%), observaram-se frequências de muda muito baixas. Os resultados obtidos indicam que a escolha da fase da muda em que o animal se encontra pode ser determinante para o sucesso da indução da muda pelo método de exposição ao ar.

## **CAPÍTULO 4**

**Estudo do efeito da ablação dos pedúnculos  
oculares e de patas locomotoras na frequência de  
muda do caranguejo verde *Carcinus maenas***





## 1. INTRODUÇÃO

A hormona inibidora da muda (MIH), produzida e armazenada no complexo órgão X - glândula do seio (localizado nos pedúnculos oculares), é responsável pela inibição do ciclo da muda, quer controlando a síntese de ecdisona quer actuando nos receptores da 20-OH-ecdisona. Desta forma, a ablação dos pedúnculos oculares e consequente redução dos níveis de MIH pode criar as condições propícias para que haja uma indução da muda, resultando numa ecdysis precoce (Fingerman e Fingerman, 1974; Skinner e Graham, 1972; Molyneaux e Shirley, 1988; Chu e Leong, 1991). Assim, alterações no ciclo da muda devido à ablação dos PO já foram observadas em *Carcinus maenas* e *Gecarcinus lateralis* (Skinner e Graham, 1972), *Uca pugilator* (Fingerman e Fingerman, 1974), *Paralithodes camtschatica* (Molyneaux e Shirley, 1988), *Penaeus semisulcatus* (Browdy e Samocha, 1985), *Penaeus vannamei* (Chan *et al.*, 1990), *Penaeus chinensis* (Chu e Leong, 1991) e *Homarus americanus* (Chang e Bruce, 1980; Koshio *et al.*, 1989). No entanto, a aceleração da muda após ablação dos PO não é sistematicamente observada, salientando-se a influência negativa do ciclo reprodutivo nas fêmeas. Para além disso, a resposta a este tipo de estímulo também está dependente da fase de muda em que se encontra o animal e da altura do ano em que se efectua a experiência (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993).

Os caranguejos possuem a capacidade de autotomização (libertação voluntária) de qualquer membro que tenha sido danificado (Chu e Leong, 1991). A regeneração desse(s) membro(s) realiza-se durante a intermuda, sendo no entanto necessário que o animal mude de carapaça para que haja a expansão do broto regenerativo imediatamente após a exuviação (McVean, 1976; Skinner e Graham, 1972). Tendo em conta este facto, diversos autores (Fingerman e Fingerman, 1974; McVean, 1976; Smith, 1990) defendem que a regeneração do(s) membro(s) perdidos constitui um estímulo para a muda. A indução da muda através da ablação de patas está dependente do número de patas autotomizadas e, à semelhança do que se passa com a ablação dos PO, da fase da muda do animal e da altura do ano em que se efectua a experiência (Fingerman e Fingerman, 1974; Smith, 1990; Chu e Leong, 1991). A indução da muda através da autotomização de patas locomotoras foi já registada em *Uca pugilator* (Fingerman e Fingerman, 1974), *Penaeus chinensis* (Chu e Leong, 1991) e *Orconectes limosus* (Ruczkal-Pietrzak, 1981).

A conjugação dos dois tratamentos referidos anteriormente – ablação de pedúnculos oculares (PO) e autotomização de patas locomotoras (PL) – tem conduzido a

resultados contraditórios. Fingerman e Fingerman (1974), em experiências com o caranguejo *Uca pugilator*, registou a inibição da muda em animais em que se removeram quer PO quer PL. Por sua vez, experiências realizadas com o *Penaeus chinensis* por Chu e Leong (1991) e com *Palaemon elegans* por Webster (1986) indicam a existência de um efeito aditivo dos dois tratamentos, isto é, os animais em que se removeram os PO e as PL apresentaram ciclos de muda mais curtos do que os animais em que se aplicou qualquer um dos tratamentos isoladamente.

Nesta experiência procurou-se avaliar os efeitos da ablação de pedúnculos oculares e/ou patas locomotoras no ciclo da muda do caranguejo *Carcinus maenas*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos utilizados nesta experiência foram a ablação dos pedúnculos oculares e/ou de patas locomotoras. Para efectuar a ablação dos pedúnculos oculares utilizou-se uma tesoura oftálmica, com a qual se retirou ambos os pedúnculos. De seguida, foi feita a cauterização dos orbitáculos (utilizou-se um ferro de soldar) de forma a minimizar a mortalidade por perda de hemolinfa ou por infecção. No que diz respeito às patas, optou-se pela ablação de patas locomotoras, isto é, não responsáveis pela alimentação (pinças), optando-se pela ablação das duas patas centrais (3.<sup>os</sup> e 4.<sup>os</sup> pereópodes) de cada um dos lados. Tendo em consideração a capacidade de autotomia (processo pelo qual o animal rejeita voluntariamente patas danificadas) evidenciada pelos caranguejos, com uma tesoura ablu-se 2/3 da pata sendo o restante libertado pelo animal voluntariamente. Também o artículo (basis ou basipódito) do qual é feita a autotomização da pata foi cauterizado com a ajuda do ferro de soldar, pelas mesmas razões referidas anteriormente.

Os animais foram alimentados com mexilhão congelado em dias alternados, excepto no período de fim-de-semana. Diariamente, excepto fins-de-semana, em todas as caixas foi registado o número de animais mortos e o número de animais que mudaram de carapaça (mudas).

Esta experiência foi dividida em dois ensaios distintos: no ensaio A realizou-se o estudo da indução da muda através da ablação dos pedúnculos oculares e/ou patas locomotoras considerando todos os grupos de estudo (MA, MN, FA e FN); no ensaio B da

experiência apenas foram utilizados machos capturados com nassas aos quais se ablaram patas locomotoras (MN-APL).

No ensaio A foram utilizados 663 animais, dos quais 140 MA, 139 FA, 144 MN e 240 FN. Para cada grupo de estudo/tratamento foram utilizadas 6 caixas: 2 de controlo (C), 2 com ablação dos pedúnculos oculares (APO) e 2 com ablação das patas locomotoras (APL). No grupo de estudo fêmeas/nassas colocaram-se 4 caixas extra, duas caixas para controlo (C<sub>2</sub>) e duas que continham animais com ablação simultânea de pedúnculos oculares e de patas locomotoras (APOPL). A referência a estas fêmeas capturadas com nassas e que foram sujeitas a ambos os tratamentos simultaneamente será feita através da utilização do número dois entre parêntesis logo após a designação fêmeas/nassas, isto para as distinguir das fêmeas/nassas utilizadas na ablação de pedúnculos oculares ou patas locomotoras isoladamente. Previamente a esta experiência, após captura dos caranguejos, realizou-se a identificação das fases da muda de uma sub-amostragem de caranguejos de forma a obter-se as proporções de cada um dos estádios da muda em cada uma das artes de pesca utilizadas. Assim, os caranguejos capturados por arrasto apresentaram 17% de animais em pós-muda (fases A e B), 74,0% em intermuda ( fase C), 4% em pré-muda inicial (fases D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>) e 5% em pré-muda final (fases D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Por sua vez, os caranguejos capturados através de nassas apresentaram 1% de animais em pós-muda, 90% em intermuda, 8% em pré-muda inicial e 1% em pré-muda final. O primeiro ensaio decorreu durante trinta dias, período em que se registou uma temperatura média da água de  $16,45 \pm 0,82$  °C, uma salinidade média de  $31,75 \pm 1,49$  ‰ e um valor médio de oxigénio dissolvido de  $7,33 \pm 0,85$  mg/L.

No ensaio B apenas foi estudado um grupo de estudo – Machos/Nassas. Para tal, foram utilizados 144 animais MN, dos quais 48 (duas caixas) controlo e 96 (quatro caixas) sujeitos à ablação de 4 patas locomotoras. Uma vez que se pretendeu, com este ensaio, reproduzir os resultados verificados até ao 15º dia do ensaio A, optou-se por efectuar este ensaio durante 20 dias. De forma semelhante ao realizado no ensaio A, efectuou-se a identificação das fases da muda numa sub-amostragem de caranguejos para obter as proporções de cada um dos estádios da muda na única arte de pesca utilizada neste ensaio (nassas). Assim, os caranguejos utilizados neste ensaio apresentaram 1% de animais em pós-muda, 92% em intermuda, 7% em pré-muda inicial e 0% em pré-muda final. Nesse período experimental, verificou-se uma temperatura média da água de  $14,82 \pm 1,04$  °C,

uma salinidade média de  $29,93 \pm 2,18 \%$  e um valor médio de oxigénio dissolvido de  $8,17 \pm 0,64 \text{ mg/L}$ .

No primeiro ensaio desta experiência foram considerados três factores em estudo: o sexo (machos e fêmeas), a arte de pesca (arrasto e nassas) e o tratamento (ablação de PO e PL). A análise estatística dos resultados foi efectuada através de uma ANOVA trifactorial (ver pág. 71) em que o sexo, a arte de pesca e o tratamento foram considerados factores independentes e as taxas de mortalidade ou as frequências de muda o factor dependente. Saliente-se que para efectuar a análise estatística, de forma a normalizar os dados, estes foram transformados através do arcosen da raiz quadrada do factor dependente (arcsen (RQ mortalidade ou muda)). No segundo ensaio, a análise estatística foi efectuada através de uma ANOVA unifactorial, isto é, o factor independente foi o tratamento (ablação de patas locomotoras) e o dependente a taxa de mortalidade ou a frequência de muda. A não utilização dos outros factores (sexo e arte de pesca) deveu-se a que, neste segundo ensaio, apenas foram utilizados caranguejos machos capturados com nassas.

### 3. RESULTADOS

#### Ensaio A

Neste primeiro ensaio foram avaliados os efeitos, ao nível das taxas de mortalidade e frequências de muda, de três tratamentos (APO, APL e APOPL) tendo em conta o sexo dos caranguejos e a arte de pesca utilizada na captura dos mesmos (MA, MN, FA e FN) (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Resumo das taxas de mortalidade e frequências de muda obtidos nos animais controlo (C e C<sub>2</sub>) e nos sujeitos aos diversos tratamentos (APO, APL e APOPL) segundo os quatro grupos de estudo (MA, FA, MN e FN) após 30 dias de experiência.

Controlos e Tratamentos	ARRASTO								NASSAS								
	Mortalidades (médias)				Mudas (médias)				Mortalidades (médias)				Mudas (médias)				
	Machos <sup>a</sup>		Fêmeas <sup>b</sup>		Machos <sup>a</sup>		Fêmeas <sup>b</sup>		Machos <sup>c</sup>		Fêmeas <sup>d</sup>		Machos <sup>c</sup>		Fêmeas <sup>d</sup>		
N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
C	8,5	47,92	3,0	19,02	4,5	18,75	0,5	2,08	7,5	54,17	2,5	18,75	5,5	22,92	0,5	2,08	
APO	14,5	77,08	15,5	90,15	4,0	16,67	0,0	0,00	18,5	87,50	17,0	87,50	1,0	4,17	0,0	0,00	
APL	7,5	58,33	8,5	63,83	1,5	6,25	0,5	2,08	10,0	72,92	8,0	52,08	5,0	20,83	0,5	2,08	
C <sub>2</sub>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	4,5	31,25	----	----	1,0	4,17	
APOPL	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	20,0	91,67	----	----	0,0	0,00	

a - Total de 140 caranguejos

b - Total de 139 caranguejos

c - Total de 144 caranguejos

d - Total de 240 caranguejos

## MORTALIDADE

Os menores valores de mortalidade foram registados nos caranguejos controlo de cada um dos grupos de estudo. No entanto, no que diz respeito aos caranguejos machos, esses valores foram relativamente elevados (machos/arrasto – 47,9%, machos/nassas – 54,2%) (Fig. 4.1). Apesar disso, os valores de mortalidade mostraram ser significativamente inferiores aos registados nos tratamentos.

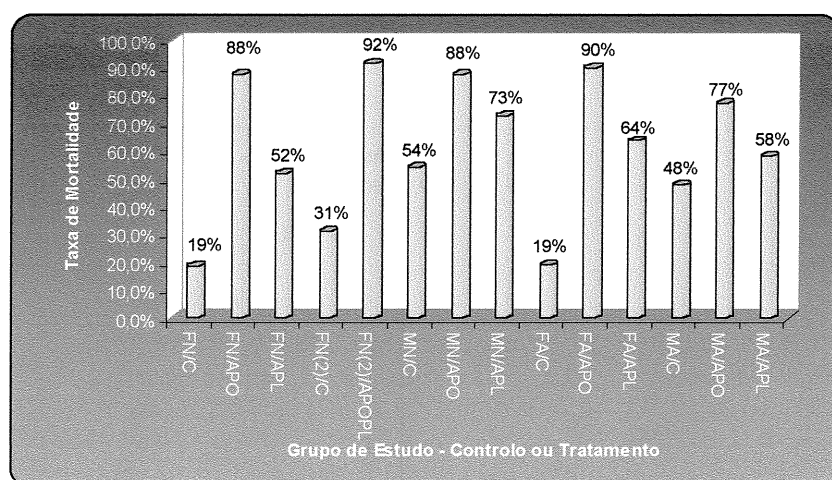


Figura 4.1: Taxas de mortalidade finais (após 30 dias de experiência), de acordo com os grupos de estudo (MA, MN, FA e FN), os controlo e os tratamentos testados (C – controlo; APO – ablação pedúnculos oculares; APL – ablação de patas locomotoras; APOPL – ablação de pedúnculos oculares e patas locomotoras).

O sexo, a arte de pesca e o tratamento são os factores em estudo no primeiro ensaio desta experiência. As mortalidades registadas foram influenciadas de forma significativa quer pelo sexo quer pelos diferentes tratamentos (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 4.1). Na globalidade, os caranguejos machos (66,3%) apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente superior à apresentada pelos caranguejos fêmeas (55,2%) (Tab. 4.1). Relativamente aos tratamentos, os animais em que se ablaram os pedúnculos oculares (APO) registaram mortalidades superiores aos animais em que se ablou as patas locomotoras (APL), realçando-se o facto de ambos os tratamentos (APO e APL) apresentarem taxas de mortalidade significativamente elevadas (Fig.4.2, Anexo XVI e XVII).

Tabela 4.1: Resumo da análise de variância (ANOVA) trifatorial – sexo, arte de pesca e tratamento - relativa aos resultados da mortalidade ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,08109	0,08109	5,05389	0,044149	4,74722
Arte	1	0,00772	0,00772	0,48083	0,501250	4,74722
Tratamento	2	1,29185	0,64592	40,2546	0,000005	3,88529
Sexo - Arte	1	0,04841	0,04841	3,01706	0,107967	4,74722
Sexo - Tratamento	2	0,19686	0,09843	6,13425	0,014616	3,88529
Arte - Tratamento	2	0,00079	0,00040	0,02477	0,975583	3,88529
Sexo - Arte - Tratamento	2	0,01218	0,00609	0,37968	0,692015	3,88529
Erro	12	0,19255	0,01605			
Total	23	1,83146				

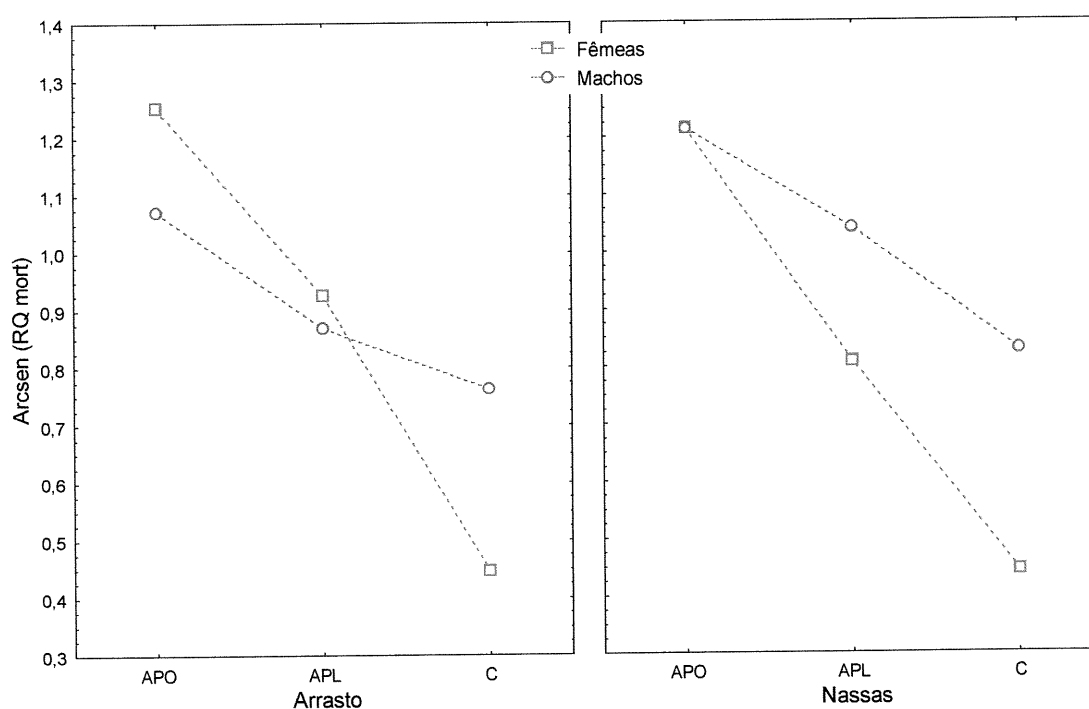


Figura 4.2: Valores transformados de taxas de mortalidade (arcsen (RQ mort)) tendo em conta o sexo, a arte de pesca e o tratamento. (C – controlo; APO - ablação de pedúnculos oculares; APL - ablação de patas locomotoras).

A taxa de mortalidade mais elevada foi registada nos caranguejos fêmeas/nassas(2) (ver pág. 112) em que se ablu pedúnculos oculares (PO) e patas locomotoras (PL) simultaneamente (91,7%). A utilização dos dois tratamentos – ablação de PO e PL – em simultâneo conduziu a uma mortalidade bastante elevada, verificando-se um elevado número de mortos após o início da experiência, aumentando bastante ao longo do período

experimental. Em todos os grupos de estudo foram registadas mortalidades significativamente superiores nos animais aos quais se abloou os PO relativamente aos que se abloou as PL (Tab. 4.2, Anexo XVI e XVII). No entanto, também os caranguejos que foram sujeitos à ablação de PL apresentaram valores de mortalidade bastante elevados (Fig. 4.1). Efectivamente, as taxas de mortalidade dos animais sem PO variou entre 77% (MA) e os 90% (FA), enquanto que a ablação de PL originou mortalidades entre 52% (FN) e 73% (MN) (Fig. 4.1).

#### MUDAS

Os caranguejos controlo dos machos, quer capturados por arrasto (18,8%) quer por nassas (22,9%), apresentaram frequências de muda bastante superiores às apresentadas pelos controlos das fêmeas (2,1% em ambas as artes de pesca).

As frequências de muda, comparadas tendo em conta o sexo, a arte de pesca e o tratamento, permitiram constatar que apenas o sexo as influencia de forma significativa (ANOVA trifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 4.3). Na generalidade, os caranguejos machos (entre 13 e 15%) sujeitos aos diferentes tratamentos registaram frequências de muda mais elevadas do que os caranguejos fêmeas (entre 1 e 2%) (Tab. 4.3).

Tabela 4.3: Resumo da análise de variância (ANOVA) trifactorial – sexo, arte de pesca e tratamento - relativa aos resultados das mudas ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,49185	0,49185	20,83804	0,000649	4,74722
Arte	1	0,00186	0,00186	0,07865	0,783915	4,74722
Tratamento	2	0,07516	0,03758	1,59207	0,243638	3,88529
Sexo - Arte	1	0,00186	0,00186	0,07865	0,783915	4,74722
Sexo - Tratamento	2	0,01648	0,00824	0,34911	0,712245	3,88529
Arte - Tratamento	2	0,08206	0,04103	1,73829	0,217288	3,88529
Sexo - Arte - Tratamento	2	0,08206	0,04103	1,73829	0,217288	3,88529
Erro	12	0,28324	0,02360			
Total	23	1,03457				

As menores frequências de muda foram registadas nos caranguejos com ablação dos PO (entre 0,0% e 4,2%), com excepção dos machos/arrasto onde a menor frequência de muda foi registada nos caranguejos aos quais se abloou quatro PL (6,2%) (Fig. 4.4).



Salienta-se ainda que, nas fêmeas/nassas(2) às quais se ablu simultaneamente os PO e as PL, não se registaram quaisquer mudas (0%) (Fig. 4.5). Nos primeiros 15 dias deste ensaio, a variação da frequência de muda dos caranguejos machos/nassas com ablação de PL apresentou um rápido crescimento (21,7%), estagnando em seguida até ao final do ensaio. No entanto, no final do ensaio, a frequência de muda dos caranguejos deste grupo de estudo com ablação de PL não mostrou diferenças significativas (Fig. 4.6).

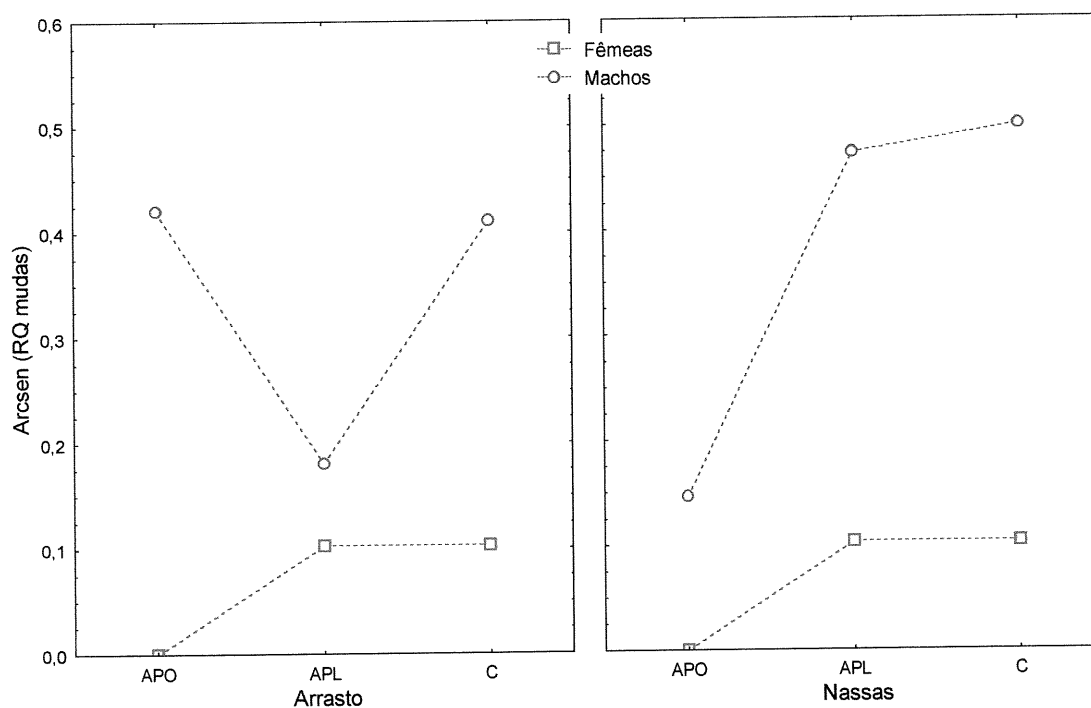


Figura 4.4: Valores transformados de frequências de muda (arsen (RQ mudas)) tendo em conta o sexo, a arte de pesca e o tratamento. (C – controlo; APO - ablação de pedúnculos oculares; APL - ablação de patas locomotoras).

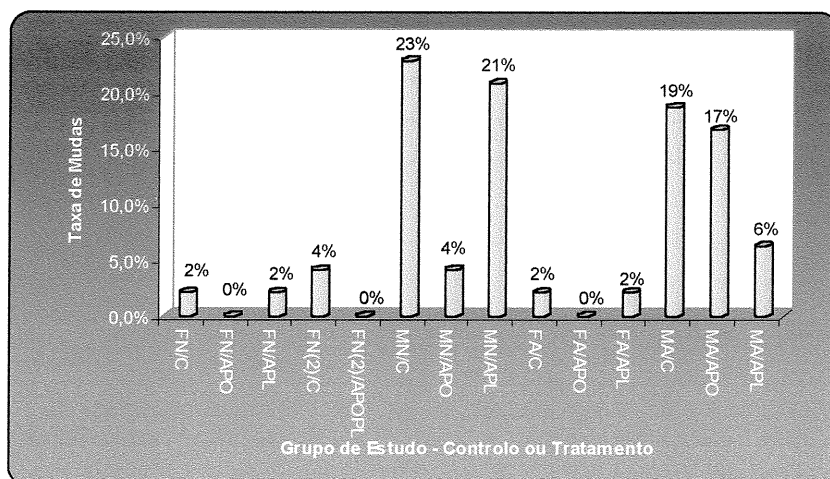


Figura 4.5: Frequências de muda finais (após 30 dias de experiência), de acordo com os grupos de estudo (MA, MN, FA e FN), os controlo e os tratamentos testados (C – controlo; APO – ablação pedúnculos oculares; APL – ablação de patas locomotoras; APOPL – ablação de pedúnculos oculares e patas locomotoras).

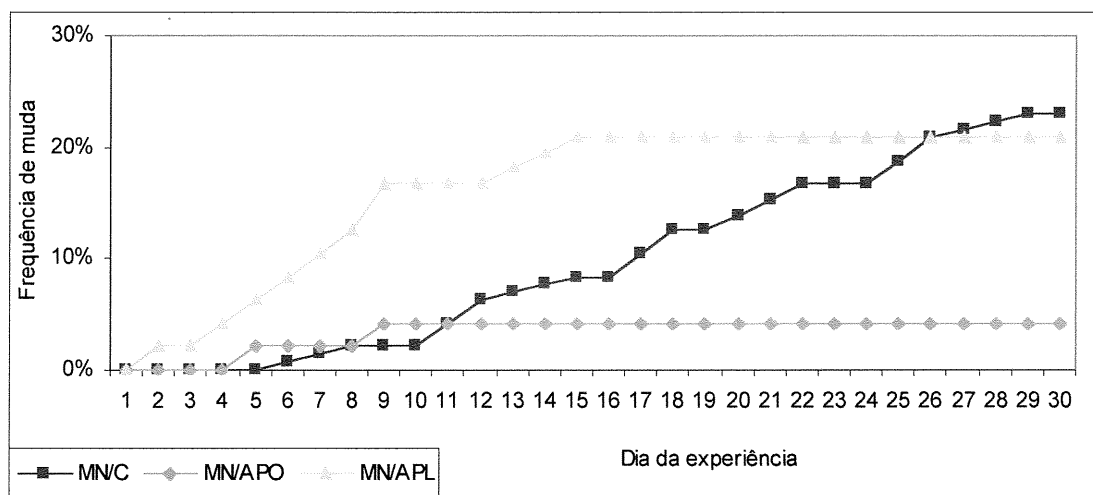


Figura 4.6: Variação das frequências de muda, ao longo de 30 dias de experiência, dos machos capturados com nassas e sujeitos a ablação de pedúnculos oculares (APO) e ablação de patas locomotoras (APL).

## **Ensaio B**

Os resultados neste segundo ensaio foram obtidos com caranguejos do grupo de estudo machos/nassas aos quais se ablaram patas locomotoras (PL) (Quadro 4.2). Este ensaio teve como objectivo tentar reproduzir os resultados obtidos com este grupo de estudo e com este tratamento, que apresentou um crescimento acentuado da frequência de muda (0% até 21,7%) até ao 15º dia do ensaio A.

Quadro 4.2: Resumo das taxas de mortalidade e frequências de muda obtidos nos machos/nassas controlo e sujeitos a tratamento (APL), após 20 dias de experiência.

Controlo e Tratamento	NASSAS			
	Mortalidades (médias)		Mudas (médias)	
	Machos <sup>a</sup>		Machos <sup>a</sup>	
	N.º	%	N.º	%
C	1,5	6,25	0,0	0,00
APL	2,3	9,38	0,3	1,04

a - Total de 140 caranguejos.

## MORTALIDADE

Neste ensaio os machos/nassas, quer controlo quer com ablação de PL registaram taxas de mortalidade médias baixas (6,2% e 9,4%, respectivamente) (Quadro 4.2 e Fig. 4.7).

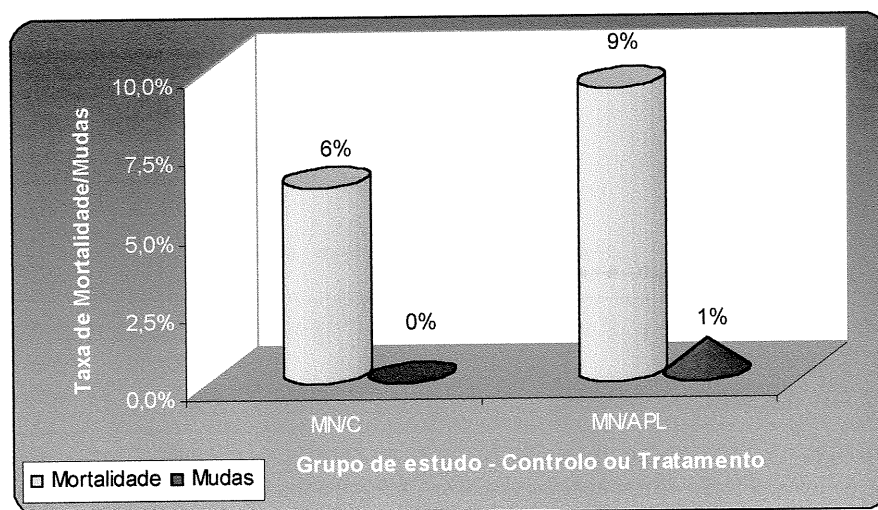


Figura 4.7: Taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 20 dias de experiência) dos machos/nassas controlo (C) e com ablação de patas locomotoras (APL).

## MUDAS

No que diz respeito à frequência de muda, os valores registados para os animais com ablação de PL foi de 1,0% (Fig. 4.7). Devido ao reduzido número de mudas, não houve variações na frequência de muda dos caranguejos sujeitos ao tratamento anteriormente referido, não se registando resultados semelhantes aos do ensaio A.

#### 4. DISCUSSÃO

##### MORTALIDADE

Uma vez que o caranguejo verde se apresenta como uma espécie bastante resistente, possuindo por isso uma elevada capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (Herreid, 1980), não seriam de esperar valores de mortalidade tão elevados nos caranguejos controlo (entre 18,7 e 47,9%). De todos os grupos de estudo salienta-se o factos dos caranguejos controlo machos/nassas ter registado uma taxa de mortalidade bastante elevada (55,3%).

No ensaio A verificou-se que os animais em que se ablou os pedúnculos oculares (APO) apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas (entre 77,1 a 91,3%) relativamente aos animais com ablação de patas locomotoras (APL), em ambos os sexos. A ocorrência de taxas de mortalidade elevadas em animais com o ablação de ambos os pedúnculos oculares foram também registadas nas experiências realizadas por Molyneaux e Shirley (1988) com o caranguejo *Paralithodes camtschatica* (69%) e por Chu e Leong (1991) com o camarão *Penaeus chinensis* (81%). Nas experiências realizadas com o camarão *Penaeus chinensis* registou-se ainda que, ao fim de 30 dias de experiência, os animais com ablação simultânea dos pedúnculos oculares e das patas locomotoras apresentavam taxas de mortalidade bastante elevadas (89%) (Chu e Leong, 1991). Facto também observado no ensaio A, onde a taxa de mortalidade mais elevada foi registada nas FN em que se ablou os pedúnculos oculares e as patas locomotoras (APOPL) (91,67%). Nos animais em que se ablou as patas locomotoras registaram-se taxas de mortalidade relativamente elevadas (56,8 a 76,1%), o que não coincide com os resultados obtidos por Chu e Leong (1991) para a espécie *Penaeus chinensis* com ablação de patas (18%).

O ensaio B foi realizado com o intuito de tentar reproduzir os resultados registados nos machos/nassas com ablação de patas locomotoras do ensaio A, especialmente no que diz respeito à frequência de muda. Uma vez que o ensaio B foi uma repetição do ensaio A, apenas para um grupo de estudo (MN) e um tratamento (APL), é possível comparar as taxas de mortalidade e as frequências de muda em cada um dos ensaios (Fig. 4.7). Relativamente aos caranguejos MN controlo, é possível aferir que no ensaio B se obteve 6,2% de mortalidade, enquanto que no ensaio A se registou 27,1%. Por sua vez, os caranguejos MN com ablação de patas locomotoras registaram valores de mortalidade de 9,4% e 47,8% para o ensaio B e A, respectivamente (Fig. 4.7). Assim, como é facilmente visível, as

mortalidades registadas no primeiro ensaio foram muito superiores às registadas no ensaio B (Fig. 4.7).

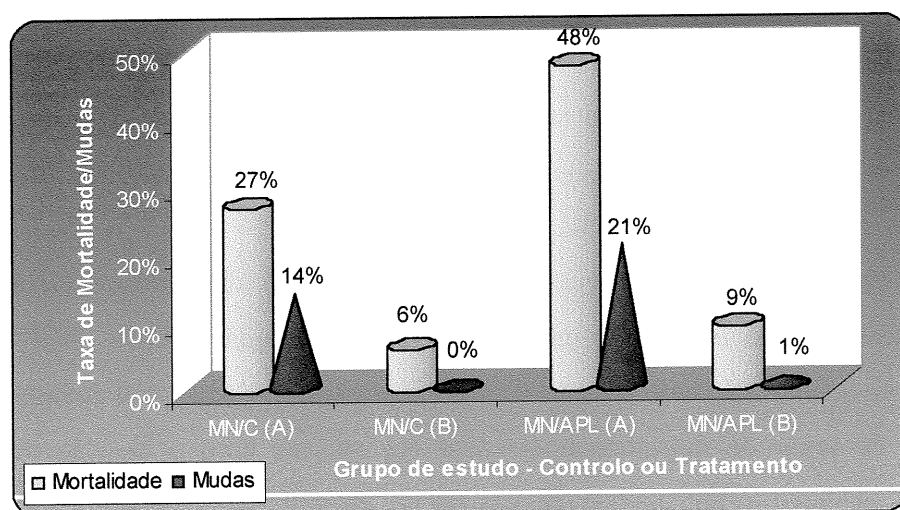


Figura 4.7: Comparação das taxas de mortalidade e frequências de muda finais (após 20 dias) dos machos/nassas (MN) controlo e com ablação de patas locomotoras, do ensaio A e B desta experiência.

### MUDAS

No ensaio A, as frequências de muda nos caranguejos controlo salientaram-se pela diferença apresentada entre os caranguejos machos (arrasto – 18,7%; nassas – 22,9%) e as fêmeas (ambos 2,1%). Apesar desta diferença, as frequências de muda registadas em ambos os sexos no ensaio A foram superiores aos registados com o caranguejo *Uca pugilator* num estudo realizado por Fingerman e Fingerman (1974), no qual os animais controlo não apresentaram qualquer muda ao longo dos 37 dias de experiência.

No ensaio A, os machos/nassas com ablação das patas locomotoras (20,8%) foram os que registaram a frequência de muda mais elevada, seguindo-se os machos/arrasto com ablação de pedúnculos oculares (16,7%). As fêmeas, sujeitas a ambos os tratamentos apresentaram frequências de muda muito baixas (entre 0 e 2,1%), sendo sempre nulas quando sujeitas à ablação dos pedúnculos oculares (0%). Após 31 dias de experiência, num estudo realizado por Fingerman e Fingerman (1974), em que se abluu quatro patas locomotoras a caranguejos *Uca pugilator*, registou-se uma frequência de muda (12,5%) inferior à registada nos machos/nassas do ensaio A sujeitos ao mesmo tratamento.

No que diz respeito aos machos/arrasto, os caranguejos com ablação dos pedúnculos oculares (16,7%) apresentaram uma frequência de muda superior aos com ablação das patas locomotoras (6,2%). Por outro lado, os machos/nassas apresentam frequências de muda superiores nos animais com ablação de patas locomotoras, tendo o número de mudas progredido rapidamente nos primeiros quinze dias do ensaio (0% ⇒ 21,7%) e estagnando até ao final do mesmo. A frequência final dos MN com ablação das patas (21,7%) acabou por ser inferior à registada no controlo (23,4%).

Considerando os valores de frequências de muda registados quer no ensaio A desta experiência quer em estudos realizados por diversos autores (Fingerman e Fingerman, 1974; Skinner e Graham, 1972; Chu e Leong, 1991), conclui-se que as frequências de muda obtidas no ensaio B desta experiência são muito inferiores ao esperado.

Como já foi referido anteriormente, o objectivo do ensaio B era reproduzir os melhores resultados obtidos no ensaio A no que diz respeito às frequências de muda, isto é, utilizaram-se animais machos capturados com nassas (MN) e ablaram-se quatro patas locomotoras (APL). A frequência de muda dos MN controlos no ensaio B foi nula (0%), enquanto que no ensaio A se havia registado uma frequência de muda de 13,9%, até ao 20º dia de experiência (Fig. 4.7). Relativamente aos caranguejos MN com ablação de patas locomotoras (APL) registaram-se valores de 21,7% e 1,0% para o ensaio A e B da experiência, respectivamente (Fig. 4.7). No ensaio A, a frequência de muda dos MN com ablação de patas locomotoras apresentou um crescimento acentuado nos primeiros 15 dias de experiência. Considerando este facto, pretendeu-se no ensaio B repetir esse mesmo resultado, o que não veio a acontecer, registando-se frequências de muda quase nulas(1,0%) (Fig. 4.8).

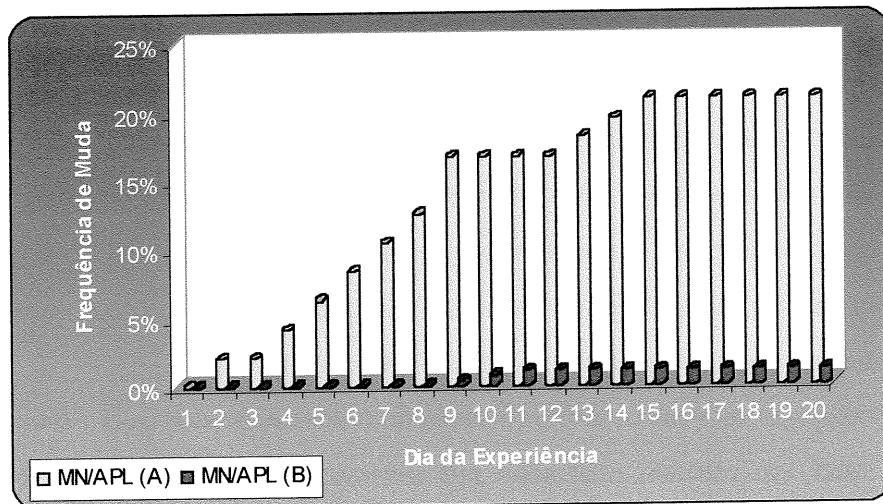


Figura 4.8: Comparação da variação das frequências de muda nos machos/nassas com ablação de patas locomotoras, no ensaio A e B da experiência, ao longo de 20 dias de experiência.

As diferenças registradas entre as frequências de muda do ensaio A e B nos machos/nassas com ablação de patas locomotoras poderá dever-se às diferenças registradas nos parâmetros físico-químicos da água em cada um dos ensaios. Por exemplo, no ensaio B da experiência a temperatura média da água foi cerca de 1,5°C inferior à registrada no ensaio A. De igual forma, também a salinidade média registrada em cada um dos ensaios foi inferior em cerca de 2‰ no ensaio B relativamente ao ensaio A. Para além disso, também a própria qualidade da água utilizada, pois esta era retirada de um tanque pertencente a uma piscicultura, poderá ter interferido nos resultados. Finalmente, um outro factor poderá ter contribuído para que se registasse esta disparidade de frequências de muda – o fotoperíodo não foi um parâmetro controlado, havendo uma constante alteração dessa mesma luminosidade pois a movimentação das caixas era feita diariamente, isto porque a necessidade de registar os mortos e as mudas assim o exigia. São vários os autores (Mattson, 1986; Koshio *et al.*, 1989; Chang, 1995; Guerin e Stickle, 1997) que indicam o fotoperíodo como um dos factores que pode influenciar o momento da exuviação.

## **CAPÍTULO 5**

**Estudo do efeito da injeção da hormona da muda activa (20-OH-ecdisona) e de algumas substâncias químicas na frequência de muda do caranguejo verde *Carcinus maenas***





## 1. INTRODUÇÃO

O controlo do ciclo da muda é efectuado de forma directa pela hormona da muda activa – 20-hidroxiecdisona (20-OHE). Esta hormona actua sobre os tecidos epidérmicos e sobre o hepatopancreas de forma a iniciar a preparação da exuviação, podendo também inibir a libertação da hormona inibidora da muda (MIH) pela glândula do seio.

Experiências de injeção da 20-OHE em diversas espécies de crustáceos apresentaram diferentes resultados no que diz respeito à indução da muda. A injeção desta hormona em lavagantes *Homarus americanus*, nas fases finais da pré-muda, provocou um retardamento da exuviação. Contrariamente, a injeção dessa mesma hormona nas fases iniciais da pré-muda provocou uma indução da exuviação (Cheng e Chang, 1991). Juvenis de lagostas *Panulirus longipes* foram submetidos a injeções em diferentes fases do ciclo da muda, apresentando resultados distintos consoante a fase. Entre as várias experiências efectuadas salienta-se o facto da dupla injeção (2 injeções em dois dias consecutivos) no final da intermuda (C<sub>4</sub>) resultar na diminuição da duração da pré-muda e do ciclo da muda total. No entanto, a injeção de 20-OHE em animais em fases intermédias da intermuda (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), provoca a diminuição da intermuda mas também um aumento da duração da pré-muda (Dall e Barclay, 1977). Por sua vez, a injeção de 20-OHE em *Penaeus vannamei*, na fase C<sub>1</sub> da intermuda, permitiu a diminuição da duração da intermuda e da pré-muda inicial. No entanto, a injeção destes animais provocou também um aumento das taxas de mortalidade (Chan *et al.*, 1990). Uma experiência realizada com *Carcinus maenas* mostrou que caranguejos injectados com duas injeções (com 24 horas de intervalo) de ecdisona (hormona da muda) induziu exuviações precoces em 66% dos animais. Ainda nesta experiência foi possível averiguar que a exuviação ocorreu cerca de 13 a 14 dias após a última injeção (Bazin, 1977).

Para além da hormona da muda activa (20-OHE), diversos outros compostos químicos apresentam características que lhes permitem influenciar o ciclo da muda. A p-clorofenilalanina (PCPA) e a ciproheptadina (CPH) apresentam uma acção de inibição sobre a 5-hidroxitriptamina (5-HT), que por sua vez estimula a libertação da hormona inibidora da muda (MIH). Assim, quer a PCPA (inibidora da produção de 5-HT) quer a CPH (antagonista da 5-HT) podem exercer uma influência inibidora indirecta sobre a MIH e, conseqüentemente, induzir a muda. O efeito indutor da muda destes compostos foi comprovado na espécie *Cancer antennarius* (Mattson e Spaziani, 1986a). A dimetil-

$\beta$ -propiotenina (DMPT) e a dimetilacetotenina (DMT) são compostos com os quais foi comprovada a aceleração do crescimento de diversos peixes, assim como a capacidade de induzir a muda no crustáceo *Palaemon paucidens* (Nakajima, 1991). Finalmente, também o fenoxicarbe, regulador do crescimento dos insectos, poderá exercer influência no ciclo de crescimento dos crustáceos, devido às semelhanças dos ciclos de crescimento dos insectos e crustáceos (Lachaise *et al.*, 1993; Grenier e Grenier, 1993).

Nesta experiência procurou-se avaliar os efeitos, sobre as taxas de mortalidade e as frequências de muda, da injeção isolada da hormona da muda activa ou da sua injeção em conjunto com outros estímulos e a injeção de outras substâncias químicas com influência directa ou indirecta no ciclo da muda do caranguejo *Carcinus maenas*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os animais nesta experiência foram capturados com rede de arrasto (A), tendo sido, posteriormente, separados consoante o sexo - machos (M) e fêmeas (F).

Os caranguejos foram sujeitos a vários tratamentos através da injeção de diferentes compostos químicos, tendo havido também, num dos tratamentos, a ablação dos pedúnculos oculares. As injeções foram efectuadas usando uma microseringa "Hamilton Microliter Syringe" com 10  $\mu$ l de capacidade máxima. A injeção foi dada na base do segundo pereiópode (perna locomotora após a pinça), do lado esquerdo do animal quando este era colocado com a face ventral para cima. Quando indicado, os pedúnculos oculares foram ablados com a ajuda de uma tesoura oftálmica. Depois, efectuou-se a cauterização dos orbitáculos com um ferro de soldar para minimizar a mortalidade devido à perda de hemolinfa ou infecção.

Os animais foram alimentados com mexilhão congelado a cada 3-4 dias, dependendo da comida ingerida. Diariamente, em todas as caixas, o número de animais mortos e o número de animais que mudaram o exosqueleto (mudas) foram registados.

Esta experiência foi dividida em dois ensaios distintos (A e B), sendo que a principal diferença entre eles foi as diferentes concentrações dos compostos químicos testados.

Em ambos os ensaios foram considerados dois controlos diferentes. O controlo 1 (C<sub>1</sub>) era constituído por duas caixas (48 caranguejos) onde os animais estavam intactos. O

controlo 2 (C<sub>2</sub>), também com duas caixas (48 caranguejos), era constituído por animais injectados com a solução Pantin (solução onde todos os compostos químicos a testar foram preparados). Esta solução fisiológica - solução de Pantin (água do mar artificial) – foi preparada segundo Hoar e Hickman (1978) (solução composta por NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaSO<sub>4</sub> e NaBr) (William e Cleveland, 1978). Além das caixas de controlo, para cada situação de estudo, foram preparadas 4 caixas (96 caranguejos) contendo animais sujeitos a um determinado tratamento.

No ensaio A da experiência foram utilizados 1344 animais, sendo 672 machos e 672 fêmeas. Uma amostra aleatória de 50 animais utilizados nesta experiência permitiu determinar o seu peso médio ( $22,93 \pm 9,60$  gr) e o seu comprimento médio ( $4,54 \pm 0,67$  cm). Para além disso, permitiu também identificar a proporção de cada um dos estádios do ciclo da muda nos caranguejos, capturados por arrasto, utilizados neste ensaio: pós-muda – 0%; intermuda - 82%; pré-muda inicial – 18%; pré-muda final – 0%. No tratamento 1 (T<sub>1</sub>) os caranguejos foram injectados com 20-hidroxicdisona (20-OHE) (0,1 mg/mL), no tratamento 2 (T<sub>2</sub>) foram injectados com 20-OHE (0,1 mg/mL) e os pedúnculos oculares foram ablados, no tratamento 3 (T<sub>3</sub>) foram injectados com uma solução com 20-OHE (0,1 mg/mL) e *p*-clorofenilalanina (PCPA) (0,2 mg/mL), no tratamento 4 (T<sub>4</sub>) foram injectados com uma solução com 20-OHE (1 mg/mL) e ciproheptadina (CPH) (0,3 mg/mL), no tratamento 5 (T<sub>5</sub>) foram injectados com uma solução com dimetil-β-proprionina (DMPT) (10,8 µg/mL) e no tratamento 6 (T<sub>6</sub>) foram injectados com uma solução com dimetilacetona (DMT) (10,0 µg/mL) (Quadro 5.1). Sete dias após o início da experiência os caranguejos foram novamente injectados com soluções contendo concentrações mais elevadas dos compostos atrás referidos, com excepção para as soluções com PCPA e CPH em que se mantiveram as concentrações utilizadas na primeira injeção. Deste modo, as concentrações dos diferentes compostos químicos nas segundas injeções foram 20-OHE - 1 mg/mL, DMPT-21,6 µg/mL e DMT-20,0 µg/mL (Quadro 5.1). O ensaio A da experiência decorreu durante vinte e oito dias. Durante o período experimental registou-se uma temperatura média da água de  $18,48 \pm 1,70$  °C, uma salinidade média da água de  $36,98 \pm 0,66$  ‰ e um conteúdo médio da água em oxigénio dissolvido de  $6,98 \pm 0,90$  mg de O<sub>2</sub>/l.

Quadro 5.1: Resumo das substâncias injectadas e respectivas concentrações, de ambas as injeções, no ensaio A desta experiência.

Controlos e Tratamentos	Substância (s) injectadas		Concentrações (volume injectado = 10 µL)			
	Hormona activa	Outros químicos	1ª Injecção (Dia 0)		2ª Injecção (Dia 7)	
Controlo 1 (C <sub>1</sub> )	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Controlo 2 (C <sub>2</sub> )	-----	Solução Pantin	-----	-----	-----	-----
Tratamento 1 (T <sub>1</sub> )	20-OHE	-----	0,1 mg/mL	-----	1 mg/mL	-----
Tratamento 2 (T <sub>2</sub> )	20-OHE	APO *	0,1 mg/mL	-----	1 mg/mL	-----
Tratamento 3 (T <sub>3</sub> )	20-OHE	PCPA	0,1 mg/mL	0,2 mg/mL	1 mg/mL	0,2 mg/mL
Tratamento 4 (T <sub>4</sub> )	20-OHE	CPH	0,1 mg/mL	0,3 mg/mL	1 mg/mL	0,3 mg/mL
Tratamento 5 (T <sub>5</sub> )	-----	DMPT	-----	10,8 µg/mL	-----	21,6 µg/mL
Tratamento 6 (T <sub>6</sub> )	-----	DMT	-----	10,0 µg/mL	-----	20,0 µg/mL

\* - No tratamento 2 ambos os pedúnculos oculares foram abladados.

No ensaio B foram utilizados 1344 animais, dos quais 672 eram machos e 672 eram fêmeas. Uma amostra aleatória de 50 animais utilizados nesta experiência permitiu determinar o seu peso médio ( $19,54 \pm 7,34$  gr) e o seu comprimento médio ( $4,35 \pm 0,55$  cm). As proporções dos diferentes estádios da muda foram também obtidas a partir da referida amostra. Assim, os caranguejos utilizados neste ensaio foram todos capturados por arrasto e apresentavam a seguinte proporção de estádios do ciclo da muda: pós-muda – 0%; intermuda - 90,0%; pré-muda inicial – 10,0%; pré-muda final – 0%). O T<sub>1</sub>, injeção de 20-OHE exógena, não foi efectuada no ensaio B porque se optou, com base nos resultados do ensaio A, pela utilização de mais que um estímulo. No T<sub>2</sub>, os caranguejos foram injectados com 20-OHE (1 mg/mL) e ambos o pedúnculos oculares foram abladados (neste ensaio, não se efectuou a cauterização dos orbitáculos), no T<sub>3</sub> foram injectados com uma solução com 20-OHE (1 mg/mL) e PCPA (0,4 mg/mL), no T<sub>4</sub> foram injectados com uma solução com 20-OHE (1 mg/mL) e CPH (0,6 mg/mL), no T<sub>5</sub> foram injectados com uma solução com DMPT (21,6 µg/mL), no T<sub>6</sub> foram injectados com uma solução com DMT (20,0 µg/mL) e no T<sub>7</sub> foram injectados com uma solução com fenoxicarbe (10 mg/ml) (Quadro 5.2). Cinco dias após o início deste segundo ensaio, os caranguejos foram novamente injectados com soluções com concentrações mais elevadas dos compostos inicialmente infectados, com excepção para a 20-OHE e o fenoxicarbe. Deste modo, as concentrações utilizadas nesta segunda injeção foram PCPA - 2 mg/mL, CPH - 3 mg/mL, DMPT - 216 µg/mL e DMT - 200 µg/mL (Quadro 5.2). O ensaio B da experiência estendeu-se por vinte e seis dias. Este ensaio foi planeado para durar 28 dias

(igualando o período do ensaio A), no entanto, uma falha eléctrica na estação experimental, originou uma elevadíssima mortalidade. Para evitar a influência deste problema nos resultados obtidos, optou-se por considerar os resultados do ensaio B só até ao 26º dia de experiência. Durante o período experimental registou-se uma temperatura média da água de  $13,98 \pm 1,06$  °C, uma salinidade média da água de  $28,09 \pm 2,45$  ‰ e um conteúdo médio da água em oxigénio dissolvido de  $7,63 \pm 0,57$  mg de O<sub>2</sub>/l.

Quadro 5.2: Resumo das substâncias injectadas e respectivas concentrações, de ambas as injeções, no ensaio B desta experiência.

Controlos e Tratamentos	Substância (s) injectadas		Concentrações (volume injectado = 10 µL)			
	Hormona activa	Outros químicos	1ª Injecção (Dia 0)		2ª Injecção (Dia 5)	
Controlo 1 (C <sub>1</sub> )	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Controlo 2 (C <sub>2</sub> )	-----	Solução Pantin	-----	-----	-----	-----
Tratamento 2 (T <sub>2</sub> )	20-OHE	APO *	1 mg/mL	-----	1 mg/mL	-----
Tratamento 3 (T <sub>3</sub> )	20-OHE	PCPA	1 mg/mL	0,4 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
Tratamento 4 (T <sub>4</sub> )	20-OHE	CPH	1 mg/mL	0,6 mg/mL	1 mg/mL	3 mg/mL
Tratamento 5 (T <sub>5</sub> )	-----	DMPT	1 mg/mL	21,6 µg/mL	1 mg/mL	216 µg/mL
Tratamento 6 (T <sub>6</sub> )	-----	DMT	-----	20,0 µg/mL	-----	200 µg/mL
Tratamento 7 (T <sub>7</sub> )	-----	Fenoxicarbe	-----	10 mg/mL	-----	10 mg/mL

\* - No tratamento 2 ambos os pedúnculos oculares foram ablatados.

Em ambos os ensaios desta experiência foram considerados apenas dois factores: o sexo (machos e fêmeas) e o tratamento (injecção de diversos compostos). A análise estatística dos resultados foi efectuada através de uma ANOVA bifactorial (ver pág. 71) em que o sexo e o tratamento foram considerados factores independentes e as taxas de mortalidade ou as frequências de muda o factor dependente. De forma a normalizar os dados, foi necessário transformar os valores referentes às mortalidades e mudas através do arcosen da raiz quadrada do factor dependente (arcsen (RQ mortalidade ou muda)).

### 3. RESULTADOS

#### Ensaio A

Neste ensaio avaliou-se as taxas de mortalidade e frequências de muda tendo em conta os dois grupos de estudo (machos/arrasto (MA) e fêmeas/arrasto (FA)) e os

diferentes tratamentos efectuados (injecção de diferentes compostos químicos) (Quadro 5.3).

Quadro 5.3: Resumo das taxas de mortalidade e frequências de muda obtidos consoante os diferentes grupos de estudo (MA e FA) e os diferentes tratamentos, no ensaio A, após 28 dias de experiência.

		ENSAIO A							
		Mortalidades (médias)				Mudas (médias)			
Controlos e tratamentos	Descrição dos Tratamentos	Machos/Arrasto		Fêmeas/Arrasto		Machos/Arrasto		Fêmeas/Arrasto	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
C1 *	-----	14,00	58,33	16,00	66,67	1,00	4,17	1,50	6,25
C2 *	(solução Pantin)	20,50	85,42	22,50	93,75	1,00	4,17	0,50	2,08
T1 **	20-OHE	23,00	95,83	22,00	91,67	0,25	1,04	0,50	2,08
T2 **	20-OHE + APO	23,50	97,92	24,00	100,0	0,00	0,00	0,50	2,08
T3 **	20-OHE + PCPA	21,50	89,58	19,50	81,25	0,25	1,04	1,25	5,21
T4 **	20-OHE + CPH	20,75	86,46	21,75	90,63	0,50	2,08	2,50	10,42
T5 **	DMPT	22,25	92,71	21,25	88,54	0,75	3,13	1,25	5,21
T6 **	DMT	22,25	92,71	21,00	87,50	0,50	2,08	1,50	6,25
T7 **	Fenoxicarbe	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

\* - Total de 48 caranguejos.

\*\* - Total de 96 caranguejos.

## MORTALIDADE

Nesta experiência, quer no ensaio A quer no B, foram utilizados dois grupos de controlo, o C<sub>1</sub> constituído por animais não manipulados e o C<sub>2</sub> por caranguejos nos quais foi injectada a solução Pantin (soro fisiológico utilizado como meio de dissolução dos compostos a testar). O C<sub>1</sub> teve como objectivo avaliar a incidência, quer na mortalidade quer nas mudas, da injecção da solução Pantin (C<sub>2</sub>). Por sua vez, o segundo controlo (C<sub>2</sub>) funcionou como termo de comparação relativamente aos diferentes tratamentos efectuados. Com isto pretendeu-se retirar o efeito da injecção necessária para introduzir no animal as substâncias a testar.

Apesar de se terem registado valores superiores ao esperado, quer os caranguejos machos quer os fêmeas não manipulados (C<sub>1</sub>) apresentaram taxas de mortalidade inferiores aos caranguejos injectados com solução Pantin (C<sub>2</sub>). Os animais controlo não manipulados (C<sub>1</sub>) registaram valores significativamente inferiores aos controlo 2

(caranguejos injectados com solução Pantin) e a todos os tratamentos efectuados (Fig. 5.1 e 5.2).

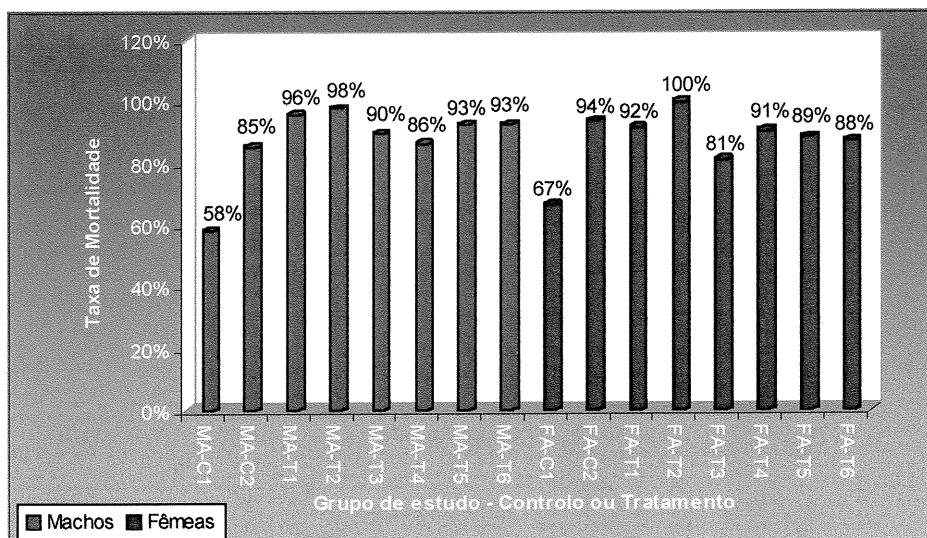


Figura 5.1: Taxas de mortalidade finais (após 28 dias de experiência) nos controlos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) e nos tratamentos testados (T<sub>1</sub> - injeção de 20-OHE; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT) de ambos os grupos de estudo (MA e FA), no ensaio A.

Uma vez que todos os animais utilizados neste ensaio foram capturados por arrasto, apenas dois factores – sexos e tratamentos – foram comparados no que diz respeito às taxas de mortalidade, registando-se apenas diferenças significativas nos diferentes tratamentos utilizados (ANOVA bifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 5.1). Das taxas de mortalidade dos diferentes tratamentos realça-se, em ambos os sexos, as registadas nos caranguejos que foram sujeitos simultaneamente à injeção de 20-hidroxicidisona e à ablação de pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>) (machos – 97,9%; fêmeas – 100%), as quais se mostraram significativamente superiores às dos restantes tratamentos (Fig. 5.2 e Anexo XVIII).



Tabela 5.1: Resumo da análise de variância (ANOVA) bifactorial – sexo e tratamento - relativa às taxas de mortalidade do ensaio A ( $p < 0,05$  – azul – diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,00309	0,00309	0,26231	0,61135	4,08474
Tratamento	7	1,18613	0,16945	14,39969	0,00000	2,24902
Sexo - Tratamento	7	0,14240	0,02034	1,72880	0,12983	2,24902
Erro	40	0,47070	0,01177			
Total	55	1,80232				

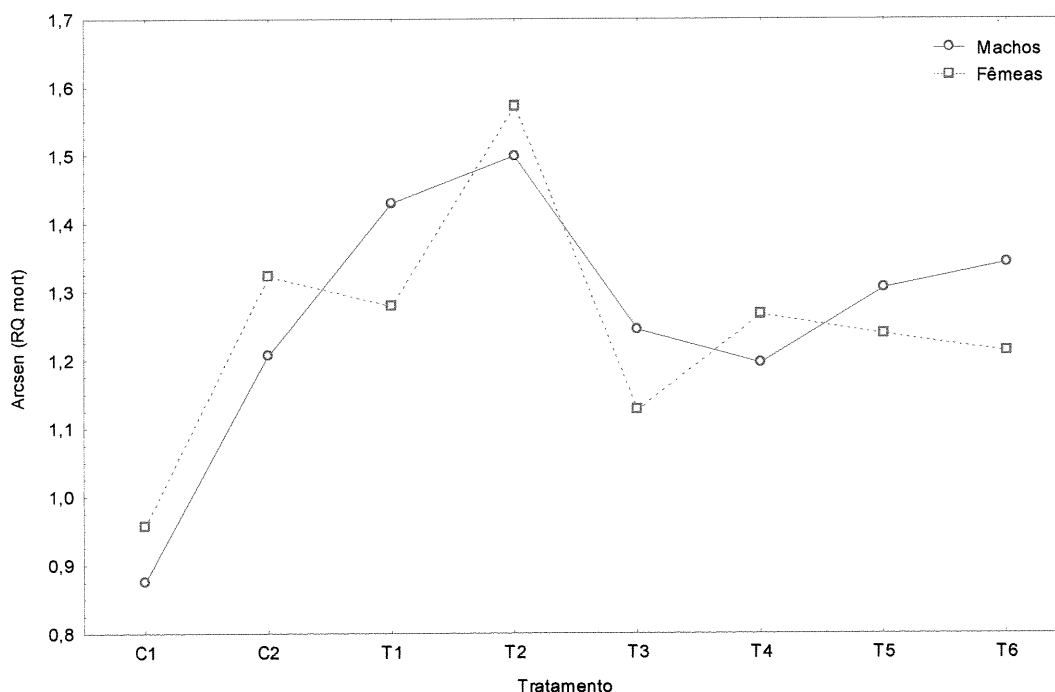


Figura 5.2: Valores transformados de taxas de mortalidade (arcsen (RQ mort)) tendo em conta o sexo e o tratamento, no ensaio A. (C<sub>1</sub> – controlo 1; C<sub>2</sub> – controlo 2; T<sub>1</sub> – injeção de 20-OHE; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT).

Na generalidade, quer nos machos quer nas fêmeas, todos os tratamentos (injeção dos diversos compostos químicos) registaram taxas de mortalidade extremamente elevadas, variando entre os 80% e os 100% (Fig. 5.1). No que diz respeito aos tratamentos com taxas mais elevadas, constatou-se que os caranguejos em que se injectou a 20-OHE e se ablu os pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>) apresentaram mortalidades significativamente superiores a todos os outros tratamentos. Para tal contribui as taxas de mortalidade para o T<sub>2</sub> registadas nos caranguejos machos (98%) e nas fêmeas (100%) (Fig. 5.1). Realça-se,

finalmente, que as fêmeas em que se injectou 20-OHE e PCPA (T<sub>3</sub>) registaram a taxa de mortalidade (81,2%) mais baixa de todos os tratamentos.

#### MUDAS

No que diz respeito às frequências de muda, apenas o sexo, dos dois factores em estudo (sexo e tratamentos), interferiu de forma significativa nos resultados obtidos (ANOVA bifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 5.2). Facto que é explicado pelas frequências de muda superiores registadas nas fêmeas relativamente aos machos em todos os tratamentos efectuados (Fig. 5.3 e 5.4). Nas fêmeas, realça-se a frequência de muda registada no T<sub>4</sub> (injecção de 20-OHE e CPH) (10,4%), a qual foi superior, embora não de forma significativa, às frequências de muda observadas nos outros tratamentos. Nos caranguejos machos, realça-se o T<sub>2</sub> (injecção de 20-OHE e ablação de pedúnculos oculares) onde não se registou qualquer muda e o facto de todos os outros tratamentos apresentarem frequências de muda bastante baixas (Fig. 5.3 e 5.4). Nos machos, a frequência de muda mais elevada foi registada nos caranguejos injectados com dimetil- $\beta$ -proprionina (DMPT) (T<sub>5</sub>) (3,1%) (Fig. 5.4).

Tabela 5.2: Resumo da análise de variância (ANOVA) bifactorial – sexo e tratamento - relativa às frequências de muda do ensaio A ( $p < 0,05$  – azul – diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,07234	0,07234	4,82394	0,03392	4,08474
Tratamento	7	0,16614	0,02373	1,58275	0,16866	2,24902
Sexo - Tratamento	7	0,11272	0,01610	1,07383	0,39784	2,24902
Erro	40	0,59981	0,01500			
Total	55	0,95100				

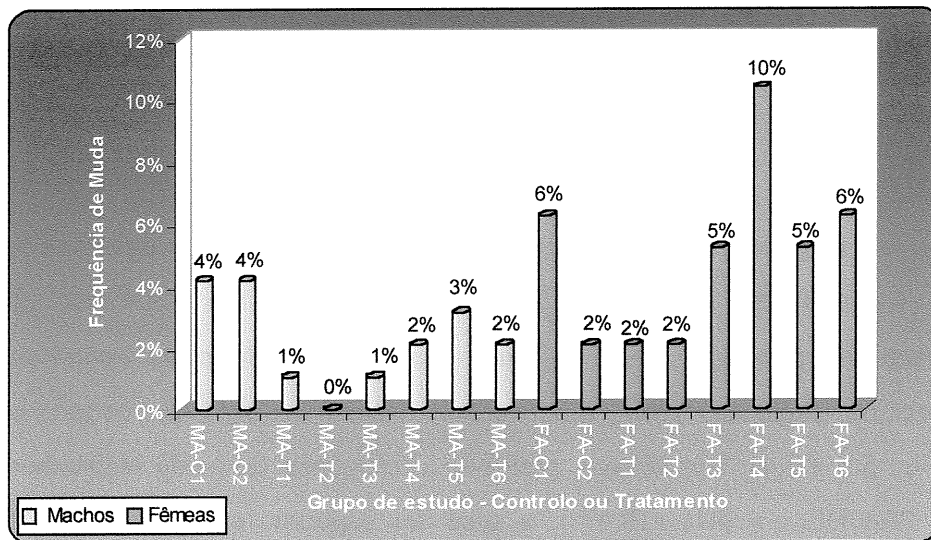


Figura 5.3: Frequências de muda finais (após 28 dias de experiência) nos controles (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) e nos tratamentos testados (T<sub>1</sub> – injeção de 20-OHE; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT) de ambos os grupos de estudo (MA e FA), no ensaio A.

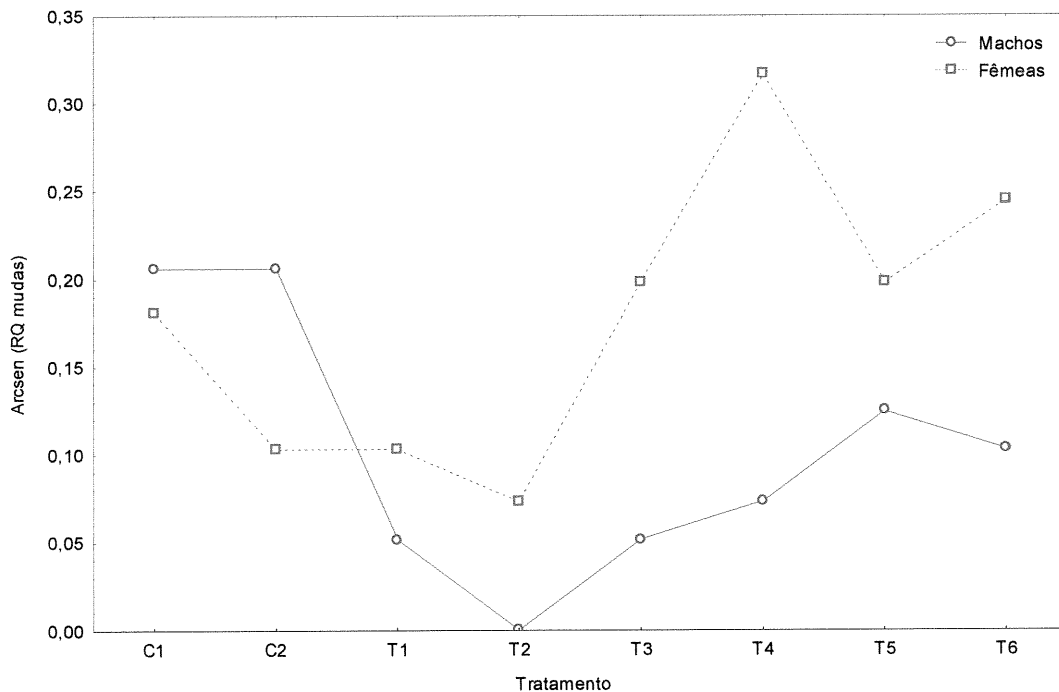


Figura 5.4: Valores transformados de frequências de muda (arsen (RQ mudas)) tendo em conta o sexo e o tratamento, no ensaio A. (C<sub>1</sub> – controlo 1; C<sub>2</sub> – controlo 2; T<sub>1</sub> – injeção de 20-OHE; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT).

## Ensaio B

Os resultados neste ensaio foram obtidos tendo em conta os dois grupos de estudo (machos/arrasto (MA) e fêmeas/arrasto (FA)) e os diferentes compostos químicos testados (Quadro 5.4).

Quadro 5.4: Resumo das taxas de mortalidade e frequências de muda obtidos no ensaio B, após 26 dias de experiência, consoante os diferentes grupos de estudo (MA e FA) e os diferentes tratamentos.

		ENSAIO B							
		Mortalidades (médias)				Mudas (médias)			
Controlos e tratamentos	Descrição dos Tratamentos	Machos/Arrasto		Fêmeas/Arrasto		Machos/Arrasto		Fêmeas/Arrasto	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
C <sub>1</sub> *	-----	1,50	14,58%	2,50	12,50%	2,00	10,42%	0,00	0,00%
C <sub>2</sub> *	(solução Pantin)	3,00	14,58%	3,00	16,67%	1,00	4,17%	0,00	0,00%
T <sub>1</sub> **	20-OHE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
T <sub>2</sub> **	20-OHE + APO	10,25	61,46%	14,75	72,92%	0,50	2,08%	0,00	0,00%
T <sub>3</sub> **	20-OHE + PCPA	4,25	35,42%	6,25	39,58%	1,50	6,25%	0,25	1,04%
T <sub>4</sub> **	20-OHE + CPH	6,00	37,50%	6,50	40,63%	1,00	4,17%	0,25	2,08%
T <sub>5</sub> **	DMPT	4,50	26,04%	4,50	31,25%	1,75	8,33%	0,75	3,13%
T <sub>6</sub> **	DMT	6,25	38,54%	4,25	40,63%	1,00	5,21%	0,25	1,04%
T <sub>7</sub> **	Fenoxicarbe	4,75	22,92%	7,25	33,33%	1,50	6,25%	0,25	1,04%

\* - Total de 48 caranguejos.

\*\* - Total de 96 caranguejos.

## MORTALIDADE

À semelhança do efectuado no ensaio A, também neste ensaio (B) foram utilizados dois controlos, o C<sub>1</sub> (caranguejos não manipulados) e o C<sub>2</sub> (caranguejos injectados com a solução Pantin). O objectivo da utilização de dois controlos é idêntica à descrita no ensaio A (ver pág. 130). As taxas de mortalidades mais baixas foram registadas em ambos os sexos e em ambos os controlo (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>), variando entre 12,5% e 16,7% (Fig. 5.5).

Os dois factores em estudo neste ensaio, à semelhança do ensaio A, foram o sexo e os diferentes tratamentos (injecção de vários compostos químicos), tendo-se apenas registado diferenças significativas nas taxas de mortalidade relativas aos tratamentos (ANOVA bifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 5.3). Essas diferenças resultaram de mortalidades significativamente superiores nos tratamentos 2, 3, 4 e 6, realçando-se entre eles o tratamento 2 (injecção de 20-OHE + ablação de PO) (Anexo IXX). Assim, quer os

machos quer as fêmeas apresentaram na sua generalidade taxas de mortalidade semelhantes (entre 23 e 40%), com excepção dos animais aos quais se ablu os pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>) (machos - 61,5%; fêmeas - 72,9%) que apresentaram mortalidades mais elevadas (Fig. 5.5 e 5.6).

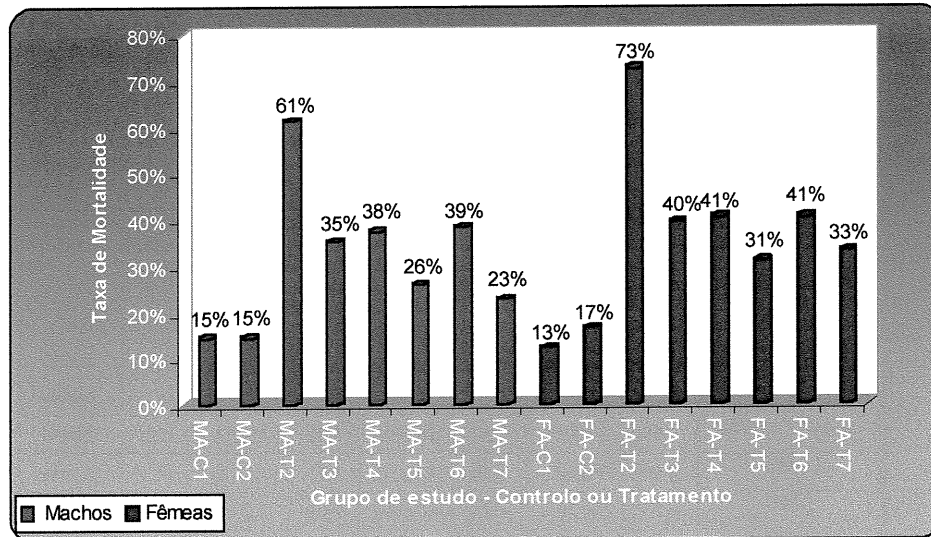


Figura 5.5: Taxas de mortalidade finais (após 28 dias de experiência) nos controlos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) e nos tratamentos testados (T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT; T<sub>7</sub> - injeção de fenoxicarbe) de ambos os grupos de estudo (MA e FA), no ensaio B.

Tabela 5.3: Resumo da análise de variância (ANOVA) bifactorial – sexo e tratamento – relativa às taxas de mortalidade do ensaio B (p<0,05 – azul – diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,03407	0,03407	2,9153473	0,095493	4,0847397
Tratamento	7	1,49106	0,21301	18,224401	1,26E-10	2,2490241
Sexo - Tratamento	7	0,02558	0,00365	0,3127081	0,943967	2,2490241
Erro	40	0,46752	0,01169			
Total	55	2,01824				

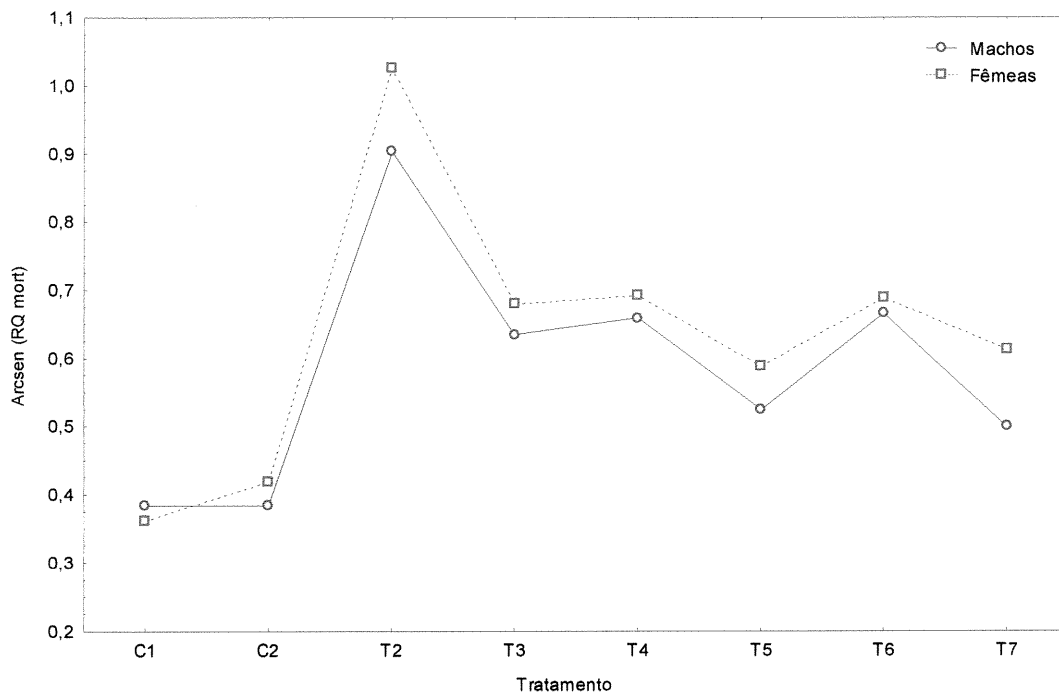


Figura 5.6: Valores transformados de taxas de mortalidade (arcsen (RQ mort)) tendo em conta o sexo e o tratamento, no ensaio B. (C<sub>1</sub> – controlo 1; C<sub>2</sub> – controlo 2; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT; T<sub>7</sub> - injeção de fenoxicarbe).

## MUDAS

Considerando os dois factores em estudo – sexos e tratamentos – foi possível constatar que as frequências de muda neste segundo ensaio foram influenciadas significativamente pelo sexo dos caranguejos (ANOVA bifactorial,  $p < 0.05$ ) (Tab. 5.4). Estas diferenças de frequência de muda têm origem num maior número de mudas registado nos caranguejos machos em todos os tratamentos relativamente às fêmeas. (Fig. 5.7). A superioridade dos machos foi mais visível nos caranguejos em que se injectou 20-OHE e *p*-clorofenilalanina (PCPA) (T<sub>3</sub>), nos que se injectou dimetil- $\beta$ -propionina (DMPT) (T<sub>5</sub>) e nos que se injectou fenoxicarbe (T<sub>7</sub>) (Fig. 5.7 e 5.8). De forma global, os caranguejos machos apresentaram frequências de muda entre 2 e 7% enquanto que as fêmeas variaram entre 0 e 3% (Fig. 5.8). Em ambos os sexos, a frequência de muda mais elevada foi registada nos animais em que se injectou DMPT (machos – 7,3%; fêmeas – 3,1%) (Fig. 5.8).

Tabela 5.4: Resumo da análise de variância (ANOVA) bifactorial – sexo e tratamento - relativa às frequências de muda do ensaio B (<0,05 – azul – diferença significativa).

Fonte de variação	g.l.	SQ	MQ	F	valor P	F crítico
Sexo	1	0,37573	0,37573	40,548904	1,44E-07	4,0847397
Tratamento	7	0,12296	0,01757	1,8957337	0,095847	2,2490241
Sexo - Tratamento	7	0,05195	0,00742	0,8009687	0,591278	2,2490241
Erro	40	0,370646	0,00927			
Total	55	0,92130				

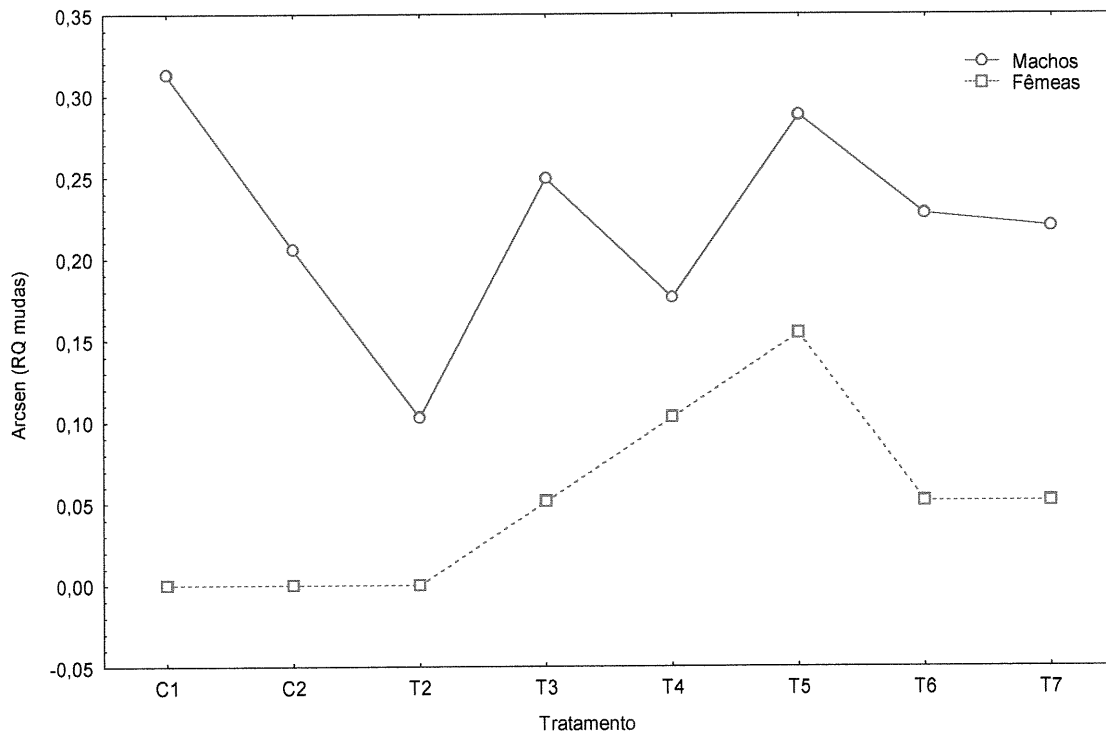


Figura 5.7: Valores transformados de frequências de muda (arcsen (RQ mudas)) tendo em conta o sexo e o tratamento, no ensaio B. (C<sub>1</sub> – controlo 1; C<sub>2</sub> – controlo 2; T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT; T<sub>7</sub> - injeção de fenoxicarbe).

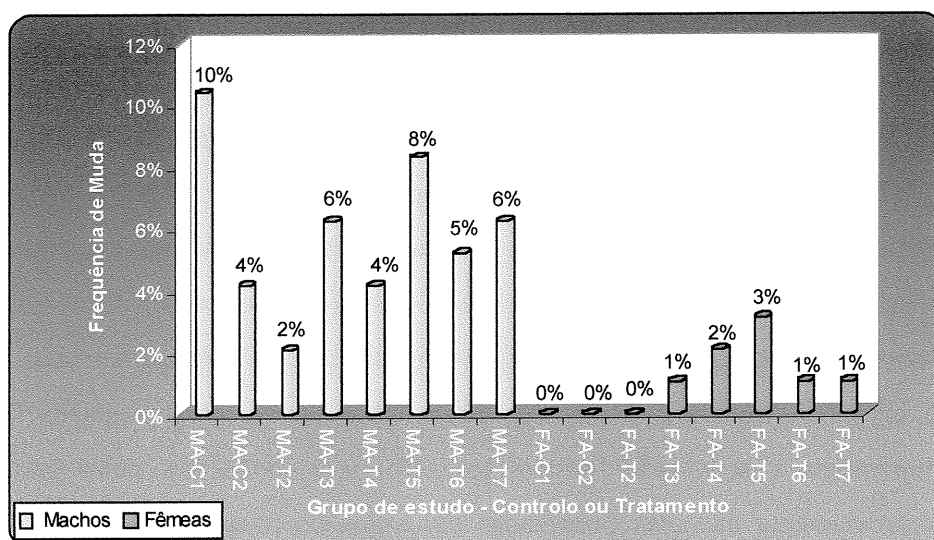


Figura 5.8: Frequências de muda finais (após 26 dias de experiência) nos controles (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) e nos tratamentos testados (T<sub>2</sub> - injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> - injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> - injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> - injeção de DMPT; T<sub>6</sub> - injeção de DMT; T<sub>7</sub> - injeção de fenoxicarbe) dos diferentes grupos de estudo (MA e FA), no ensaio A.

#### 4. DISCUSSÃO

##### MORTALIDADE

Os animais controlo, em ambos os ensaios, apresentaram diferenças bastante acentuadas relativamente às taxas de mortalidade, sendo as taxas de mortalidade do primeiro ensaio extremamente elevadas (entre 58-94%), particularmente nos animais injectados com solução Pantin (C<sub>2</sub>) (entre 85-94%). Porém, no ensaio B ambos os controlos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) apresentaram taxas de mortalidade baixas (entre 6-13%).

Ao contrário do registado no ensaio A desta experiência, as taxas de mortalidade registadas no ensaio B foram relativamente reduzidas, com excepção dos animais em que se injectou 20-OHE e abluou ambos os pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>). As taxas de mortalidade do ensaio B foram cerca de quatro vezes menores às registadas no ensaio A. No entanto, os animais em que se injectou 20-OHE e se abluou os pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>) foram uma excepção pois apresentaram taxas elevadas em ambos os ensaios, apesar das mortalidades do ensaio B (61,5% nos machos e 73,0% nas fêmeas) serem consideravelmente inferiores às registadas no ensaio A (97,9% nos machos e 100% nas fêmeas) com o mesmo tratamento. Esta discrepância nas taxas de mortalidade pode estar relacionada com os parâmetros físico-químicos, nomeadamente a temperatura e a salinidade da água. Os



valores de temperatura e salinidade foram mais elevados no ensaio A (temperatura = 18,5 °C, salinidade = 37,0‰, oxigénio dissolvido = 7,0 mg/l) que no ensaio B (temperatura = 14 °C, salinidade = 27‰, oxigénio dissolvido = 7,6 mg/l), registando-se diferenças de temperatura (4,5°C) e salinidade (10‰) bastante acentuadas. Estas diferenças consideráveis podem dever-se à época do ano em que se realizou cada um dos ensaios da experiência. Assim, o ensaio A foi realizado em Setembro/Outubro (final do Verão e início do Outono) enquanto que o ensaio B foi realizado em Novembro/Dezembro (final do Outono e início do Inverno). Tendo em conta estes factos, os parâmetros físico-químicos (temperatura e salinidade) podem ter sido os responsáveis pelas taxas de mortalidade extremamente elevadas observadas em todos os tratamentos do ensaio A. Para além disso, salienta-se que estes valores inesperados foram registados independentemente do sexo do animal, isto é, quer os machos quer as fêmeas apresentaram taxas de mortalidade bastante elevadas.

A injeção de 20-hidroxicidisona (20-OHE) apresentou taxas de mortalidade extremamente elevadas no ensaio A, provavelmente devido à influência dos factores físico-químicos anteriormente referida. Apesar deste facto, comparando os resultados obtidos com os estudos de Dall e Barclay (1977), verifica-se que estes autores registaram taxas de mortalidade para os controlos muito mais baixas (0-10%) em experiências semelhantes com a lagosta *Panulinus longipes*. Estes mesmos autores (Dall e Barclay, 1977) obtiveram taxas de mortalidade entre 10 e 35% para os tratamentos realizados. Chan *et al.* (1990) também registou taxas de mortalidade baixas nos controlos de camarões (*Penaeus vannamei*) injectados com 20-OHE. No entanto, os animais injectados com a dose mais elevada de 20-OHE (1 µg/g peso fresco) apresentaram uma taxa de mortalidade de 84% após a conclusão de um ciclo da muda (aproximadamente 8 dias), ocorrendo a maior parte das mortes aquando da exuviação (Chan *et al.*, 1990).

Os animais injectados com 20-OHE e em que os pedúnculos oculares foram ablatados (T<sub>2</sub>) registaram, em ambos os sexos e em ambos os ensaios da experiência, as taxas de mortalidade mais elevadas. A ocorrência de elevado número de mortos em animais com ambos os pedúnculos oculares ablatados foram também registadas nas experiências realizadas por Molyneaux e Shirley (1988) com o caranguejo *Paralithodes camtschatica* (69%) e por Chu e Leong (1991) com o camarão *Penaeus chinensis* (81%). Porém, Chan *et al.* (1990) registaram taxas de mortalidade inferiores (entre 25-45%) para

o *Penaeus vannamei* com ambos os pedúnculos oculares ablados, apresentando o controlo e os animais com apenas um pedúnculo ocular ablado taxas de mortalidade entre 0-8%. De igual forma, neste estudo realizado com *C. maenas*, foram também registadas taxas de mortalidade superiores em animais com ambos os pedúnculos oculares ablados do que nos outros tratamentos. As taxas de mortalidade elevadas dos animais do T<sub>2</sub>, em ambos os ensaios da experiência, podem estar relacionadas com a dificuldade dos caranguejos recuperarem da ablação dos pedúnculos oculares e das duas injeções realizadas.

Quer a ciproheptadina (CPH) quer a *p*-clorofenilalanina (PCPA) foram sempre injectadas em conjunto com a 20-OHE. A utilização dos dois compostos teve como objectivo intervir no ciclo da muda de duas formas, por um lado a utilização da ciproheptadina e da *p*-clorofenilalanina pretendia inibir a hormona inibidora da muda, enquanto que a utilização da 20-OHE pretendia aumentar as concentrações da hormona estimuladora do ciclo da muda. Relativamente às taxas de mortalidade, apenas foi possível identificar uma diferença em ambos os ensaios da experiência, isto é, as taxas de mortalidade foram mais elevadas no ensaio A, em ambos os tratamentos (T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>), provavelmente devido às diferenças físico-químicas da água. Uma vez que o único trabalho realizado com os compostos PCPA e CPH (Mattson e Spaziani, 1986a) não teve como objectivo a indução da muda, não foi possível comparar as taxas de mortalidade.

Os compostos dimetil- $\beta$ -proprionina (DMPT) e dimetilacetona (DMT) apresentaram taxas de mortalidade extremamente elevadas no ensaio A. No ensaio B, o tratamento com DMPT (T<sub>5</sub>) apresentou uma taxa de mortalidade nos machos (26%) ligeiramente inferior à das fêmeas (31%). Por outro lado, também no ensaio B, o tratamento com DMT (T<sub>6</sub>) apresentou taxas de mortalidade semelhantes para os machos (39%) e para as fêmeas (41%). Um estudo com o camarão *Palaemon paucidens*, registou taxas de mortalidade entre 25 e 50% após sujeitar os animais a soluções com 0,1mM de DMPT ou de DMT. Desta forma e apesar das concentrações de DMPT e DMT utilizadas na última injeção (segunda injeção do ensaio B) serem cerca de 10 vezes (216 e 210  $\mu\text{g/mL}$ ) superiores às utilizadas por Nakajima (1991), este autor registou taxas de mortalidade mais elevadas nos animais submetidos a tratamentos com DMPT (30-50%) e DMT (25%).

O fenoxicarbe, um insecticida, não induziu taxas de mortalidade (20-30%) elevadas apesar de ter sido injectado numa elevada concentração (10 mg/mL),

considerando as concentrações (por exemplo: 0,02 µg/insecto ou 1mg/mL) usadas por Grenier e Grenier (1993) nas experiências efectuadas por estes autores com diversas espécies de insectos. Tendo em conta as mortalidades relativamente baixas registadas, levanta-se ainda a hipótese de se efectuar um aumento da concentração do fenoxicarbe para se averiguar se dessa forma este composto influencia o ciclo da muda dos crustáceos.

### MUDAS

No ensaio A, os controlos (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) de ambos os sexos apresentaram frequências de muda semelhantes (entre 2-6%). Por outro lado, no ensaio B, os controlos dos machos (entre 4-8%) registaram algumas mudas enquanto os controlos das fêmeas não registaram qualquer muda (0%). O C<sub>1</sub> dos machos foi a que registou a frequência de muda mais elevada (8,3%) no ensaio B da experiência. Por outro lado, o C<sub>1</sub> das fêmeas registou um dos valores mais elevados de frequência de muda (6,2%) do ensaio A.

De um modo geral, as frequências de muda foram mais elevadas nas fêmeas no ensaio A (Sep./Oct.), enquanto os machos registaram valores mais elevados no ensaio B (Nov./Dec.). Os resultados obtidos podem estar relacionados com as diferenças existentes entre os ciclos de crescimento das fêmeas e dos machos. No entanto, os resultados obtidos não são coincidentes com os dados apresentados por Queiroga (1987) relativamente aos machos, isto porque os machos apresentam o seu período principal de muda entre Fevereiro e Julho. A predominância das frequências de muda nas fêmeas no ensaio A coincidem com os dados de Queiroga (1987) que afirma que o período principal de muda das fêmeas é entre Maio e Outubro.

Relativamente às frequências de muda, a injeção de 20-OHE (T<sub>1</sub>) (apenas efectuada no ensaio A) não registou nenhuma indução dos processos da muda quer nos machos quer nas fêmeas, logo as frequências de muda (1-2%) observadas foram muito baixas. Os dados obtidos no ensaio A da experiência não coincidem com os apresentados por Bazin (1977), o qual, utilizando também caranguejos *Carcinus maenas*, obteve um elevado número de mudas (66%) após uma dupla injeção de ecdisona (hormona da muda). Na experiência de Bazin (1977), as injeções foram dadas apenas com uma diferença de 24 horas, ao contrário do que foi realizado neste estudo em que a segunda injeção foi ministrada 5 (ensaio B) ou 7 (ensaio A) dias depois. Apesar disso, no estudo aqui descrito a concentração de ecdisona utilizada foi de 0,1 mg/mL (caranguejos com

larguras de carapaça aproximada de 4 cm e com cerca de 1 mL de hemolinfa), enquanto que Bazin (1977) injectou 10 µg/g usando caranguejos com cerca de metade do tamanho (≈2 cm). Como já foi referido, a ecdisona é a hormona precursora da 20-OHE, o que poderia indicar que a injeção da própria hormona da muda activa (20-OHE) pudesse resultar num elevado número de exuviações precoces, o que não se veio a verificar na primeira parte (ensaio A) desta experiência.

A injeção da 20-OHE e a ablação de pedúnculos oculares (T<sub>2</sub>) apresentou frequências de muda muito baixas em ambos os ensaios da experiência e em ambos os sexos, o que poderá indicar que este tipo de tratamento pode inibir o ciclo da muda. Os resultados observados estão de acordo com os dados apresentados por Buchholz e Adelung (1979) onde este tratamento apresentou indução da muda de forma esporádica. A espécie utilizada no estudo atrás mencionado foi também o caranguejo *Carcinus maenas*, no entanto, nos ensaios desta experiência, com excepção da primeira injeção no ensaio A, utilizou-se concentrações de 20-OHE duas vezes superiores (1 mg/mL) às utilizadas por Buchholz e Adelung (1979).

Nos tratamentos T<sub>3</sub> (injeção de PCPA e 20-OHE) e T<sub>4</sub> (injeção de CPH e 20-OHE), as frequências de muda observadas não mostraram alterações significativas do processo do ciclo da muda, no entanto, algumas diferenças foram registadas quando se comparou os dois ensaios relativamente aos sexos. Verificaram-se frequências de muda diferentes para os machos e fêmeas nos dois ensaios da experiência. No ensaio A, a frequência de muda das fêmeas foi superior à dos machos, tendo acontecido o oposto no ensaio B (a razão provável para estes resultados já foi referida anteriormente, os diferentes ciclos de crescimento apresentados pelos machos e fêmeas e os factores físico-químicos). Realça-se o facto do T<sub>4</sub> (20-OHE+CPH) ter registado a frequência de muda (10,4%) mais elevada no ensaio A. Os autores Mattson e Spaziani (1986a) indicam a possibilidade de existir um processo mediado pela 5-hidroxitriptamina (estimula a produção de MIH) e que envolve o órgão X e o Y que controla os ecdisteróides circulantes na hemolinfa, influenciando por isso processos biológicos como a muda e a regeneração. Ao não serem obtidos resultados que indicassem uma indução da muda efectiva através da utilização destes dois compostos (PCPA e CPH), não é possível confirmar a hipótese levantada por Mattson e Spaziani (1986a).

Em ambos os ensaios, as frequências de muda registadas para os tratamentos T<sub>5</sub> (injecção DMPT) e T<sub>6</sub> (injecção DMT) foram semelhantes. A comparação do número de mudas por caranguejo obtido neste estudo com os dados obtidos por Nakajima (1991) permitem verificar que este autor obteve um número superior de mudas por camarão. Assim, este autor registou 0,6 mudas/camarão para o DMPT e 0,4 mudas/camarão para o DMT. No estudo aqui realizado, embora utilizando concentrações dos compostos superiores (10 vezes), o valor máximo registado foi de 0,1 mudas/caranguejo. Nesta comparação não se pode esquecer que existe uma diferença importante entre o ciclo da muda de um camarão e um caranguejo que com certeza influenciou estes resultados. Assim, o camarão apresenta uma pré-muda mais longa que a intermuda (crustáceo diecdísico) enquanto que no caranguejo se verifica precisamente o contrário (crustáceo com ciclo da muda anecdísico).

O estudo do efeito do fenoxicarbe em insectos permitiu registar alterações significativas no desenvolvimento normal destes animais (quer no crescimento quer no ciclo reprodutivo) após a aplicação deste insecticida em pequenas doses (por exemplo: 1 mg/mL) (Grenier & Grenier, 1993). A identificação deste composto – fenoxicarbe - como um regulador do crescimento dos insectos (Grenier e Grenier, 1993) indica uma possível influência deste composto no ciclo de crescimento dos crustáceos. No entanto, os resultados obtidos não confirmaram essa possibilidade, isto porque, o fenoxicarbe (10 mg/mL) não apresentou qualquer influência no ciclo da muda do caranguejo *Carcinus maenas*. Os caranguejos machos registaram taxas de muda mais elevadas que as fêmeas, no entanto, essas taxas não apresentaram diferenças significativas.

## **DISCUSSÃO GERAL**



## DISCUSSÃO GERAL

A utilização da espécie *Callinectes sapidus* na produção de caranguejos moles constitui, actualmente, uma indústria em franca expansão nos E. U. da América (Lee e Wickins, 1992). Não foi possível aplicar o método utilizado na produção de caranguejos moles de *C. sapidus* na espécie *Carcinus maenas* porque a identificação da fase da muda neste último é invasiva e demorada (observação ao microscópio óptico do endopódito do 1º maxilípede). Desta forma, a produção de caranguejos moles de *C. maenas* implica a procura de um ou mais estímulos que conduzam à indução da muda (exuviação). Diversas experiências foram realizadas com o intuito de avaliar o efeito de diversos estímulos quer ao nível da frequência de muda quer da taxa de mortalidade dos caranguejos. Apesar de se terem obtido alguns dados relevantes relativamente à mortalidade, não se conseguiu encontrar um estímulo eficaz que conduzisse à indução da muda no *C. maenas*.

Inicialmente, visto os ecdisteróides serem decisivos no desenrolar do ciclo da muda, efectuou-se a quantificação destes compostos na hemolinfa de *C. maenas*. Já foi comprovado por diversos autores (Fingerman, 1987; Lachaise *et al.*, 1993; Pechenik, 1996) que a ecdisona (hormona da muda) e a 20-hidroxiecdisona (20-OHE) (hormona da muda activa) pertencem à família dos ecdisteróides, desempenhando um papel fundamental no desencadear de determinados processos que levam à exuviação. Para estudar os ecdisteróides efectuou-se a extracção, purificação e quantificação quer dos ecdisteróides totais quer da ecdisona e da 20-hidroxiecdisona na hemolinfa do caranguejo verde. Com este estudo foi possível obter um perfil tipo de ecdisteróides totais na espécie em estudo, no qual se realça o aumento brusco das concentrações destes compostos nas fases finais (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) do ciclo da muda. Facto que também já havia sido registado em várias outras espécies de crustáceos (Baldaia *et al.*, 1984; Durliat *et al.*, 1988; Okumura *et al.*, 1989; Demeusy *et al.*, 1994). A 20-OHE apresenta uma concentração superior a todas as outras hormonas ao longo de quase todo o ciclo da muda (excepto fase C), podendo por isso ser considerada o principal ecdisteróide presente na hemolinfa de *C. maenas*. Os picos de 20-OHE, à semelhança do que foi verificado nos ecdisteróides totais, foram registados no final da pré-muda (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). A utilização destas técnicas (HPLC e EIA) para o estudo dos ecdisteróides visou também o aperfeiçoamento e optimização das mesmas para que, no futuro, possam ser utilizadas na compreensão do modo de acção, a nível hormonal, de um estímulo que induza eficazmente a muda.



As diversas experiências realizadas com o intuito de procurar um ou mais estímulos que induzissem a muda no *C. maenas* abrangeram quatro tratamentos, os quais foram já identificados como estímulos da muda nesta e noutras espécies de crustáceos.

A exposição ao ar, isto é, a indução de fenómenos de hipoxia (redução da concentração de oxigénio) na hemolinfa, foi utilizada com sucesso em três espécies de camarão (*Palaemon serratus*, *Palaemonetes varians* e *Penaeus semisulcatus*) (Coimbra *et al.*, 1985; Clark, 1986; Carvalho *et al.*, 1989), no entanto, no caranguejo *C. maenas* não se obtiveram resultados positivos. Apesar disso, tendo em conta os vários períodos de exposição ao ar, verificou-se que a frequência de muda mais elevada (19%) foi registada quer nos machos expostos durante 120 horas quer nas fêmeas expostas durante 144 horas, embora de forma não significativa. Em ambos os casos atrás referidos, os caranguejos (machos e fêmeas) foram capturados por arrasto, levando a que, em termos gerais, as frequências de muda registadas em animais provenientes da pesca por arrasto fossem significativamente superiores às registadas pelos animais pescados com nassas. Estes resultados pressupõem que a utilização de um maior número de caranguejos em pré-muda, que é o caso dos capturados por arrasto (ver pág. 98), poderá resultar em frequências de muda mais elevadas.

Diversos autores já comprovaram que a ablação de pedúnculos oculares (PO) e/ou patas locomotoras (PL) é um método viável da indução da muda em algumas espécies de crustáceos (Fingerman e Fingerman, 1974; Molyneaux e Shirley, 1988; Chu e Leong, 1991; entre outros). Os ensaios realizados com a espécie *Carcinus maenas* permitiram verificar, à semelhança do registado com a espécie *Penaeus chinensis* (Chu e Leong, 1991), que os caranguejos aos quais se ablu os pedúnculos oculares (PO) e aos que se ablu simultaneamente os PO e as PL apresentaram taxas de mortalidade bastante elevadas. No entanto, ao contrário do esperado, também os animais controlo apresentaram mortalidades relativamente elevadas (entre 19 e 49%). No que diz respeito às frequências de muda, salienta-se que, de forma geral, os machos mudaram em maior número do que as fêmeas. Consequentemente, quer nos machos/arrasto quer nos machos/nassas foram registados resultados positivos no número de mudas observados, apesar das respectivas frequências de muda não se apresentarem como significativamente diferentes. O resultado mais relevante foi obtido nos caranguejos machos/nassas em que se ablu quatro PL, os quais atingiram uma frequência de muda de 22% após os primeiros 15 dias do ensaio A.

No entanto, o facto de não se ter registado qualquer muda até ao final desse mesmo ensaio fez com que a frequência de muda dos animais controlo tenha atingido um valor semelhante ao dos machos/nassas com ablação de PL. Num segundo ensaio (ensaio B), efectuou-se novamente a ablação de PL em machos/nassas mas o resultado observado não atingiu o mesmo sucesso registado nos primeiros dias do ensaio A, nomeadamente ao nível da frequência de muda, a qual registou um valor muito inferior (1%) neste segundo ensaio.

As injeções da hormona da muda activa (20-OHE) e de alguns compostos químicos não apresentaram resultados relevantes relativamente à indução da muda. A possível influência dos factores físico-químicos da água (temperatura, salinidade e oxigénio dissolvido) nos resultados obtidos ficou patente devido a taxas de mortalidade bastante diferentes em dois ensaios em que os tratamentos efectuados foram idênticos. Assim, registaram-se mortalidades muito elevadas no ensaio A (entre 60 e 100%) e bastante mais baixas no ensaio B (entre 13 e 73%). Ainda relativamente às taxas de mortalidade, de acordo com o que já foi verificado por alguns autores noutras espécies de crustáceos (Molyneaux e Shirley, 1988; Chu e Leong, 1991), a ablação de pedúnculos oculares produz um elevado número de mortes, facto também registado em ambos os ensaios da experiência em que se injectou a 20-OHE e se ablu ambos os pedúnculos oculares. Será importante realçar o facto de no ensaio A se ter cauterizado os orbitáculos (após ablação dos pedúnculos oculares) enquanto que no ensaio B isso não foi efectuado. Apesar disso, as taxas de mortalidade dos caranguejos aos quais se ablu pedúnculos oculares foram bastante elevadas em ambos os ensaios, embora no ensaio A a taxa tenha atingido, em alguns casos, 100% de mortos. Relativamente às frequências de muda, salienta-se que o valor mais elevado foi registado nas fêmeas em que se injectou simultaneamente 20-OHE e ciproheptadina (CPH) (10%), embora sem se mostrar significativamente superior.

O objectivo com que se elaboraram as experiências descritas neste estudo - indução da muda no caranguejo verde - não foi alcançado mas os resultados obtidos fornecem algumas indicações para a possível realização de futuras experiências. O registo dos parâmetros físico-químicos permitiu verificar que as suas variações poderão estar na origem da variabilidade de alguns dos resultados, como por exemplo, as taxas de mortalidade muito diferentes no ensaio A e B da experiência de injeção de 20-OHE e outros compostos químicos (capítulo 5). A influência dos factores físico-químicos sobre o

ciclo da muda dos crustáceos, como por exemplo a temperatura, foi já comprovada por diversos autores (Chittleborough, 1975; Koshio *et al.*, 1989; Justo *et al.*, 1991). O ritmo biológico normal do caranguejo (existência de alturas determinadas para o crescimento ou para a reprodução) poderá ter influenciado decisivamente as frequências de muda obtidas. Como se sabe, o desenrolar do ciclo reprodutor influencia directamente o ciclo de crescimento dos caranguejos uma vez que o animal ou utiliza as suas energias para a reprodução ou para o crescimento. A interferência do ciclo reprodutor no crescimento apresenta um maior ênfase nas fêmeas pois estas necessitam de estar moles (pós-muda) para copular enquanto que os machos têm que estar em intermuda. Para além disso, as fêmeas durante o período em que estão ovadas não efectuam a muda.

Devido à utilização de grupos de estudo idênticos nas diferentes experiências é possível efectuar a comparação dos resultados observados, nomeadamente, em animais controlo. Esta comparação permitiu concluir que as condições físico-químicas e a altura do ano em que se realizaram as experiências, assim como o sexo e as fases da muda dos caranguejos utilizados, são fundamentais para perceber as diferenças encontradas. Frequências de muda diferentes entre as várias experiências e também entre ensaios distintos da mesma experiência (ensaios em que os estímulos utilizados eram idênticos) foram registadas. Assim, nas diferentes experiências foi possível verificar frequências de muda distintas tendo em conta as artes de pesca (capítulo 3) ou tendo em conta os sexos (capítulo 4 e 5). Para além disso, quando se verificou frequências de muda diferentes entre sexos foi ainda observado que tanto foram os machos a mudar em maior número (capítulo 4 – ensaio A; capítulo 5 – ensaio B) como foram as fêmeas (capítulo 5 – ensaio A).

A análise de todos os procedimentos efectuados neste estudo permitiram retirar algumas ilações relativamente aos métodos a utilizar em futuras experiências. O número de animais utilizado em cada experiência foi bastante elevado, o que implicou a utilização de um sistema de grandes dimensões onde era extremamente dispendioso controlar os parâmetros físico-químicos, tais como a temperatura e salinidade. Desta forma, para uma melhor percepção dos efeitos provocados no ciclo da muda pela exposição ao ar, pela ablação de PO e/ou PL e pela injeção de alguns compostos químicos, seria aconselhável a utilização de um número inferior de animais para que fosse possível utilizar um sistema de pequenas dimensões onde se pudesse controlar os factores físico-químicos (exemplo: temperatura, salinidade e oxigénio dissolvido da água, fotoperíodo, etc.). Ao mesmo tempo

que se efectuava o controle dos parâmetros físico-químicos, tentar-se-ia também minimizar o efeito da época do ano recriando as condições existentes na época do ano em que o caranguejo verde (*Carcinus maenas*) apresenta maior apetência (ritmo biológico) para mudar (entre Fevereiro e Julho nos machos e entre Maio e Outubro para as fêmeas) (Queiroga, 1987). A forma mais prática de eliminar a influência da reprodução nas experiências seria optar-se apenas pela utilização de caranguejos machos, isto porque são as fêmeas que mais sofrem a influência deste importante processo biológico.

Finalmente, será importante recordar que qualquer experiência realizada futuramente, no caso de permitir a identificação de um estímulo positivo e efectivo da muda, poderá ser acompanhada de um estudo hormonal para avaliar as variações no perfil de ecdisteróides totais ou das principais hormonas intervenientes no ciclo da muda (ecdisona e 20-hidroxicdisona). Este estudo utilizará as técnicas que foram adaptadas e optimizadas (HPLC e EIA) para um estudo fiável dos ecdisteróides presentes na hemolinfa do caranguejo verde *Carcinus maenas*.



## **CONCLUSÕES**



## CONCLUSÕES

As diversas experiências realizadas não permitiram encontrar um estímulo efectivo de indução da muda no caranguejo verde *Carcinus maenas*. No entanto, podem realçar-se alguns aspectos mais relevantes dos resultados obtidos:

- A frequência de muda mais elevada foi registada nos caranguejos machos, capturados através de nassas, em que se abluu quatro patas locomotoras (21%), embora sem apresentar diferenças significativas.
- As taxas de mortalidade mais elevadas foram registadas em animais em que se abluu os pedúnculos oculares. Também os animais expostos ao ar durante períodos mais longos apresentaram taxas de mortalidade bastante elevadas.
- As frequências de muda dos machos e fêmeas registaram variações consideráveis nas diversas experiências efectuadas, tendo-se verificado que, em algumas experiências os machos mudavam mais e noutras as fêmeas dominavam essas frequências de muda.
- As experiências realizadas permitiram concluir que quase não houve diferenças nas frequências de muda no que diz respeito às artes de pesca. Na única vez em que as frequências de muda foram significativamente diferentes entre as duas artes de pesca (capítulo 3), foram os caranguejos capturados por arrasto que mudaram mais frequentemente. Os animais capturados por arrasto apresentam uma maior variedade de animais nas diferentes fases do ciclo da muda, isto é, apesar da maioria estar na fase C, existem também caranguejos nas fases de pós-muda (fases A e B) e pré-muda (fases D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Por sua vez, os caranguejos capturados com nassas apresentam uma quase totalidade de caranguejos na intermuda (fase C). Estes dados deixam antever que a fase da muda em que o caranguejo se encontra é extremamente importante em experiências de indução da muda no *C. maenas*, à semelhança do que é avançado por diversos autores para outras espécies de crustáceos.
- O aperfeiçoamento das técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e enzimo-imuno-ensaio (EIA) na determinação dos ecdisteróides totais e/ou das hormonas ecdisona e 20-hidroxicdisona na hemolinfa do caranguejo verde *Carcinus maenas*



poderá ser bastante importante no futuro. Estas técnicas permitirão efectuar uma análise das diversas alterações hormonais resultantes da utilização de um ou mais estímulos que induzam a exuviação de forma efectiva ou que consigam diminuir o tempo de intermuda.

## **BIBLIOGRAFIA**



- ADIYODI, K.G. & ADIYODI, R.G. (1970). Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol.Rev.* **45**, 121-165.
- ANDRE, S. (1985). Status of the Florida soft crab fishery. *National Symposium on the Soft-Shelled Blue Crab Fishery*, 96-99.
- ANDRIEUX, N., PORCHERON, P., BERREUR-BONNENFANT, J. & DRAY, F. (1976). Détermination du taux d'ecdysone au cours du cycle d'intermue chez le crabe *Carcinus moenas*; comparaison entre individus sains et parasités par *Sacculina carcini*. *C.R.Acad.Sci.Paris*, **283**, 1429-1432.
- ANDRIEUX, N., PORCHERON, P. & BERREUR-BONNENFANT, J. (1981). Etudes quantitative et qualitative des Ecdysteroïdes présents *in vivo* chez le Crabe *Carcinus maenas* sain ou parasité par *Sacculina carcini*. *Arch.Zool.exp.gén.* **122**, 99-108.
- ARROBAS, I. (1983). Desenvolvimento embrionário e incubação dos ovos de *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) em laboratório. *Seminar.sobre Aquacult.*, 53-70.
- ARROBAS, I. & RUANO, F. (1986). Nota preliminar sobre a cultura do camarão japonês (*Penaeus japonicus* Bate, 1886), em Portugal. *4º Congresso sobre o Algarve*, **1**, 505-510.
- BALDAIA, L., PORCHERON, P., COIMBRA, J. & CASSIER, P. (1984). Ecdysteroids in shrimp *Palaemon serratus* relations with molt cycle. *General and Comparative Endocrinology* **55**, 437-443.
- BAZIN, F. (1977). Effets d'injections d'ecdystérone sur la mue et la régénération chez le Crabe *Carcinus maenas* (L.). *C.R.Acad.Sc.Paris* **284 (série D)**, 765-768.
- BORST, D.W., LAUFER, H., LANDAU, M., CHANG, E.S., HERTZ, W.A., BAKER, F.C. & SCHOOLEY, D.A. (1987). Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect Biochemistry* **17(7)**, 1123-1127.
- BROEKHUYSEN JR., G.J. (1936). On development, growth and distribution of *Carcinides maenas* (L.). *Archives Neerlandaise de Zoologie* **2**, 257-399.
- BROWDY, C.L. & SAMOCHA, T.M. (1985). The effect of eyestalk ablation on spawning, molting and mating of *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquaculture* **49**, 19-29.
- BUCHHOLZ, F. & ADELUNG, D. (1979). Untersuchungen zur Wirkung von injiziertem  $\beta$ -Ecdyson auf die Strandkrabbe *Carcinus maenas* L. (Investigations on the effects of injected Ecdysone upon the green shore crab *Carcinus maenas* L.). *Z.Naturforsch.* **34c**, 608-611.
- CARLISLE, D.B. (1957). On the hormonal inhibition of moulting in Decapod Crustacea. II. The terminal anecdisis in crabs. *J.mar.biol.Ass.U.K.*, 291-307.
- CARVALHO, F., GONZALEZ, I., ROCHA, A. & COIMBRA, J. (1989). Efeito da indução da hipercápnia no ciclo da muda em *Palaemon serratus* e *Palaemonetes varians*. In *Resumos do Seminário de Aquacultura*, ed. UNIVERSIDADE DO ALGARVE. 18-20 Janeiro, Faro, Portugal.
- CARVALHO, F., CORTEZ, A., BALDAIA, L. & CARDOSO, J.M. (1994). Extração e purificação de hormonas sexuais esteróides e ecdisteróides no camarão *Penaeus japonicus*. In *Actas do XIV Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química*, ed. SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA. 5-8 Abril Aveiro, Portugal.
- CARVALHO, F. (1997). Reprodução de crustáceos peneídeos - endocrinologia e ultraestrutura da ovogénese. 1-313. Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar - Universidade do Porto.

- CARVALHO, F., BELA, J., SANTOS, H. & ABREU, C. (1999). Resultados preliminares sobre a caracterização da população de caranguejo verde *Carcinus maenas* L., na ria de Aveiro (Portugal). In *Libro de Resúmenes Ampliados, Tomo I, VIII COLACMAR*, eds. ALVARO E. TRESIERRA AGULAR & ZOILA G. CULQUICHICON MALPICA, pp. 48-49. 17-21 de Octubre, Trujillo, Peru.
- CHAN, S.-M., RANKIN, S.M. & KEELEY, L.L. (1990). Effects of 20-hydroxyecdysone injection and eyestalk ablation on the moulting cycle of the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Comp.Biochem.Physiol.* **96A(1)**, 205-209.
- CHANG, E.S. & BRUCE, M.J. (1980). Ecdysteroid titers of juvenile lobsters following molt induction. *The Journal of Experimental Zoology* **214**, 157-160.
- CHANG, E.S. (1989). Endocrine regulation of molting in Crustacea. *Critical Reviews in Aquatic Sciences.*, **1**, 131-157.
- CHANG, E.S. (1991). Crustacean molting hormones: cellular effects, role in reproduction, and regulation by molt-inhibiting hormone. In *Frontiers of shrimp research*, eds. DELOACH, P.F., DOUGHERTY, W.J. & DAVIDSON, M.A., pp. 83-105. New York, United States of America.
- CHANG, E.S. (1993). Comparative endocrinology of molting and reproduction: Insects and Crustaceans. *Annu.Rev.Entomol.* **38**, 161-180.
- CHANG, E.S., BRUCE, M.J. & TAMONE, S.L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *Amer.Zool.* **33**, 324-329.
- CHANG, E.S. (1995). Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **193**, 1-14.
- CHENG, J.-H. & CHANG, E.S. (1991). Ecdysteroid treatment delays ecdysis in the lobster, *Homarus americanus*. *Biol.Bull.* **181**, 169-174.
- CHITTLEBOROUGH, R.G. (1975). Environmental factors affecting growth and survival of juvenile western rock lobsters *Panulirus longipes* (Milne-Edwards). *Aust.J.Mar.Freshwater Res.* **26**, 177-196.
- CHU, K.H. & LEONG, P.K.K. (1991). Effects of eyestalk ablation and limb amputation on the moult cycle of the shrimp *Penaeus chinensis*. *Mar.Behav.Physiol.* **19**, 27-33.
- CLARK, J.V. (1986). Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (de Haan) by long-term hypoxia. *Aquaculture* **52**, 253-254.
- CLEMENS, S., MASSABAU, J., MEYRAND, P. & SIMMERS, J. (1999). Changes in motor network expression related to moulting behaviour in lobster: Role of moult-induced deep hypoxia. *The Journal of Experimental Biology* **202**, 817-827.
- COHEN, A.N., CARLTON, J.T., & FOUNTAIN, M.C. (1995). Introduction, dispersal and potential impacts of green crab *Carcinus maenas* in San Francisco Bay, California. *Marine Biology* **122**, 225-237.
- COIMBRA, J., ALBUQUERQUE, A.C. & BAPTISTA, P. (1985). As modificações do equilíbrio ácido-base ao longo do ciclo de intermuda em crustáceos e o sincronismo da muda. *Pesca e Navegação*, 40-44.
- COOKE, I.M. & SULLIVAN, R.E. (1982). Hormones and neurosecretion. In: H. Atwood and D. Sandeman (Eds.), *The Biology of Crustacea*. New York, Academic Press, Vol. 3, ch. 6, 206-291.
- CROTHERS, J.H. (1967). The biology of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) 1. The background - anatomy, growth and life history. *Field Studies* **2**, 407-434.

- CUZIN-ROUDY, J., STRAMBI, C., STRAMBI, A. & DELBECQUE, J.-P. (1989). Hemolymph ecdysteroids and molt cycle in males and females of *Siriella armata* M. -Edw. (Crustacea: Mysidacea): possible control by the MI-ME X-organ of the eyestalk. *General and Comparative Endocrinology* **74**, 96-109.
- DALL, W. & BARCLAY, M.C. (1977). Induction of viable ecdysis in the western rock lobster by 20-Hydroxyecdysone. *General and Comparative Endocrinology* **31**, 323-334.
- DEMEUSY, N. (1958). Recherches sur la mue de puberté du décapode brachyoure *Carcinus maenas* Linné. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **95**, 253-492.
- DEMEUSY, N. (1963). Influence des facteurs saisonniers sur la réalisation de la puberté au sein d'une population de *Carcinus maenas* L. des côtes de la Manche. *Séance*, 4762-4764.
- DEMEUSY, N., MARGUERITE, C., MORINIÈRE, M., MOUSSEAU, L. & PORCHERON, P. (1994). Changes in ecdysteroid levels during regeneration of a limb in *Pilumnus hirtellus*. *Comp.Biochem.Physiol.* **108A:2/3**, 239-243.
- DRACH, P. & TCHERNIGOVITZEFF, C. (1967). Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu* **18A**, 595-609.
- DUPAUL, W.D. (1985). The development of an export market for soft crabs: Japan. *National Symposium on the Soft-Shelled Blue Crab Fishery*, 71-75.
- DURLIAT, M., MORINIÈRE, M. & PORCHERON, P. (1988). Changes in ecdysteroids in *Astacus leptodactylus* during the molting cycle. *Comp.Biochem.Physiol.* **89A(2)**, 223-229.
- FALCIAI, L. & MINERVINI, R. (1996). Guide des homards, crabes, langoustes, crevettes et autres crustacés décapodes d'Europe. Coleção Les guides du naturaliste. Ed by Delachaux et Niestlé, 287 pp. Paris, França.
- FAO - Fisheries Department (2000a). Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables -> Data sets - Total production 1950-1999. FAO - Food and Agriculture Organization.
- FAO - Fisheries Department (2000b). The State of World Fisheries and Aquaculture 2000. FAO - Food and Agriculture Organization.
- FAO - Fisheries Department (2000c). Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables -> Data sets - Capture production 1970-1999. FAO - Food and Agriculture Organization.
- FAO - Fisheries Department (2000d). Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables -> Data sets - Aquaculture production: quantities 1970-1999. FAO - Food and Agriculture Organization.
- FAO - Fisheries Department (2000e). Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables -> Data sets - Aquaculture production: values 1970-1999. FAO - Food and Agriculture Organization.
- FIGUEIREDO, M.J. (1972). Sobre a cultura de Crustáceos Decápodes em laboratório: *Nephrops norvegicus* (lagostim) e *Penaeus kerathurus* (camarão). *Bol.Junta Nac.Fom.das Pescas*, **24(9)**, 61-81.
- FINGERMAN, M. & FINGERMAN, S.W. (1974). The effect of limb removal on the rate of ecdysis of eyed and eyestalkless fiddler crabs, *Uca pugilator*. *Zool.Jb.Physiol.Bd.* **78S**, 301-309.
- FINGERMAN, M. (1987). The endocrine mechanisms of crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* **7(1)**, 1-24.
- FINGERMAN, M. (1992). Glands and secretion. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 10 - Decapod Crustacea*, eds. HARRISON, F.W. & HUMES, A.G., pp. 295-343. Wiley-Liss, Inc.

- FINGERMAN, M. (1997). Crustacean Endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiological Zoology* **70**, 257-269.
- FONSECA, L.C. & LUIS, O.J. (1992). Considerações finais sobre a população do caranguejo-verde (*Carcinus maenas*) na Lagoa de Santo André. In *Colóquio - Conservação dos Recursos Vivos Marinhos*, ed. INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO DAS PESCAS, pp. 329-347. Lisboa, Portugal
- FOWLER, J. & COHEN, L. (1990). *Practical Statistics for Field Biology*. Open University Press.
- GOMES, V. (1991a). O caranguejo *Carcinus maenas* (L.) da Ria de Aveiro: dados sobre o valor económico, avaliação do stock e esforço de pesca. In *Seminário - A Zona Costeira e os Problemas Ambientais*, ed. EUROCOAST - COMISSÃO NACIONAL, pág. 159-166. Aveiro, Portugal.
- GOMES, V. (1991b). First results of tagging experiments on crab *Carcinus maenas* (L.) in the Ria de Aveiro lagoon - Portugal. *Ciênc.Biol.Ecol.Syst.(Portugal)* **11(1/2)**, 21-29.
- GRENIER, S. & GRENIER, A.-M. (1993). Fenoxycarb, a fairly new Insect Growth Regulator: a review of its effects on insects. *Ann.appl.Biol.* **122**, 369-403.
- GUERIN, J. & STICKLE, W. (1997). A comparative study of two sympatric species within the genus *Callinectes*: osmoregulation, long-term acclimation to salinity and the effects of salinity on growth and moulting. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **218**, 165-186.
- HARMATHA, J. and DINAN, L. (1997). Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the B<sub>11</sub> bioassay. *Arch.Insect Biochem.Physiol.*, **35**, 219-225.
- HARTNOLL, R.G. (1969). Mating in the Brachyura. *Crustaceana* **16(2)**, 161-181.
- HARTNOLL, R.G. (2001). Growth in Crustacea - twenty years on. *Hydrobiologia* **449**, 111-122.
- HASEGAWA, Y., HIROSE, E. & KATAKURA, Y. (1993). Hormonal control of sexual differentiation and reproduction in Crustacea. *American Zoology* **33**, 403-411.
- HERREID, C.F. (1980). Hypoxia in invertebrates. *Comp.Biochem.Physiol.* **67(A)**, 311-320.
- HIGHNAM, K.C. & HILL, L. (1977). *The Comparative Endocrinology of the Invertebrates*. Ed by EDICIONES OMEGA, S.A., pp. 283, Barcelona, Espanha.
- HILDE, R.M.A., WALGRAEVE, P. & VERHAERT, D.E.M. (1988). Presence and function of ecdysteroids in invertebrates. *ISI Atlas of Science: Plants & Animals* **1**, 164-172.
- HOAR, W.S. & HICKMAN, C.P.J. (1978). *Manual de laboratorio para fisiologia general y comparada*. Barcelona:
- HOPKINS, P.M. (1992). Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Amer.Zool.* **32**, 450-458.
- HOPKINS, P.M. (1993). Regeneration of walking legs in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Amer.Zool.* **33**, 348-356.
- JIANG, R.-J. & KOOLMAN, J. (1999). Feedback inhibition of ecdysteroids: evidence for a short feedback loop repressing steroidogenesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **41**, 54-59.
- JOHNSON, I. & UGLOW, R.F. (1985). Some effects of aerial exposure on the respiratory physiology and blood chemistry of *Carcinus maenas* (L.) and *Liocarcinus puber* (L.). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **94**, 151-165.

- JUSTO, C.C., AIDA, K. & HANYU, I. (1991). Effects of photoperiod and temperature on molting, reproduction and growth of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Nip.Sui.Gakka.* **57(2)**, 209-217.
- KOSHIO, S., HALEY, L.E. & CASTELL, J.D. (1989). The effect of two temperatures and salinities on growth and survival of bilaterally eyestalk ablated and intact juvenile American lobsters, *Homarus americanus*, fed brine shrimp. *Aquaculture* **76**, 373-382.
- KUBO, I. & KOMATSU, S. (1986). Micro analysis of prostaglandins and ecdysteroids in insects by high-performance liquid chromatography and fluorescence labelling. *Journal of Chromatography* **362**, 61-70.
- KUKENTHAL, W., MATTHES, E. & RENNER, M. (1984). Crustacea - *Carcinus maenas*. In *Guia de Trabalhos Práticos de Zoologia*, Anonymous, pp. 265-278.
- KUO, C.-M. & LIN, W.-W. (1996). Changes in morphological characteristics and ecdysteroids during the molting cycle of the tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. *Zoological Studies* **35(2)**, 118-127.
- LACHAISE, F., GOUDEAU, M., HETRU, C., KAPPLER, C. & HOFFMANN, J.A. (1981). Ecdysteroids and ovarian development in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* **362**, 521-529.
- LACHAISE, F. & LAFONT, R. (1984). Ecdysteroid metabolism in a crab: *Carcinus maenas* L. *Steroids* **42**, 243-259.
- LACHAISE, F., LE ROUX, A., HUBERT, M. & LAFONT, R. (1993). The molting gland of Crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *Journal of Crustacean Biology* **13(2)**, 198-234.
- LAFONT, R., PENNETIER, J.-L., ANDRIANJAFINTRIMO, M., CLARET, J., MODDE, J.-F. & BLAIS, C. (1982). Sample processing for high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. *Journal of Chromatography* **236**, 137-149.
- LAFONT, R. & KAOUADJI, N. (1994). Selectivity in the high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. *J.Chromatogr.A* **658**, 55-67.
- LAFONT, R. (2000). The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology* **9**, 41-57.
- LANOT, R. & CLÉDON, P. (1989). Ecdysteroids and meiotic reiniciation in *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda Natantia) and in *Locusta migratoria* (Insecta orthoptera). A comparative study. *Invertebrate Reproduction and Development* **16**, 169-175.
- LEE, D.O. & WICKINS, J.F. (1992). *Crustacean farming*. The University Press. Cambridge.
- LEE, K.J., WATSON, R.D. & ROER, R.D. (1998). Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a moult cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **249**, 624-627.
- LOVETT, D.L., CLIFFORD, P.D. & BORST, D.W. (1997). Physiological stress elevates hemolymph levels of methyl farnesoate in the green crab *Carcinus maenas*. *Biol.Bull.* **193**, 266-267.
- LOVETT, D.L., VERZI, M.P., CLIFFORD, P.D. & BORST, D.W. (2001). Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **128**, 299-306.
- LUÍS, O.J. (1988). Perspectivas para o controlo da reprodução do camarão de Quarteira, *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1755). *5º Congresso sobre o Algarve*, 463-468.



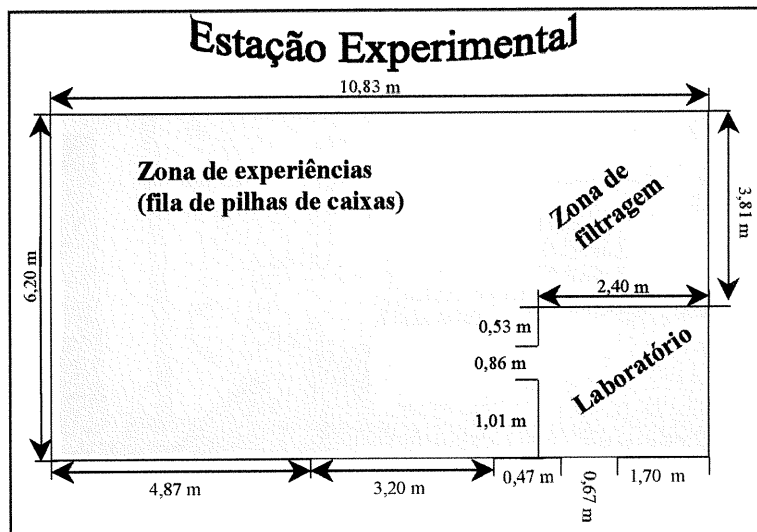
- MATHEWS, L.M., MCKNIGHT, A.E., AVERY, R. & LEE, K.T. (1999). Incidence of autotomy in New England populations of green crabs, *Carcinus maenas*, and examination of the effect of claw autotomy on diet. *J.Crust.Biol.* **19**, 713-719.
- MATTSON, M.P. (1986). New insights into neuroendocrine regulation of the crustacean molt cycle. *Zoological Science* **3**, 733-744.
- MATTSON, M.P. & SPAZIANI, E. (1986a). Regulation of the stress-responsive X-organ-Y-organ axis by 5-Hydroxytryptamine in the crab, *Cancer antennarius*. *General and Comparative Endocrinology* **62**, 419-427.
- MATTSON, M.P. & SPAZIANI, E. (1986b). Regulation of Y-organ ecdysteroidogenesis by molt-inhibiting hormone in crabs: involvement of cyclic AMP-mediated protein synthesis. *General and Comparative Endocrinology* **63**, 414-423.
- McCORMICK, M. (1999). A study of a marine invasive species: The European Shore Crab *Carcinus maenas*. <http://oak.conncoll.edu/~memcc/carcinus/crabindex.html>1999.
- McVEAN, A. (1976). The incidence of autotomy in *Carcinus maenas* (L.). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **24**, 177-187.
- MEUSY, J.-J. & PAYEN, G.P. (1988). Female Reproduction in Malacostracan Crustacea. *Zoological Science* **5**, 217-265.
- MOKSNES, P.-O., PIHL, L. & van MONTFRANS, J. (1998). Predation on postlarvae and juveniles of the shore crab *Carcinus maenas*: importance of shelter, size and cannibalism. *Marine Ecology Progress Series* **166**, 211-225.
- MOLYNEAUX, D.B. & SHIRLEY, T.C. (1988). Molting and growth of eyestalk-ablated juvenile red king crabs, *Paralithodes camtschatica* (Crustacea: Lithodidae). *Comp.Biochem.Physiol.* **91(A)**, 245-251.
- MORRIS, S. & TAYLOR, A.C. (1985). The respiratory response of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke) to hypoxia and hyperoxia. *Comp.Biochem.Physiol.* **81A(3)**, 633-639.
- NAKAJIMA, K. (1991). Dimethyl propiothetin, a potent growth and molt stimulant for striped prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57(9)**, 1717-1722.
- NAKAMURA, K. (1988). Photoperiod influences on molting cycle and maturation of the prawn *Penaeus japonicus*. *Mem.Fac.Fish., Kagoshima Univ.* **37**, 135-139.
- NAYA, Y., KISHIDA, K., SUGIYAMA, M., MURATA, M., MIKI, W., OHNISHI, M. & NAKANISHI, K. (1988). Endogenous inhibitor of ecdysone synthesis in crabs. *Experientia* **44**, 50-52.
- NAYA, Y., OHNISHI, M., IKEDA, M., MIKI, W. & NAKANISHI, K. (1989). What is molt-inhibiting hormone? The role of an ecdysteroidogenesis inhibitor in the crustacean molting cycle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 6826-6829.
- NOUVEL, H. (1945). Les relations entre la périodicité lunaire, les marées et la mue des Crustacés. *Bulletin de L'Institut Océanographique* **878**, 1-4.
- O'BRIEN, C.J. (1999). Limb autotomy as an investigatory tool: host molt-stage affects the success rate of infective larvae of a rhizocephalan barnacle. *Amer.Zool.* **39**, 580-588.
- OESTERLING, M.J. (1985). The Virginia soft crab fishery and assistance initiatives. *National Symposium on the Soft-Shell Blue Crab Fishery*, 89-90.

- OGLE, J.T. (1992). A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. *Invertebrate Reproduction and Development* **22**(1-3), 267-274.
- OKUMURA, T., NAKAMURA, K., AIDA, K. & HANYU, I. (1989). Hemolymph ecdysteroid levels during the molt cycle in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**(12), 2091-2098.
- PECHENIK, J.A. (1996). The Arthropods. In *Biology of the Invertebrates*, ed. KEMP, M.J., pp. 339-414. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- PÉREZ FARFANTE, I. & KENSLEY, B. (1997). Penaeid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and Diagnoses for the Families and Genera. *Memories du Museum National D'Histoire Naturelle*, Paris, França.
- PORCHERON, P., MORINIÈRE, M., GRASSI, J. & PRADELLES, P. (1989). Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem.* **19**:2, 117-122.
- QUEIROGA, H. (1987). A biologia de *Carcinus maenas* (L.) em condições estuarinas: estudo de uma população da Ria de Aveiro. Provas de Aptidão e Capacidade Científica. Pág. 1-93. Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro.
- REID, D.G. & ALDRICH, J.C. (1989). Variations in response to environmental hypoxia of different colour forms of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp.Biochem.Physiol.*, **92**(A)4, 535-539.
- RICE, A.L. & INGLE, R.W. (1975). The larval development of *Carcinus maenas* (L.) and *C. mediterraneus* Czerniavsky (Crustacea, Brachyura, Portunidae) reared in the laboratory. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology* **28**(3), 103-120.
- ROBARDS, K. & TOWERS, P. (1990). Chromatography as a reference technique for the determination of clinically important steroids. *Biomedical Chromatography* **4**(1), 1-19.
- ROTLANT, G., TAKAC, P., LIU, L., SCOTT, G.L. & LAUFER, H. (2000). Role of ecdysteroids and methyl farnesoate in morphogenesis and terminal moult in polymorphic males of the spider crab *Libinia emarginata*. *Aquaculture* **190**, 103-118.
- RUCZKAL-PIETRZAK, E. (1981). Influence of eyestalks and chelae ablation on loss of hemolymph protein and weight in crayfish *Orconectes limosus* (RAF). *Comp.Biochem.Physiol.* **70**(A), 447-450.
- SKINNER, D.M. & GRAHAM, D.E. (1972). Loss of limbs as a stimulus to ecdysis in brachyura (true crabs). *Biol.Bull.* **143**, 222-233.
- SMITH, L.D. (1990). Patterns of limb loss in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, and the effects of autotomy on growth. *Bulletin of Marine Science* **46**(1), 23-36.
- SOBRAL, M. (1985). Alguns aspectos relativos à pescaria do caranguejo na Ria de Aveiro. *Jornadas da Ria de Aveiro – Recursos da Ria de Aveiro (volume II)*. Câmara Municipal de Aveiro. Pág. 119-133. Aveiro, Portugal.
- SPAZIANI, E., WATSON, R.D., MATTSON, M.P. & CHEN, Z.-F. (1989). Ecdysteroid biosynthesis in the crustacean Y-organ and control by an eyestalk neuropeptide. *The Journal of Experimental Zoology* **252**, 271-282.
- SPAZIANI, E., MATTSON, M.P. & RUDOLPH, P.H. (1994). Regulation of crustacean molt-inhibiting hormone. *Perspectives in Comparative Endocrinology* 243-250.
- SUNDARAM, K.M.S., JIUSHENG, Z. & NOTT, R. (1993). Liquid chromatographic determination of RH-5992, an ecdysone agonist, in some forestry matrixes. *Journal Of AOAC International* **76**(3), 668-673.

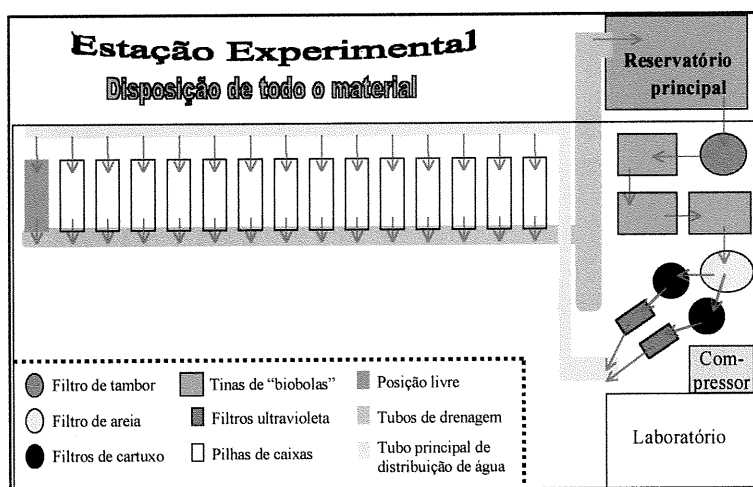
- TATEISHI, K., KIUCHI, M. & TAKEDA, S. (1993). New cuticle formation and molt inhibition by RH-5849 in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl.Ent.Zool.* **28(2)**, 177-184.
- TAYLOR, E.W. & BUTLER, P.J. (1978). Aquatic and aerial respiration in the shore crab *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15°C. *J.comp.Physiol* **127**, 315-323.
- TAYLOR, E.W. & WHITELEY, N.M. (1989). Oxygen transport and acid-base balance in the haemolymph of the lobster, *Homarus gammarus*, during aerial exposure and resubmersion. *J.Exp.Biol.* **144**, 417-436.
- TRUCHOT, J.P. (1980). The effect of water salinity and acid-base state on the blood acid-base balance in the euryhaline crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp.Biochem.Physiol.* **68A**, 555-561.
- TRUCHOT, J.P. (1988). Problems of acid-base balance in rapidly changing intertidal environments. *Amer.Zool.* **28**, 55-64.
- VAN HERP, F. & PAYEN, G.G. (1991). Crustacean neuroendocrinology: perspectives for the control of reproduction in aquacultural systems. *Bull.Inst.Zool., Academia Sinica, Monograph* **16**, 513-539.
- WDFW - WASHINGTON DEPARTMENT OF FISH AND WILDLIFE (1998). WDFW Fact Sheet - Green Crabs. <http://www.wa.gov/wdfw/fish/shelfish/greencrb.htm> 1-10.
- WEBSTER, S.G. (1986). Neurohormonal control of ecdysteroid biosynthesis by *Carcinus maenas* Y-organs *in Vitro*, and preliminary characterization of the putative molt-inhibiting hormone (MIH). *General and Comparative Endocrinology* **61**, 237-247.
- WILLIAMS, A.B. (1984). Shrimps, lobsters and crabs of the Atlantic Coast of the eastern United States, Maine to Florida. *Washington, DC, USA Smithsonian Inst. Press*, pp. 550.
- WILSON, I.D., MORGAN, E.D. & MURPHY, S.J. (1990). Sample preparation for the chromatographic determination of ecdysteroids using solid-phase extraction methods. *Analytica Chimica Acta* **236**, 145-155.
- ZAINAL, K.A.Y., TAYLOR, A.C. & ATKINSON, R.J.A. (1992). The effect of temperature and hypoxia on the respiratory physiology of the squat lobsters, *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Anomura, Galatheididae). *Comp.Biochem.Physiol.* **101A(3)**, 557-567.
- ZENG, C., ABELLO, P. & NAYLOR, E. (1999). Endogenous tidal and semilunar moulting rhythms in early juvenile shore crabs *Carcinus maenas*: implications for adaptation to high intertidal habitat. *Marine Ecology Progress Series* **191**, 257-266.

## **ANEXOS**





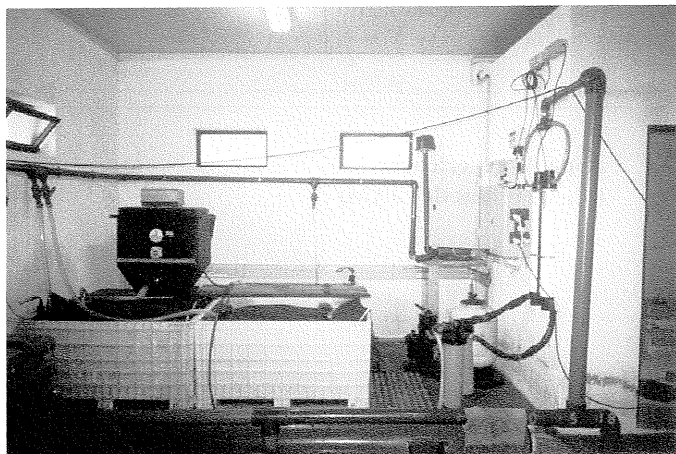
Anexo I: Esquema do edifício onde foi montada a estação experimental e respectivas dimensões.



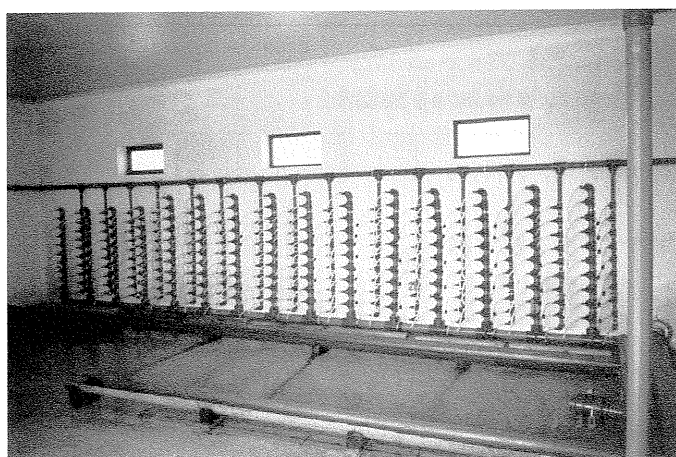
Anexo II: Esquema do sistema de água montado na estação experimental (setas vermelhas representam o percurso efectuado pela água).



Anexo III: Fotografia do exterior da estação experimental: (a) reservatório principal; (b) captação de água no reservatório de saída da piscicultura.



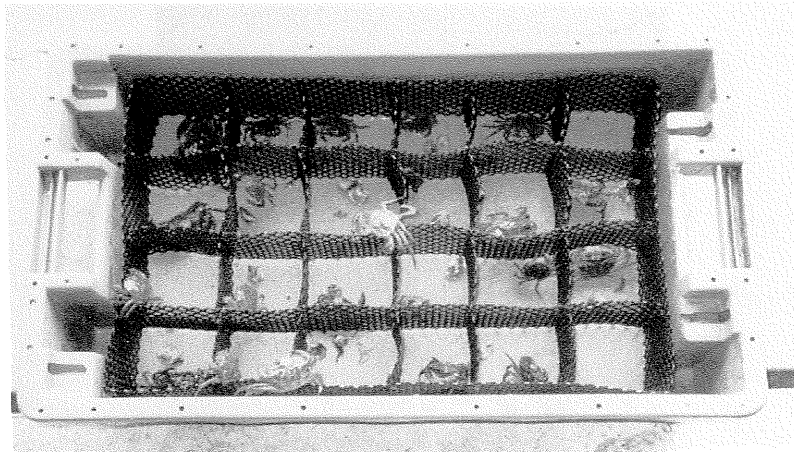
Anexo IV: Fotografia da zona de filtração da água da estação experimental.



Anexo V: Fotografia da zona de experiências onde é possível ver as canalizações para distribuição de água (a) e de ar (b).



Anexo VI: Fotografia da recolha do excesso de água das caixas na calha de drenagem.



Anexo VII: Fotografia da divisão do interior de uma caixa com rede de polipropileno.

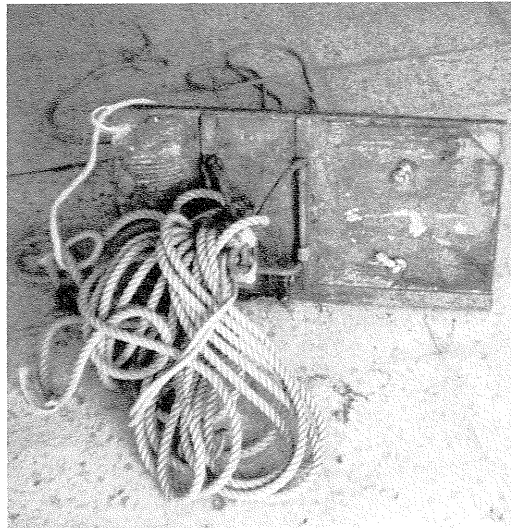


Anexo VIII: Colocar o isco numa nassa.



Anexo IX: Colocar a nassa na água.





Anexo X: Fotografia de uma porta utilizada com a rede de arrasto.

Anexo XI: Quadro resumo da regressão efectuada e dos resultados da mesma para determinação do LT50 nas duas réplicas de machos/nassas (MN1 E MN2), após a utilização da transformação de dados probit. Este quadro foi obtido através da utilização do programa "Probit".

	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.
MN1	7	0,845	16	4	25,00%	4,32581	4,21688
	8	0,903	16	6	37,50%	4,68180	4,79027
	9	0,954	16	9	56,25%	5,15699	5,29603
	10	1,000	16	13	81,25%	5,88702	5,74844
	11	1,041	16	16	100,00%	-----	6,15771
	Slope (b) = 9,887316		Intersept (a) = -4,138871				
Slope variance = 2,32953714							
Log ED50 = 0,92430251		ED50 = 8,40044917					
Confidence interval (95%): 7,57288007 < ED50 < 9,31283817							
Chi-square for heterogeneity = 0,06217, df = 2, P = 0,96939505							
DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.							
	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.
MN2	8	0,903	16	2	12,50%	3,84956	3,83087
	9	0,954	16	6	37,50%	4,68180	4,66622
	10	1,000	16	10	62,50%	5,31820	5,41347
	11	1,041	16	14	87,50%	6,15044	6,08944
	Slope (b) = 16,330651		Intersept (a) = -10,917180				
	Slope variance = 0,62951945						
Log ED50 = 0,97468130		ED50 = 9,43368337					
Confidence interval (95%): 9,17485641 < ED50 < 9,69981195							
Chi-square for heterogeneity = 0,01339, df = 2, P = 0,99332773							
DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.							

Anexo XII: Quadro resumo da regressão efectuada e dos resultados da mesma para determinação do LT50 nas duas réplicas de machos/arrasto (MA1 E MA2), após a utilização da transformação de dados probit. Este quadro foi obtido através da utilização do programa “Probit”.

	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
MA1	3	0,477	24	2	8,33%	3,61677	3,37033	
	4	0,602	24	4	16,67%	4,03264	3,95719	
	5	0,699	24	5	20,83%	4,18797	4,41240	
	6	0,778	24	7	29,17%	4,45186	4,78432	
	7	0,845	24	12	50,00%	5,00000	5,09879	
	8	0,903	24	15	62,50%	5,31820	5,37119	
	9	0,954	24	18	75,00%	5,67419	5,61146	
	10	1,000	24	21	87,50%	6,15044	5,82639	
	11	1,041	24	24	100,00%	-----	6,02082	
	Slope (b) = 4.697197		Intersept (a) = 1.129195					
	Slope variance = 0.25490908		Log ED50 = 0.82406695		ED50 = 6.66909576		Confidence interval (95%): 5.18152151 < ED50 < 8.66068896	
Chi-square for heterogeneity = 0.34883, df = 6, P = 0.99922370		DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.						
	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
MA2	3	0,477	24	1	4,17%	3,26795	2,39978	
	4	0,602	24	1	4,17%	3,26795	3,19087	
	5	0,699	24	1	4,17%	3,26795	3,80449	
	6	0,778	24	1	4,17%	3,26795	4,30585	
	7	0,845	24	6	25,00%	4,32581	4,72974	
	8	0,903	24	13	54,17%	5,10439	5,09694	
	9	0,954	24	16	66,67%	5,43029	5,42083	
	10	1,000	24	20	83,33%	5,96736	5,71056	
	11	1,041	24	23	95,83%	6,73205	5,97265	
	Slope (b) = 6.331820		Intersept (a) = -0.621264					
	Slope variance = 1.45512253		Log ED50 = 0.88778015		ED50 = 7.72289544		Confidence interval (95%): 4.64513687 < ED50 < 13.59568447	
Chi-square for heterogeneity = 2.93072, df = 7, P = 0.89133673		DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.						

Anexo XIII: Quadro resumo da regressão efectuada e dos resultados da mesma para determinação do LT50 nas duas réplicas de fêmeas/nassas (FN1 E FN2), após a utilização da transformação de dados probit. Este quadro foi obtido através da utilização do programa “Probit”.

	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
FN1	2	0,301	24	1	4,17%	3,26795	2,53700	
	3	0,477	24	2	8,33%	3,61677	3,44802	
	4	0,602	24	2	8,33%	3,61677	4,09440	
	5	0,699	24	3	12,50%	3,84956	4,59577	
	6	0,778	24	4	16,67%	4,03264	5,00542	
	7	0,845	24	13	54,17%	5,10439	5,35177	
	8	0,903	24	21	87,50%	6,15044	5,65180	
	9	0,954	24	22	91,67%	6,38323	5,91644	
	10	1,000	24	23	95,83%	6,73205	6,15317	
	11	1,041	24	24	100,00%	-----	6,36732	
	Slope (b) = 5.173574		Intersept (a) = 0.979597					
Slope variance = 1.03914015		Log ED50 = 0.77710361		ED50 = 5.98554377		Confidence interval (95%): 3.08951497 < ED50 < 12.05671352		
Chi-square for heterogeneity = 3.15686, df = 7, P = 0.87012186		DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.						
	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
FN2	3	0,477	24	1	4,17%	3,26795	2,80658	
	4	0,602	24	2	8,33%	3,61677	3,70204	
	5	0,699	24	4	16,67%	4,03264	4,39681	
	6	0,778	24	7	29,17%	4,45186	4,96411	
	7	0,845	24	15	62,50%	5,31820	5,44393	
	8	0,903	24	21	87,50%	6,15044	5,85956	
	9	0,954	24	22	91,67%	6,38323	6,22618	
	10	1,000	24	23	95,83%	6,73205	6,55413	
	11	1,041	24	24	100,00%	-----	6,85080	
	Slope (b) = 7.167147		Intersept (a) = -0.613015					
	Slope variance = 0.56395259		Log ED50 = 0.78315898		ED50 = 6.06958471		Confidence interval (95%): 4.73099157 < ED50 < 7.78821192	
Chi-square for heterogeneity = 0.77173, df = 6, P = 0.99261023		DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.						

Anexo XIV: Quadro resumo da regressão efectuada e dos resultados da mesma para determinação do LT50 nas duas réplicas de fêmeas/arrasto (FA1 E FA2), após a utilização da transformação de dados probit. Este quadro foi obtido através da utilização do programa “Probit”.

	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
FA1	3	0,477	24	1	4,17%	3,26795	2,86762	
	4	0,602	24	1	4,17%	3,26795	3,66539	
	5	0,699	24	4	16,67%	4,03264	4,28418	
	6	0,778	24	10	41,67%	5,31820	4,78977	
	7	0,845	24	16	66,67%	5,43029	5,21724	
	8	0,903	24	17	70,83%	5,54814	5,58753	
	9	0,954	24	19	79,17%	5,81203	5,91415	
	10	1,000	24	22	91,67%	6,38323	6,20632	
	11	1,041	24	24	100,00%	-----	6,47062	
	Slope (b) = 6,385217		Intersept (a) = -0,178899					
	Slope variance = 0,34357361							
Log ED50 = 0,81107633		ED50 = 6,47256368						
Confidence interval (95%):		5,21837762 < ED50 < 8,06380192						
Chi-square for heterogeneity = 0,47016, df = 6, P = 0,99818290								
DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.								
	Dia	Log Dia	N. Animais	Mortos	Mortalidade	Probit	Probit Exp.	
FA2	3	0,477	24	1	4,17%	3,26795	2,96633	
	4	0,602	24	2	8,33%	3,61677	3,83638	
	5	0,699	24	5	20,83%	4,18797	4,51124	
	6	0,778	24	12	50,00%	5,00000	5,06264	
	7	0,845	24	19	79,17%	5,81203	5,52884	
	8	0,903	24	20	83,33%	5,96736	5,93269	
	9	0,954	24	21	87,50%	6,15044	6,28890	
	10	1,000	24	23	95,83%	6,73205	6,60755	
	11	1,041	24	24	100,00%	-----	6,89580	
	Slope (b) = 6,963790		Intersept (a) = -0,356242					
	Slope variance = 0,26577650							
Log ED50 = 0,76915617		ED50 = 5,87700646						
Confidence interval (95%):		4,93399796 < ED50 < 6,99111123						
Chi-square for heterogeneity = 0,36370, df = 6, P = 0,99912497								
DEVIATIONS FROM MODEL NOT HETEROGENOUS. ED50 RELIABLE.								

Anexo XV: Tabela resultante da aplicação do teste de Tukey às taxas de mortalidade dos diferentes períodos de exposição ao ar (capítulo 3) tendo em conta o factor tratamento (média = arcsen ( $\sqrt{\text{taxa de mortalidade}}$ )) ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa). C – Controlo.

(média)	C (0,5125)	24 h (0,4587)	48 h (0,4675)	72 h (0,4326)	96 h (0,5437)	120 h (0,6846)	144 h (0,7904)	168 h (0,6848)
<b>C</b>		0,9930	0,9977	0,9375	0,9998	0,2319	0,0069	0,2306
<b>24h</b>	0,9930		1,0000	0,9999	0,9154	0,0455	0,0009	0,0451
<b>48h</b>	0,9977	1,0000		0,9996	0,9508	0,0611	0,0012	0,0607
<b>72h</b>	0,9375	0,9999	0,9996		0,7396	0,0181	0,0004	0,0180
<b>96h</b>	0,9998	0,9154	0,9508	0,7396		0,4686	0,0219	0,4668
<b>120h</b>	0,2319	0,0455	0,0611	0,0181	0,4686		0,7824	1,0000
<b>144h</b>	0,0069	0,0009	0,0012	0,0004	0,0219	0,7824		0,7840
<b>168h</b>	0,2306	0,0451	0,0607	0,0180	0,4668	1,0000	0,7840	

Anexo XVI: Tabela resultante da aplicação do teste de Tukey às taxas de mortalidade apresentadas pelos caranguejos com ablação de pedúnculos oculares e/ou patas locomotoras (capítulo 4) tendo em conta o factor tratamento (média = arcsen ( $\sqrt{\text{taxa de mortalidade}}$ )) ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa). C – controlo; APO – ablação de pedúnculos oculares; APL – ablação de patas locomotoras.

(média)	C (0,6199)	APO (1,1882)	APL (0,9101)
<b>C</b>		0,00019	0,00182
<b>APO</b>	0,00019		0,00249
<b>APL</b>	0,00182	0,00249	

Anexo XVII: Tabela resultante da aplicação do teste de Tukey às taxas de mortalidade apresentadas pelos caranguejos com ablação de pedúnculos oculares e/ou patas locomotoras (capítulo 4) tendo em conta a interacção entre os factores sexo e tratamento (média = arcsen ( $\sqrt{\text{taxa de mortalidade}}$ )) ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa). M – machos; F – fêmeas; C – controlo; APO – ablação de pedúnculos oculares; APL – ablação de patas locomotoras.

(média)	F - APO (1,2333)	F - APL (0,8660)	F - C (0,4445)	M - APO (1,1431)	M - APL (0,9542)	M - C (0,7953)
F - APO		0,0144	0,0002	0,9068	0,0750	0,0040
F - APL	0,0144		0,0053	0,0778	0,9143	0,9642
F - C	0,0002	0,0053		0,0002	0,0012	0,0196
M - APO	0,9068	0,0778	0,0002		0,3445	0,0208
M - APL	0,0750	0,9143	0,0012	0,3445		0,5147
M - C	0,0040	0,9642	0,0196	0,0208	0,5147	

Anexo XVIII: Tabela resultante da aplicação do teste de Tukey às taxas de mortalidade apresentadas pelos caranguejos após injeção de diversos compostos químicos (capítulo 5, Ensaio A) tendo em conta o factor tratamento (média = arcsen ( $\sqrt{\text{taxa de mortalidade}}$ )) ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa). C1 – controlo 1 (animais intactos); C2 – controlo 2 (injeção com solução Pantin); T<sub>1</sub> – injeção de 20-OHE; T<sub>2</sub> – injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> – injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> – injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> – injeção de DMPT; T<sub>6</sub> – injeção de DMT.

(média)	C1 (1,0591)	C2 (1,2078)	T1 (1,3313)	T2 (1,4193)	T3 (1,2405)	T4 (1,2301)	T5 (1,2709)	T6 (1,2764)
C1		0,00130	0,00013	0,00013	0,00509	0,00078	0,00022	0,00020
C2	0,00130		0,87417	0,00494	0,92999	0,99957	1,00000	1,00000
T1	0,00013	0,87417		0,03592	0,06157	0,33162	0,79073	0,84204
T2	0,00013	0,00494	0,03592		0,00013	0,00017	0,00058	0,00075
T3	0,00509	0,92999	0,06157	0,00013		0,98997	0,75478	0,69406
T4	0,00078	0,99957	0,33162	0,00017	0,98997		0,99461	0,98847
T5	0,00022	1,00000	0,79073	0,00058	0,75478	0,99461		1,00000
T6	0,00020	1,00000	0,84204	0,00075	0,69406	0,98847	1,00000	

Anexo IXX: Tabela resultante da aplicação do teste de Tukey às taxas de mortalidade apresentadas pelos caranguejos após injeção de diversos compostos químicos (capítulo 5, Ensaio B) tendo em conta o factor tratamento (média = arcsen ( $\sqrt{\text{taxa de mortalidade}}$ )) ( $p < 0,05$  – azul - diferença significativa). C1 – controlo 1 (animais intactos); C2 – controlo 2 (injeção com solução Pantin); T<sub>2</sub> – injeção de 20-OHE e ablação dos pedúnculos oculares; T<sub>3</sub> – injeção de 20-OHE e PCPA; T<sub>4</sub> – injeção de 20-OHE e CPH; T<sub>5</sub> – injeção de DMPT; T<sub>6</sub> – injeção de DMT; T<sub>7</sub> – injeção de fenoxicarbe.

(média)	C1 (0,3724)	C2 (0,4005)	T2 (0,9638)	T3 (0,6565)	T4 (0,6746)	T5 (0,5556)	T6 (0,6766)	T7 (0,5557)
C1		0,99995	0,00013	0,00263	0,00123	0,13278	0,00113	0,13234
C2	0,99995		0,00013	0,00869	0,00404	0,29758	0,00371	0,29679
T2	0,00013	0,00013		0,00016	0,00022	0,00013	0,00023	0,00013
T3	0,00263	0,00869	0,00016		0,99997	0,57958	0,99995	0,58084
T4	0,00123	0,00404	0,00022	0,99997		0,37196	1,00000	0,37307
T5	0,13278	0,29758	0,00013	0,57958	0,37196		0,35112	1,00000
T6	0,00113	0,00371	0,00023	0,99995	1,00000	0,35112		0,35220
T7	0,13234	0,29679	0,00013	0,58084	0,37307	1,00000	0,35220	