



# RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

ESCALA DE MATURAÇÃO MICROSCÓPICA E  
MACROSCÓPICA DAS GÓNADAS FEMININAS DE  
PESCADA (*Merluccius merluccius*)

Patrícia Gonçalves, Emília Cunha e Ana Costa



2004

21



Os **RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPIMAR** destinam-se a uma divulgação rápida de resultados preliminares de carácter científico e técnico, resultantes de actividades de investigação e de desenvolvimento e inovação tecnológica. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes do sector, podendo os trabalhos serem escritos em português, em francês ou em inglês.

A **SÉRIE COOPERAÇÃO** destina-se, primordialmente, à divulgação de trabalhos realizados com países terceiros no âmbito de programas de cooperação.

A **SÉRIE DIGITAL** destina-se a promover uma consulta mais diversificada e expedita dos trabalhos na área da investigação das pescas e do mar.

#### **Edição**

IPIMAR  
Avenida de Brasília  
1449-006 LISBOA  
Portugal

#### **Corpo Editorial**

Francisco Ruano - Coordenador  
Fátima Cardador  
Irineu Batista  
Manuela Falcão  
Teresa Monteiro

#### **Edição Digital**

Anabela Farinha/Irineu Batista

As instruções para os autores estão disponíveis no “site” do IPIMAR [www.wipimar.pt](http://www.wipimar.pt) ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação.

#### **Capa**

Lúís Catalan

#### **ISSN**

1645-863X

Todos os direitos reservados.

# ESCALA DE MATURAÇÃO MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA DAS GÓNADAS FEMININAS DE PESCADA (*Merluccius merluccius*)

Patrícia Gonçalves<sup>1</sup>; Emília Cunha<sup>2</sup>; Ana Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Recursos Marinhos

<sup>2</sup> Departamento de Ambiente Aquático

INIAP-IPIMAR - Av. Brasília 1449-006 Lisboa, Portugal

Recebido em 2004.09.07

Aceite em 2004-11-04

## RESUMO

Em Portugal, os estados de maturação da pescada (*Merluccius merluccius*) têm sido até agora descritos com base em critérios macroscópicos, não existindo uma validação microscópica destes. Neste trabalho descreve-se microscopicamente o ciclo reprodutivo da pescada, é efectuada a análise microscópica dos estados de maturação da escala macroscópica do IPIMAR e apresentada uma escala de maturação macroscópica com base em características microscópicas e macroscópicas das diversas fases de maturação. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as chaves de identificação baseadas em critérios microscópicos e elaboradas através de estudos detalhados do desenvolvimento das gónadas, permitem uma identificação mais correcta dos diversos estados de maturação. Propõe-se uma alteração da escala de maturação actualmente com 10 estados para uma com 5 estados.

**Palavras chave:** *Merluccius merluccius*; pescada; escala maturação feminina macroscópica; validação microscópica.

## ABSTRACT

**Title:** A microscopic and macroscopic maturity stage key for hake (*Merluccius merluccius*) females. At IPIMAR the study of the reproductive biology of hake (*Merluccius merluccius*) has been carried out according to a macroscopic classification of gonad maturity stages, based on macroscopic characteristics. In this work we describe a new macroscopic maturity scale based on microscopic and macroscopic characteristics of the development of the ovaries during the reproductive cycle. The results show that maturity stage key based on microscopic criteria are due according to detailed development gonads studies, which permits a more precise identification of each maturity stage, and a change of scale from 10 to 5 stages is proposed.

**Key words:** *Merluccius merluccius*; hake; maturity stage key; females macroscopic key; microscopic validation.

---

## REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

GONÇALVES, P., CUNHA, E., COSTA, A. 2004. Escala de maturação microscópica e macroscópica das gónadas femininas de pescada (*Merluccius merluccius*). *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital* (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>) nº 21, 27 p. + anexos.

## INTRODUÇÃO

A avaliação do estado dos recursos vivos marinhos é feita com base na modelação conjunta da dinâmica dos recursos e das frotas de pesca tendo em conta a informação biológica (crescimento, reprodução, hábitos alimentares, etc.) e da pesca (esforço de pesca, capturas, desembarques, rejeições, etc.) (Cardigos e Pinho, 2003; Shepherd, 1992; Sparre *et al.*, 1989; Rothschild *et al.*, 1987). As características biológicas devem, no entanto, constituir a base fundamental para a sua conservação e gestão (Cadima, 2000).

O conhecimento da reprodução da espécie a ser avaliada é essencial, nomeadamente no que respeita ao número de novos elementos que serão repostos pela população durante a época de postura. Para se conhecer a época de postura e o número de indivíduos maduros e imaturos, os modelos de gestão utilizam informação referente a estados de maturação dos indivíduos (Sparre *et al.*, 1989; Rothschild *et al.*, 1987). A atribuição de estados de maturação é feita com base no desenvolvimento sexual das gónadas da espécie em estudo. Em cada uma das fases do ciclo reprodutor, as gónadas apresentam um desenvolvimento específico que resulta do estado de maturação dos oócitos no caso das gónadas femininas e dos espermatozóides nas gónadas masculinas.

Os estados de maturação são, de um modo geral, atribuídos por observação da morfologia externa da gónada. O uso de chaves macroscópicas permite analisar um elevado número de indivíduos com um esforço relativamente reduzido. No entanto a construção destas chaves deve ser baseada em critérios microscópicos que permitam uma identificação objectiva dos diversos estados de maturação. Este factor, aliado ao facto das técnicas de microscopia serem cada vez mais fáceis e rápidas de aplicar, resulta no uso crescente de chaves baseadas em critérios microscópicos tal como acontece na sardinha e no carapau (Costa, 2001; Costa e Borges, 1996; Pérez e Figueiredo, 1992). No caso particular da pescada (*Merluccius merluccius*) em Portugal, os estados de maturação estão ainda descritos apenas com base em critérios macroscópicos.

Neste trabalho descreve-se microscopicamente a morfologia das gónadas ao longo do ciclo reproductivo da pescada, faz-se a análise microscópica dos 10 estados de maturação da escala macroscópica do IPIMAR (Anexo I) (Cardador *et al.*, 1989) e apresenta-se uma escala de maturação macroscópica com base em características microscópicas e macroscópicas das diversas fases de maturação.



## MATERIAL E MÉTODOS

A descrição microscópica dos estados de maturação em gónadas femininas de pescada foi feita com base em 81 exemplares capturados em arrastos de fundo durante dois cruzeiros de investigação efectuados pelo N.I. “Noruega”. As datas de captura, Outubro de 2000 e de 2002, corresponderam ao início do período de desova, cujo pico, de acordo com diversos autores (Martin, 1991; Murua *et al.*, 1998; Sarano, 1983), se situa entre Janeiro e Março. A amostragem biológica das fêmeas de pescada capturadas consistiu na determinação do comprimento total (aproximação ao 0.5 cm) e do estado de maturação (escala macroscópica de 10 estados) tendo-se recolhido e pesado as gónadas em fresco. Como não foi determinado o peso total dos indivíduos amostrados, o índice gonádico (I.G.C.) foi calculado em função do comprimento total do indivíduo, do seguinte modo (Balbontín e Bravo, 1993):

$$\text{I. G.C.} = \frac{\text{Peso da gónada (g)}}{(\text{Comprimento total (cm)})^3} \times 10^4$$

As gónadas foram fixadas com formol salino a 10%, tendo sido transferidas para álcool a 70% ao final de dois dias. Em laboratório, procedeu-se à sua preparação para análise microscópica.

A técnica histológica aplicada no processamento das gónadas (Anexo II), foi baseada em descrições referidas por outros autores em estudos realizados para esta espécie demersal (Osborne *et al.*, 1999; Murua *et al.*, 1998; Balbontín e Bravo, 1993; Louge e Christiansen, 1993; Alheit e Wegener, 1986; Ehrhardt, 1986; Hunter e Macewicz, 1985; Tsimenidis e Papaconstantinou, 1985; Sarano, 1983; Balbontín e Fisher, 1981; Foucher e Beamish, 1980).

De cada gónada foi cortada uma secção transversal, o mais próximo possível do hilo, e colocada numa cassete histológica. Estas foram posteriormente, mergulhadas em diferentes soluções, com vista à desidratação e inclusão dos tecidos em parafina. O protocolo utilizado encontra-se descrito no Anexo III. Posteriormente, montaram-se os blocos em parafina, com um ponto de fusão de 56 °C. Nesta fase foi feita a orientação da gónada para a realização dos cortes perpendiculares ao seu eixo maior. Os blocos foram colocados numa placa refrigeradora (-5 °C) o que permitiu uma maior rapidez na solidificação da parafina e em seguida guardados num ambiente refrigerado, por forma a facilitar os cortes.

Os blocos de parafina foram desbastados e os cortes definitivos foram realizados com uma espessura de 5µm. Antes de serem colocados em lâminas, foram mergulhados num “banho

maria” (a 50°C) o que permitiu esticar o corte. Posteriormente, as lâminas foram guardadas durante 8 horas em estufa a 50°C com o objectivo de remover toda a parafina residual.

Os cortes histológicos foram desparafinados (em xilol) corados com Hematoxilina-Eosina de Harris (Anexo IV) e montados com Entellan.

As preparações definitivas foram observadas ao microscópio óptico para determinação e descrição do estado de maturação da gónada. Foi observada a totalidade do corte, uma vez que a distribuição dos oócitos nos diferentes estados de desenvolvimento não é homogénea ao longo de toda a secção da gónada.

As fêmeas foram inicialmente classificadas microscópicamente nos diversos estados de maturação com base em dois critérios: classe de oócitos em fase de vitelogénica mais avançada e classe de oócitos predominante. Foi em seguida realizada a correspondência entre cada um dos estados de desenvolvimento determinados microscópicamente e macroscópicamente durante a amostragem biológica.

## **RESULTADOS**

Foram obtidas gónadas representativas de quase todos os estados de maturação embora os estados VI e VIII/II estivessem presentes em pequeno número (Tabela I). As fêmeas maduras apresentaram comprimentos superiores a 37,5 cm e as suas gónadas aumentaram em peso ao longo do processo de maturação o que se reflectiu nos valores do I.G.C.. O peso das gónadas das fêmeas em pós-postura (VI/IV) e em recuperação (VIII/II e VIII/III) diminuiu, tal como era esperado.

### *1 - Descrição microscópica das fases de desenvolvimento das gónadas femininas*

A classificação em classes de desenvolvimento e maturação dos oócitos adoptada para este trabalho, foi baseada no trabalho desenvolvido por Hunter e Macewicz (1985) e descreve-se de seguida:

*Oócitos não-vitelados (também denominados oócitos primários) (Fig.1 – a)*

Nesta classe apresentam forma esférica, núcleo grande e o citoplasma cora facilmente com Hematoxilina. O folículo consiste numa camada interna constituída por células cúbicas (a granulosa) e uma camada externa de células largas e alongadas com alguns capilares sanguíneos (a teca).

*Oócitos parcialmente vitelados (ou em início de vitelógenese) (Fig.1 – b)*

Esta classe inclui oócitos na fase inicial de deposição do vitelo até oócitos com grânulos de vitelo que ocupam  $\frac{3}{4}$  da distância entre a periferia da membrana e a região perinuclear. A deposição do vitelo começa na periferia do citoplasma sob a forma de pequenos grânulos e subsequentemente espalha-se internamente até chegar perto da zona perinuclear. À medida que prossegue a maturação, o folículo torna-se maior devido ao aumento da sua espessura e à proliferação das células da granulosa. As células da teca não aumentam em comprimento mas apresentam um aspecto alongado.

*Oócitos vitelados (Fig.1 – c)*

Nesta classe os oócitos apresentam grânulos de vitelo na região entre a periferia do oócito e a zona perinuclear. Enquanto, a vitelogénese prossegue, o vitelo varia entre grânulos nos oócitos mais pequenos e grandes glóbulos nos maiores. Antes da postura (< 24 horas), os glóbulos fundem-se para formar placas de vitelo. Mas os oócitos nesta fase encontram-se excluídos desta classe, uma vez que esta é uma característica da última classe de oócitos (hidratados). No folículo, as células da granulosa têm uma longa forma rectangular. A zona radiata é uma banda estriada até à hidratação, altura em que é esticada e as estrias desaparecem.

### *Oócitos hidratados (Fig.1 – d)*

A hidratação começa quando o núcleo completou a sua migração para o pólo animal e os glóbulos de vitelo se começam a fundir. O núcleo destes oócitos não é visível, uma vez que após a migração deste para o pólo animal, a membrana nuclear desintegra-se e liberta o seu conteúdo no citoplasma. Durante a hidratação, todos os glóbulos de vitelo se fundem em placas e o oócito expande-se, esticando a granulosa e a teca. Os oócitos hidratados são os mais efémeros de todos pois esta classe dura menos de um dia, sendo libertados de seguida. Oócitos apresentando o núcleo migrado podem ser observados nas gónadas nas 24 horas que antecedem a postura, mas os oócitos hidratados nos quais os glóbulos se encontram fundidos formando placas de vitelo aparecem apenas 12 horas antes da postura.

### *Oócitos atréticos*

A atresia é um processo degenerativo que ocorre nos ovários, correspondendo à absorção dos oócitos. Esta ocorre com uma baixa incidência durante a época de postura, mas torna-se mais marcada à medida que a época de postura termina e os oócitos maduros que ainda restam são absorvidos. No entanto, factores como: stress, luz, temperatura, alimento, níveis hormonais inadequados podem igualmente induzir o aparecimento de oócitos atréticos nas gónadas (Rizzo e Bazzoli, 1995).

### *Folículos pós-ovulatórios (Fig.1 – e)*

Os folículos são estruturas que se formam durante a vitelogénese e envolvem os oócitos hidratados. São constituídos por uma camada epitelial interna de células (a granulosa) e uma camada externa de tecido conjuntivo (a teca) com alguns capilares sanguíneos. Na ovulação, cada oócito hidratado é libertado do folículo que o envolve para o lúmen da gónada. Este não se fragmenta, pois não é libertado junto com o oócito, mantendo assim a sua integridade. O folículo colapsa longe da abertura formada pela libertação do oócito hidratado e permanece na gónada como folículo pós-ovulatório. A postura ocorre simultaneamente com a ovulação ou num espaço de 60 minutos após esta. Inicialmente, o folículo é uma estrutura distinta mas rapidamente se deteriora e é reabsorvido.

A identificação das diferentes fases de ciclo reproductivo e a correspondência com as fases de maturação dos oócitos para a pescada foram baseadas na observação microscópica (Fig. 1).

#### *Fase Imatura*

A fase Imatura (Fig. 2) é caracterizada pela presença única de oócitos não-vitelados de reduzidas dimensões, com diâmetros compreendidos entre 23 e 87  $\mu\text{m}$  (Tabela II) e que apresentam núcleo individualizado. Na gónada são ainda visíveis os septos ováricos e vasos sanguíneos.

#### *Fase de Desenvolvimento*

Na fase de Desenvolvimento (Fig. 3) verifica-se o início de vitelógenese evidenciada pela presença de oócitos parcialmente vitelados com um diâmetro entre 105 e 319  $\mu\text{m}$  (Tabela II). Observam-se ainda oócitos primários que, no entanto, apresentam um diâmetro médio duas vezes superior aos observados na fase anterior (86  $\mu\text{m}$ ). Os vasos sanguíneos e os septos ováricos são ainda visíveis. Nesta fase observam-se alvéolos corticais junto à membrana folicular dos oócitos vitelados. Em algumas gónadas verifica-se ainda a presença de oócitos atréticos (141-341  $\mu\text{m}$ ).

#### *Fase de Pré-postura*

A fase de Pré-postura é caracterizada pela predominância de oócitos com núcleo deslocado para o polo animal (Fig. 4), oócitos com o núcleo migrado (542-684  $\mu\text{m}$ ). Observam-se ainda nesta fase oócitos não-vitelados de dimensões semelhantes aos da fase anterior (41-114  $\mu\text{m}$ ), parcialmente vitelados e vitelados de dimensões muito superiores aos da fase anterior (126-580  $\mu\text{m}$ ), hidratados (317-828  $\mu\text{m}$ ) e atréticos (191-331  $\mu\text{m}$ ) apesar da presença destes últimos ser muito reduzida (Tabela II).

### *Fase de Postura*

Observam-se na fase de Postura, oócitos em todos os estados de desenvolvimento, mas com predominância dos hidratados (Fig. 5). Devido à falta de estruturas de suporte e ao seu elevado número, estes oócitos apresentam um aspecto irregular na preparação histológica como resultado do processo de desidratação (durante o processamento dos tecidos). Como tal, torna-se particularmente difícil determinar as suas dimensões.

### *Fase de Pós-postura*

O aspecto microscópico da fase de Pós-postura é muito semelhante ao da de Pré-postura, distinguindo-se desta por um menor número de oócitos observado, pela presença de espaços entre os oócitos e de folículos pós-ovulatórios, denominados como POF's<sup>1</sup> (86-375 µm) (Fig. 6). Em algumas das gónadas observa-se, ainda que em pequeno número, oócitos hidratados (469-806 µm) e com núcleos migrados (310-644 µm).

### *2- Análise microscópica dos estados de maturação da escala macroscópica (10 estados)*

Do ponto de vista microscópico as gónadas identificadas como pertencentes aos estados I e II da escala macroscópica de 10 estados (Anexo I) apresentavam unicamente oócitos primários (Fig. 7). A diferença entre estes dois estados é referente ao diâmetro médio dos oócitos, que era superior nas gónadas em estado 2 (Tabela III) o que se reflecte no maior peso destas (Tabela I).

Os estados III, VIII/II e VIII/III, apresentavam oócitos em início de vitelogénese (parcialmente vitelados) tal como mostra o seu perfil microscópico (Fig. 8). As dimensões de cada tipo de oócitos em estado de maturação III, referidos na Tabela III foram determinadas com base na agregação destes três estados. As principais diferenças entre estes estados referem-se à presença de oócitos atréticos, à definição dos septos ovários e às dimensões e localização dos oócitos no interior do ovário. O estado III apresentava apenas dois tipos de oócitos: não-vitelados e vitelados (início de vitelogénese), os septos ovários eram distintos e o diâmetro dos oócitos era relativamente homogêneo (Fig. 9). No caso das gónadas identificadas como VIII/II e VIII/III (Fig. 10) para além de apresentarem oócitos primários e

---

<sup>1</sup> - do inglês Postovulatory Follicles



vitelados também, possuíam oócitos atréticos. Os septos ováricos apresentavam-se fundidos, não estando tão bem definidos como no estado III. A maioria das preparações histológicas referentes ao estado VIII/III apresentava ausência de oócitos na zona central do ovário e o diâmetro dos oócitos vitelados era muito mais heterogéneo.

A observação microscópica dos estados IV e V (da observação macroscópica) mostrou que estes dois estados apresentavam oócitos vitelados, em fase de maturação avançada, na sua maioria oócitos com núcleos migrados e alguns oócitos hidratados (Fig. 11). Nestes dois estados o diâmetro médio dos diferentes tipos de oócitos era similar (Tabela III). Os oócitos vitelados apresentavam valores do diâmetro máximo semelhantes ao do mínimo dos oócitos com núcleos migrados. Embora haja, presença de oócitos atréticos, ela é diminuta.

As gónadas no estado VI, apresentavam um grande número de oócitos hidratados (Fig. 12) o que corresponde à fase final de maturação dos oócitos. Do ponto de vista microscópico este estado é igual ao descrito anteriormente como fase de Postura e as dimensões dos seus oócitos não foram determinadas pelas razões mencionadas atrás.

Gónadas em estados VI/IV, mostravam presença de folículos pós-ovulatórios (POF's) e de espaços entre os oócitos (Fig. 13). Neste estado, observaram-se ainda alguns oócitos hidratados. O número de oócitos atréticos observado é muito elevado (Tabela III).

### *3- Relação entre as características microscópicas e macroscópicas nas diversas fases de maturação*

As características microscópicas das gónadas nas diferentes fases de maturação reflectem-se no aspecto exterior das mesmas, permitindo uma rápida definição macroscópica (Tabela IV). No caso das gónadas imaturas, que possuem uma massa contínua de oócitos primários, os ovários apresentam-se sem oócitos individualizados, opacos e com dimensões reduzidas. Na fase de desenvolvimento a maioria dos oócitos presentes são de dimensões superiores à anterior, o que do ponto de vista macroscópico já os torna visíveis. Quando em fase de pré-postura, os oócitos estão em grande parte vitelados e com os núcleos migrados, o que faz com que se observem macroscopicamente oócitos opacos individualizados na gónada. No caso da fase de postura, a presença de oócitos na sua maioria hidratados resulta numa gónada com oócitos hialinos, com a membrana envolvente fina e de grandes dimensões. Em fase de pós-

postura as gónadas tornam-se flácidas e rosadas escuras, devido ao espaço que existe entre os oócitos e estes na sua maioria serem atréticos.

## **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

A presença exclusiva de oócitos primários, não-vitelados, nas gónadas identificadas como pertencentes aos estados I e II da escala macroscópica de 10 estados indica que estes são referentes a indivíduos imaturos o que de acordo com as observações efectuadas neste trabalho para a pescada, e à de vários autores para outras espécies, é característico de gónadas imaturas (Matsumoto e Miyabe, 2002; Costa, 2001; Mackie e Lewis, 2001; Nichol e Acuna, 2001; Susca *et al.*, 2001; Bazzoli *et al.*, 1996; Fowler *et al.*, 1999; Macchi e Pájaro, 1999; Hunter *et al.*, 1992; Hunter e Macewicz, 1985). Tal facto sugere que os estados I e II da escala macroscópica de 10 estados deverão ser agregados num único estado denominado - Imaturos. Do ponto de vista macroscópico as gónadas neste estado são de pequenas dimensões e sem oócitos visíveis (Tabela V).

Relativamente aos estados III, VIII/II e VIII/III, a observação microscópica revela que apresentam características de desenvolvimento semelhantes, sendo as diferenças (atrésia e espaços entre os oócitos) observadas em VIII/II e VIII/III indicadoras de uma recuperação para uma próxima postura. O facto desta espécie efectuar desovas contínuas ao longo de todo o ano (Monteiro e Lima Dias, 1966) poderá ser o factor que contribui para a presença de atrésia neste estado. A dificuldade em distinguir macroscopicamente os diferentes estados de desenvolvimento (1ª maturação e recuperação) e o facto de, microscopicamente, estes apresentarem características de um mesmo processo fundamenta a sua agregação num único estado - Desenvolvimento. Nestas gónadas já são visíveis, macroscopicamente, pequenos oócitos.

O facto dos estados macroscópicos IV e V apresentarem na sua maioria oócitos vitelados em fase de desenvolvimento avançada (oócitos com núcleos migrados) e alguns em hidratação, indica que se encontram em fase de pré-postura devendo como tal, ser agregados num mesmo estado de Pré-postura. Macroscopicamente, caracterizam-se pela presença simultânea de oócitos opacos e hialinos.

As gónadas em estado VI apresentam um grande número de oócitos hidratados o que corresponde a um estado de Postura. Este estado de maturação não aparece frequentemente

nas amostras o que poderá ser devido, a exemplo de outras espécies, ao facto da fase de hidratação e a consequente libertação dos oócitos ser um acontecimento rápido (Matsumoto e Miyabe, 2002; Costa, 2001; Mackie e Lewis, 2001; Fowler *et al.*, 1999; Macchi e Pájaro, 1999; Murua *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1992; Hunter e Macewicz, 1985). As gónadas neste estado apresentam-se volumosas com a membrana envolvente fina e a maioria dos oócitos hialinos.

Gónadas em estados VI/IV, mostram presença de folículos pós-ovulatórios (POF's) e de espaços entre os oócitos, o que é característico da ocorrência de uma postura recente (Hunter e Macewicz, 1985; Moser, 1967) e como tal de uma fêmea em fase de Pós-postura. As suas gónadas têm um aspecto flácido e uma cor rosada escura.

Com base nos critérios descritos e apresentados, justifica-se a alteração da escala de maturação macroscópica de 10 estados utilizada no IPIMAR na identificação da pescada para uma escala de 5 estados, cujas principais características, quer microscópicas quer macroscópicas, se encontram descritas na Tabela V.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projecto QCA-3/MARE FEDER - NeoMAv. Os autores querem agradecer a S. Dores e R. Lago pelo trabalho de amostragem biológica a bordo do NI "Noruega". P. Gonçalves agradece ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas - IPIMAR pelo suporte financeiro na forma de uma bolsa no âmbito do projecto PNAB-Plano Nacional de Recolha de Dados.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALHEIT, J.; WEGENER, A. 1986. A new method for determining batch fecundity of hake (genus: *Merluccius*). ICES, C. M.1986/ C: 62.

BALBONTÍN, F.; BRAVO, R. 1993. Fecundidad, talla de la primera madurez sexual y datos biometricos en la merluza del Sur *Merluccius australis*. Rev. Biol. Mar. Inst. Oceanol. Univ. Valparaíso, 28(1): 111-132.

BALBONTÍN, F.; FISHER, W. 1981. Ciclo sexual y fecundidad de la merluza, *Merluccius gayi gayi*, en la Costa de Chile. Rev. Biol. Mar. Inst. Oceanol. Univ. Valparaíso, 17(3): 285-334.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. 1996. Dinâmica da ovogênese em peixes forrageiros da represa de Três Marias, Minas Gerais: estudo histológico e histoquímico. *BIOS*, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-Minas, 4 (4): 5-10.

CADIMA, E. 2000. Manual de avaliação dos recursos pesqueiros. FAO Documento Técnico sobre as Pescas (393), 162 p.

CARDADOR, F.; CERVANTES, A.; DINIS, H., FARIÑA, C.; GOÑI, R.; OLASO, I.; PEREIRO, J.; PÉREZ, N.; PIÑEIRO, C.; RAMOS, A. 1989. Relatório da reunião Luso-Espanhola da biologia da pescada. INIP – IEO Vigo 17-19 Maio 1989, 18 p.

CARDIGOS, F.; PINHO, M. 2003 in:  
<http://www.horta.uac.pt/Projectos/MSubmerso/200303/Papel.htm>

COSTA, A. M. 2001. Contribuição para o estudo da fecundidade temporal e espacial do carapau (*Trachurus trachurus* L.) na costa Portuguesa. Tese para acesso à categoria de Investigador Auxiliar – IPIMAR, 180 pp.

COSTA, A. M.; BORGES, M. F. 1996. Total fecundity and atresia of horse mackerel (*Trachurus trachurus* L.). ICES, C. M.1996/ H: 26.

EHRHARDT, N. M. 1986. Comparative biology of the world hakes genus *Merluccius*. University of Washington – PhD Thesis, 565pp.

FOUCHER, R. P.; BEAMISH, R. J. 1980. Production of nonviable oocytes by Pacific Hake (*Merluccius productus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 41-48.

FOWLER, A. J.; MACLEAY, L.; SHORT, D. A. 1999. Reproductive mode and spawning information based on gonad analysis for the King George whiting (Percoidei: Sillaginidae) from South Australia. *Mar. Freshwater Res.* 50: 1-14.

- HUNTER, J. R.; MACEWICZ, B. J. 1985. Measurement of spawning frequency of multiple spawning fishes. In: *An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax**. NOAA Technical Report NMFS 36: 79-94.
- HUNTER, J. R.; MACEWICZ, B. J.; CHYAN-HUEI LO, N.; KIMBRELL, C. A. 1992. Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fishery Bulletin*, U. S. 90: 101-128.
- LUCIO, P.; SANTURTÚN, M; MURUA, H. 1998. Growth and reproduction of Hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay during 1996-1997. I.C.E.S., C.M.1998/CC:20
- LUCIO, P.; MURUA, H; SANTURTÚN, M. 2000. Growth and reproduction of Hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay during the period 1996-1997. *Ozeanografika* 3: 325-354.
- LOUGE, E. B. E CHRISTIANSEN, H. E. 1993. Fecundidad de la merluza *Merluccius hubbsi* durante la temporada estival de 1988. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 9(2): 343-346.
- MACCHI, G. J. E PÁJARO, M. 1999. Features of the reproductive biology of the southern blue whiting (*Micromesistius australis*). INIDEP Doc. Cient. 5: 67-79.
- MACKIE, M.; LEWIS, P. 2001. Assessment of gonad staging systems and other methods used in the study of the reproductive biology of narrow-barred Spanish mackerel *Scomberomorus commerson* in Western Australia. *Fish. Res. Rep. West. Aust.* 136: 1-32.
- MARTIN, I. 1991. A preliminary analysis of some biological aspects of hake (*M. merluccius* L. 1758) in the Bay of Biscay. ICES C. M. 1991/ G: 54. Demersal Fish Committee.
- MATSUMOTO, T.; MIYABE, N. 2002. Preliminary report on the maturity and spawning of bigeye tuna *Thunnus obesus* in the Central Atlantic Ocean. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 54(1): 246-260.
- MONTEIRO, R.; LIMA DIAS, M. 1966. On some aspects of the fecundity of the hake (*Merluccius merluccius* L.) of the Portuguese coast. ICES G: 5, 8 p.
- MOSER, H.G. 1967. Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastes paucispinis* Ayres, an ovoviviparous teleost (Family: Scorpaenidae). *J. Morphol.*, 123: 329-354

- MURUA, H.; MOTOS, L.; LUCIO, P. 1998. Reproductive modality and batch fecundity of the european hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Bay of Biscay. -CalCOFI Rep., 39: 196-203.
- NICHOL, D. G.; ACUNA, E. I. 2001. Annual and batch fecundities of yellowfish sole, *Limanda aspera*, in the eastern Bering Sea. *Fish. Bull* 99: 108-122.
- OSBORNE, R. F.; MELO, Y. C.; HOFMEYR, M. D.; JAPP, D. W. 1999. Serial spawning and batch fecundity of *Merluccius capensis* and *M. paradoxus*. *South African Journal of Marine Science* 21: 211-216.
- PÉREZ, N.; FIGUEIREDO, I. 1992. First approach to the study of atresia in the ovary of sardine, *Sardine pilchardus* (Walb.). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8(1): 191-199.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. 1995. Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *Rev. Brasil. Biol.*, 55 (4); 697-703.
- ROTHSCHILD, B. J.; OSBORN, T. R.; DICKEY, T. D.; FARMER, D. M. 1987. The physical basis for recruitment variability in fish populations. I.C.E.S. – Recruitment Processes in Marine Ecosystems, C.M. 1987/ Mini N° 8, 19 p.
- SARANO, F. 1983. La reproduction du merlu *Merluccius merluccius* (L.) – cycle ovarien et fécondité; cycle sexuel de la population du golfe de Gascogne. Tese de Docteur de 3e cycle – Université de Poitiers – Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes – La Rochelle, 147 p.
- SHEPHERD, J. G. 1992. Aide memoire on scientific advice on fisheries management. Directorate of Fisheries Research, Lowestoft, Laboratory Leaflet Number 70, 18 p.
- SPARRE, P.; URSIN, E.; VENEMA, S. C. 1989. Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1 – Manual. FAO, *Fisheries Technical Paper*, 306/1, 337 p.
- SUSCA, V.; CORRIERO, A.; DEFLORIO, M.; BRIDGES, C.R.; DE METRIO, G. 2001. New results on the reproductive biology of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 52: 745-751.
- TSIMENIDIS, N.; PAPACONSTANTINO, C. 1985. A preliminary study of the fecundity of the hake (*Merluccius merluccius* L., 1758) in the Greek seas. *Inv. Pesq.* 49(1): 55-59.



## TABELAS

Tabela 1 – Informação, por estado de maturação macroscópico (escala de 10 estados do comprimento, peso das gónadas e índice gonádico por comprimento (I.G.C.) médios dos exemplares amostrados.

| Estado de Maturação | n  | Comprimento |      | Peso da gónada |      | I.G.C. |        |
|---------------------|----|-------------|------|----------------|------|--------|--------|
|                     |    | Média (cm)  | D.P. | Média (g)      | D.P. | Média  | D.P.   |
| 1                   | 10 | 24.6        | 4.1  | 0.1            | 0.0  | 0.0701 | 0.0310 |
| 2                   | 10 | 34.2        | 4.6  | 1.2            | 0.7  | 0.2708 | 0.0951 |
| 3                   | 7  | 46.9        | 5.9  | 6.6            | 2.2  | 0.6812 | 0.3316 |
| 4                   | 12 | 48.0        | 6.1  | 36.2           | 18.2 | 3.2875 | 1.0382 |
| 5                   | 9  | 49.2        | 3.8  | 76.7           | 26.7 | 4.2326 | 2.4634 |
| 6                   | 2  | 37.5        | 3.2  | 50.7           | 1.9  | 9.8082 | 2.1247 |
| 6/4                 | 25 | 48.7        | 6.7  | 34.6           | 26.4 | 2.5449 | 1.1506 |
| 8/2                 | 1  | 41.4        | -    | 16.9           | -    | 2.3789 | -      |
| 8/3                 | 5  | 47.2        | 4.6  | 12.8           | 11.5 | 1.4309 | 1.2079 |

D.P. – Desvio Padrão; I.G.C. – Índice Gonádico por Comprimento

Tabela 2 – Diâmetros dos oócitos presentes nas gónadas em diferentes fases de maturação.

| Fase de maturação | Tipo de ócito  | n  | Diâmetro   |       |                |
|-------------------|----------------|----|------------|-------|----------------|
|                   |                |    | Médio (µm) | D.P.  | Min.-Máx. (µm) |
| Imaturo           | Não-vitelado   | 73 | 48         | 17.7  | 23 - 87        |
| Desenvolvimento   | Não-vitelado   | 34 | 86         | 16.3  | 45 - 111       |
|                   | Vitelado       | 30 | 191        | 48.5  | 105 - 319      |
|                   | Atrético       | 11 | 215        | 62.4  | 141 - 341      |
| Pré-postura       | Não-vitelado   | 64 | 69         | 14.5  | 41 - 114       |
|                   | Vitelado       | 72 | 327        | 130.0 | 126 - 580      |
|                   | Núcleo migrado | 29 | 629        | 36.9  | 542 - 684      |
|                   | Hidratado      | 32 | 589        | 134.4 | 317 - 828      |
| Pós-postura       | Atrético       | 3  | 255        | 71.1  | 191 - 331      |
|                   | Não-vitelado   | 34 | 78         | 18.5  | 41 - 122       |
|                   | Vitelado       | 26 | 351        | 129.3 | 157 - 622      |
|                   | Núcleo migrado | 14 | 532        | 86.2  | 310 - 644      |
|                   | Hidratado      | 13 | 697        | 97.7  | 469 - 806      |
|                   | Atrético       | 31 | 263        | 72.2  | 144 - 414      |
|                   | Pof's          | 31 | 191        | 67.4  | 86 - 375       |

D.P. – Desvio Padrão

Tabela 3 – Diâmetro médio, desvio padrão e valores mínimo e máximo dos diferentes tipos de óocitos nos diversos estados de maturação femininos.

| Maturação | Tipo de óocitos  | N  | Diâmetro   |       |                |
|-----------|------------------|----|------------|-------|----------------|
|           |                  |    | Média (µm) | D.P.  | Min.-Máx. (µm) |
| 1         | Não-vitelados    | 34 | 33         | 4.4   | 23 – 44        |
| 2         | Não-vitelados    | 39 | 62         | 12.7  | 37 – 87        |
| 3         | Não-vitelados    | 33 | 86         | 16.3  | 45 – 110       |
|           | Vitelados        | 30 | 191        | 48.5  | 105 – 318      |
|           | Atréticos        | 11 | 215        | 62.4  | 141 – 340      |
| 4         | Não-vitelados    | 31 | 69         | 14.3  | 41 – 98        |
|           | Vitelados        | 40 | 328        | 136.6 | 135 – 580      |
|           | Atréticos        | 3  | 255        | 71.1  | 191 – 331      |
| 5         | Não-vitelados    | 33 | 69         | 15.6  | 43 – 113       |
|           | Vitelados        | 33 | 327        | 123.7 | 126 – 550      |
|           | Núcleos migrados | 29 | 629        | 36.9  | 541 – 685      |
|           | Hidratados       | 32 | 589        | 134.4 | 317 – 828      |
| 6/4       | Não-vitelados    | 34 | 78         | 18.5  | 41 – 122       |
|           | Vitelados        | 26 | 351        | 129.3 | 157 – 622      |
|           | Núcleos migrados | 14 | 532        | 86.2  | 310 – 644      |
|           | Hidratados       | 13 | 697        | 97.7  | 469 – 806      |
|           | Atréticos        | 31 | 263        | 72.2  | 144 – 414      |
|           | Pof's            | 31 | 191        | 67.4  | 86 – 375       |

D.P. – Desvio Padrão

Tabela 4 – Características microscópicas e correspondência macroscópica nas diferentes fases de maturação das gónadas femininas.

| Fase de maturação    | Características Tipo                     |                            |
|----------------------|--|----------------------------|
|                      | Microscópicas                            | Macroscópicas              |
| I – Imatura          | Massa contínua de óocitos primários      | ⇒ Sem óocitos visíveis     |
| II – Desenvolvimento | Óocitos previtelados e vitelados         | ⇒ Com óocitos visíveis     |
| III – Pré-postura    | Óocitos vitelados                        | ⇒ Óocitos opacos (brancos) |
|                      | Óocitos c/ núcleos migrados e hidratados | ⇒ Óocitos hialinos         |
| IV – Postura         | Óocitos hidratados                       | ⇒ Óocitos hialinos         |
|                      | Espaços entre os óocitos                 | ⇒ Gónada mais flácida      |
| V – Pós-postura      | Óocitos atréticos                        | ⇒ Óocitos rosados escuros  |

Tabela 5 – Características microscópicas e macroscópicas, que caracterizam os diferentes estados de maturação.

| Estado de maturação  | Características Tipo  |   |
|----------------------|---|---|
|                      | Microscópicas   | Macroscópicas   |
| I – Imaturo          | Apenas <u>oócitos primários</u> , distinguem-se facilmente os septos ováricos                                       | Gónadas pequenas, triangulares ou ovoides, rosadas, <u>sem oócitos visíveis</u>                         |
| II - Desenvolvimento | Oócitos primários (previtelados) e <u>vitelados</u>   | Gónadas ovoides, translúcidas, rosadas, <u>com pequenos oócitos visíveis</u>                            |
| III – Pré-postura    | Oócitos vitelados, <u>oócitos com núcleos migrados</u> , em fase de hidratação e hidratados                         | Gónadas volumosas, com <u>oócitos opacos</u> (brancos) e <u>transparentes</u> (hialinos)                |
| IV – Postura         | Oócitos com núcleos migrados, presença maioritária de <u>oócitos hidratados</u>                                     | Gónadas volumosas com a membrana envolvente fina, <u>ovos transparentes</u> a fluir da gónada (running) |
| V – Pós-postura      | Semelhante ao estado II e III distinguindo-se pela presença de <u>folículos pós-ovulatórios</u> e oócitos atréticos | <u>Gónada flácida</u> , rosada escura   |

Sublinhado indica as características mais relevantes

## FIGURAS

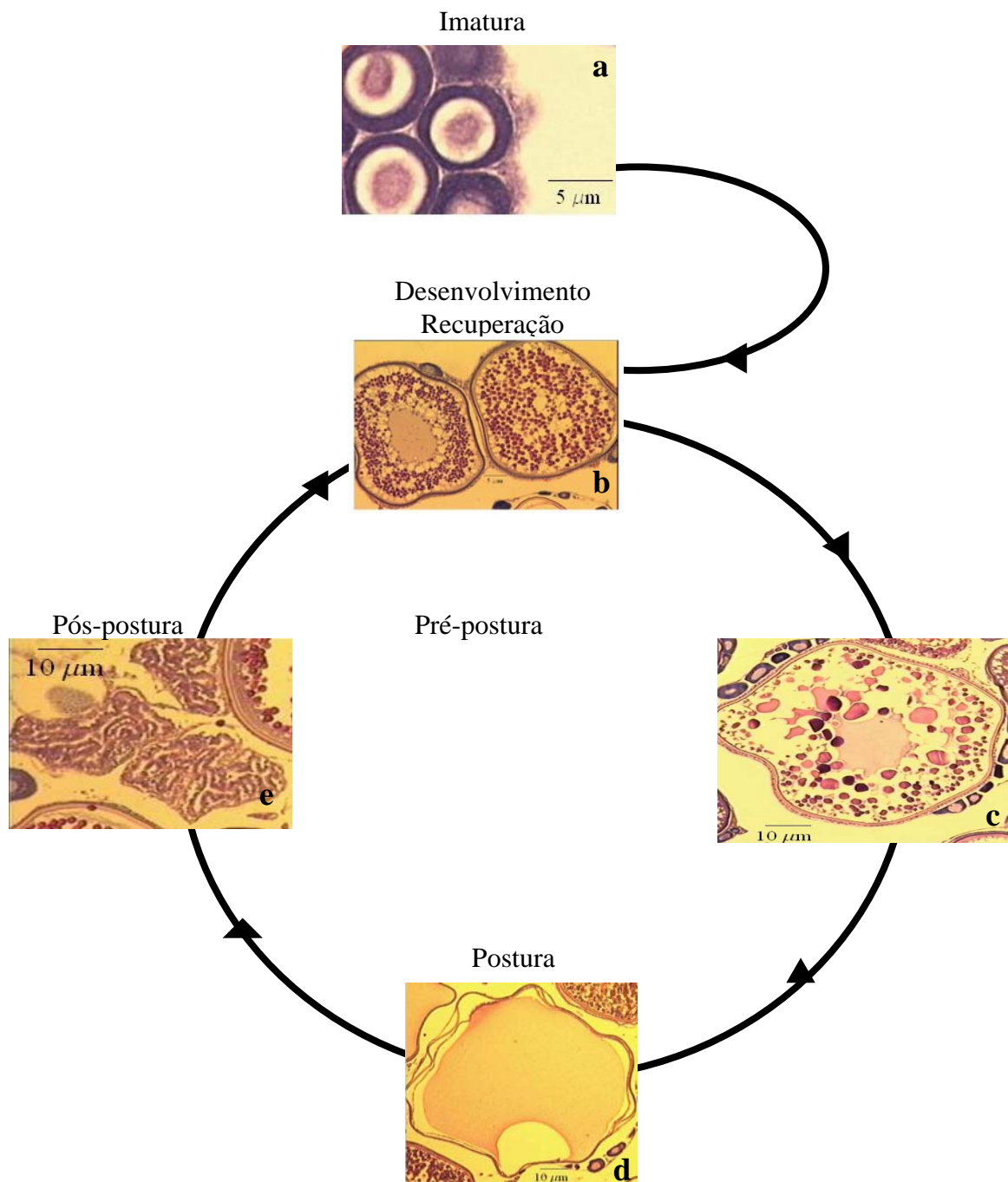


Figura 1 – Diagrama representativo das fases de maturação dos oócitos na pescada.  
Legenda: **a** – oócitos não-vitelados; **b** - oócitos parcialmente vitelados; **c** – oócito vitelado; **d** - oócito hidratado; **e** - folículos pós-ovulatórios.

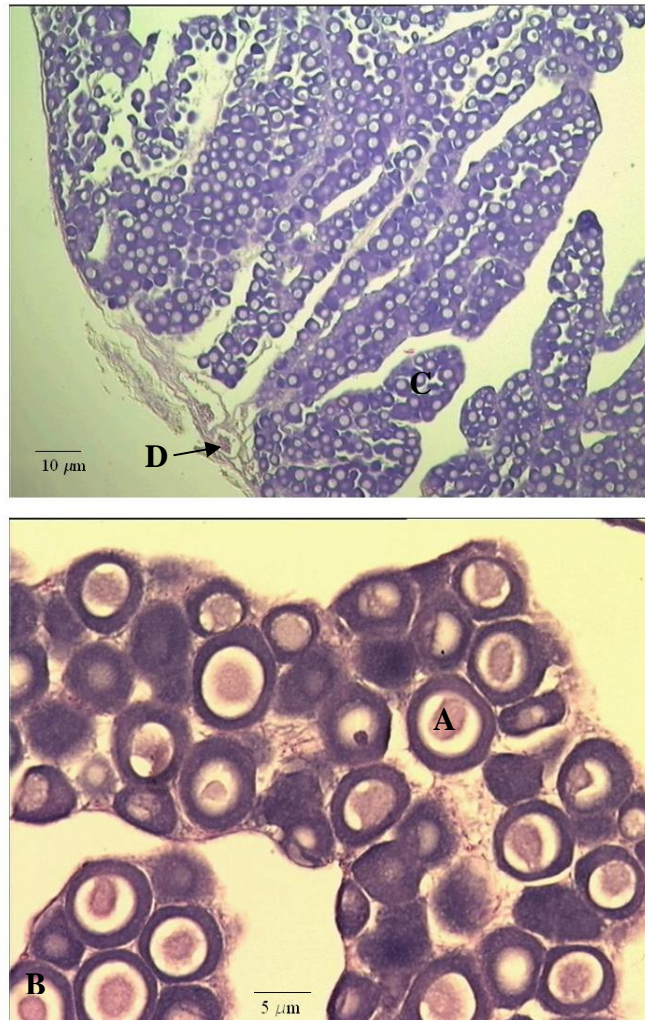


Figura 2 – Aspecto microscópico de uma gónada na fase imatura; **A**- núcleo do oócito não-vitelado; **B**- Citoplasma do oócito não-vitelado; **C**- septo ovárico; **D**- vasos sanguíneos.

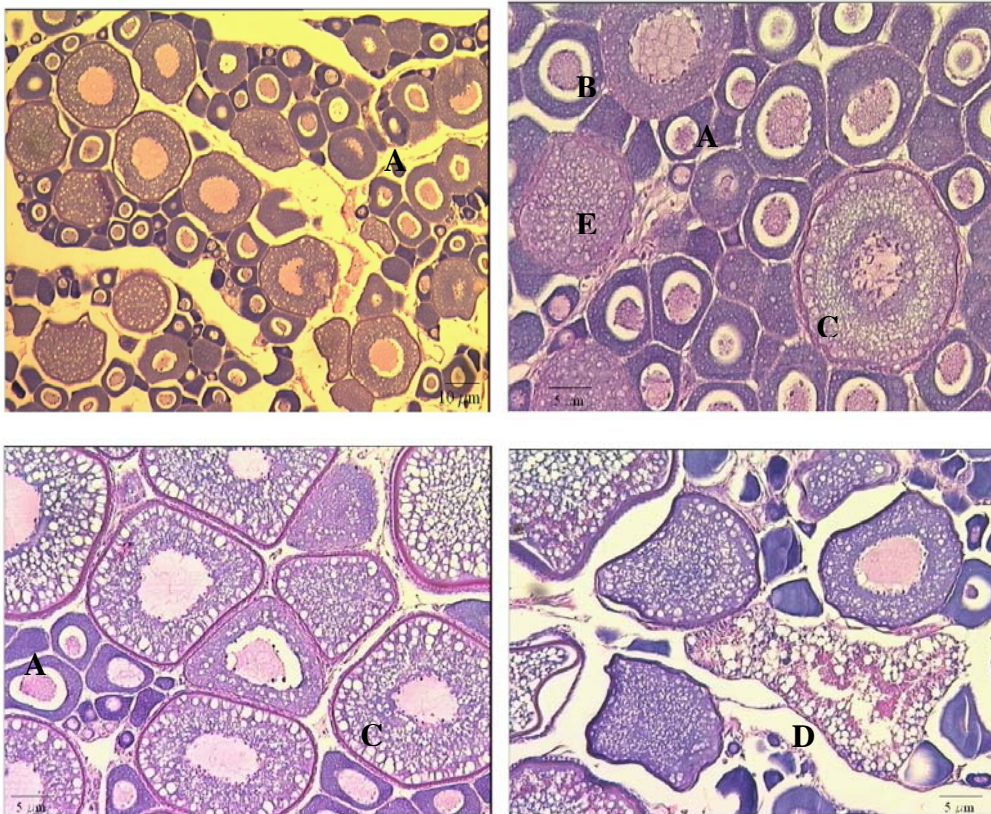


Figura 3 – Aspecto microscópico de uma gónada em fase de desenvolvimento; **A**- oócito não-vitelado; **B**- oócito parcialmente vitelado; **C**- oócito vitelado; **D**- oócito atrético; **E**- vasos sanguíneos.



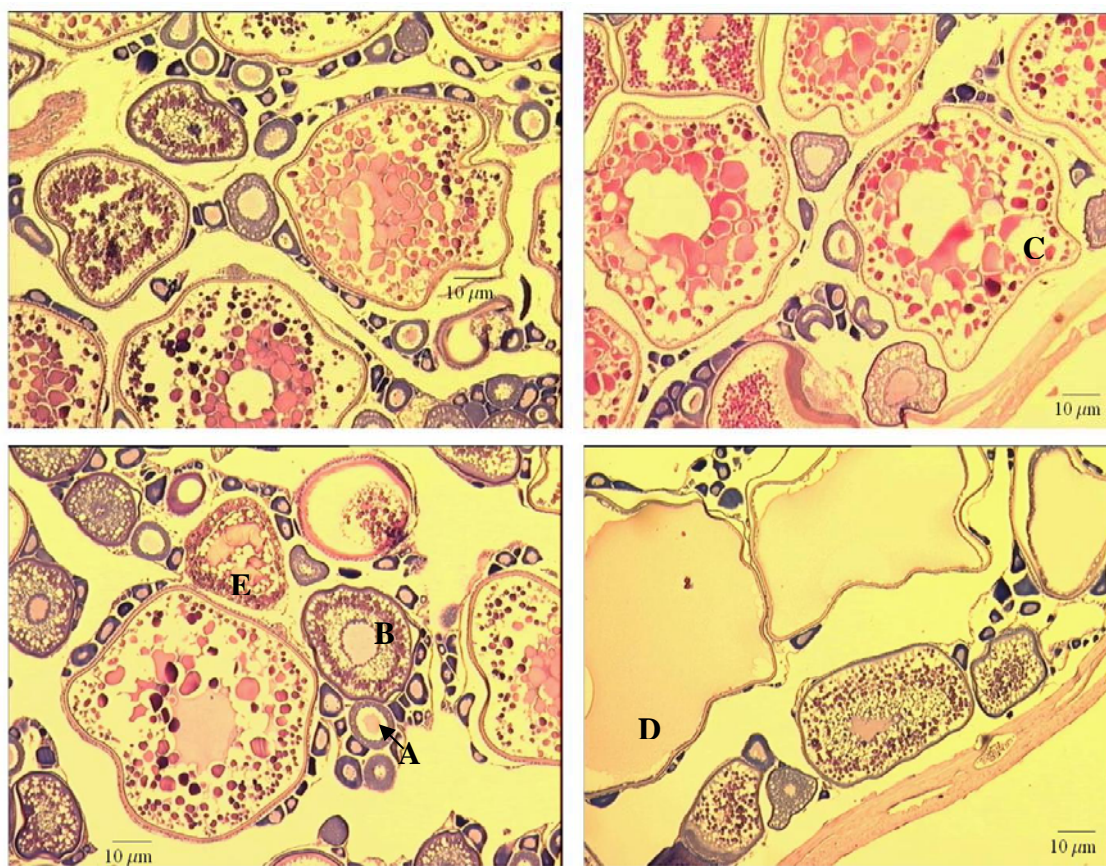


Figura 4 – Aspecto microscópico de uma gónada em fase de pré-postura; **A**- oócito não-vitelado; **B**- oócito vitelado; **C**- oócito com núcleo migrado; **D**- oócito hidratado; **E**- oócito atrético.

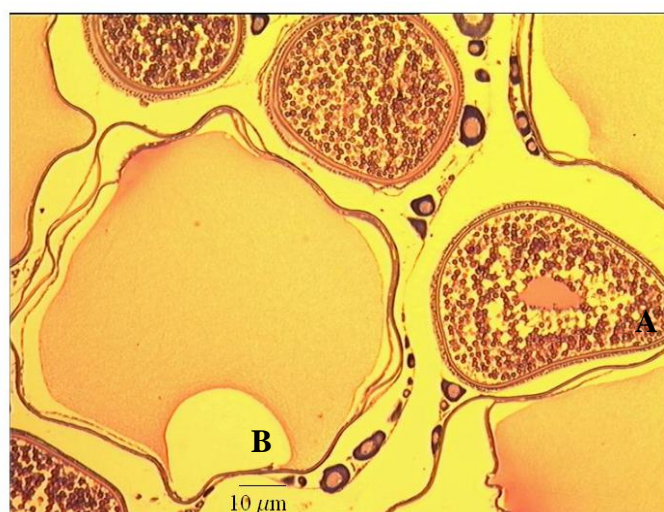


Figura 5 – Aspecto microscópico de uma gónada em fase de postura; **A**- oócito vitelado; **B**- oócito hidratado.

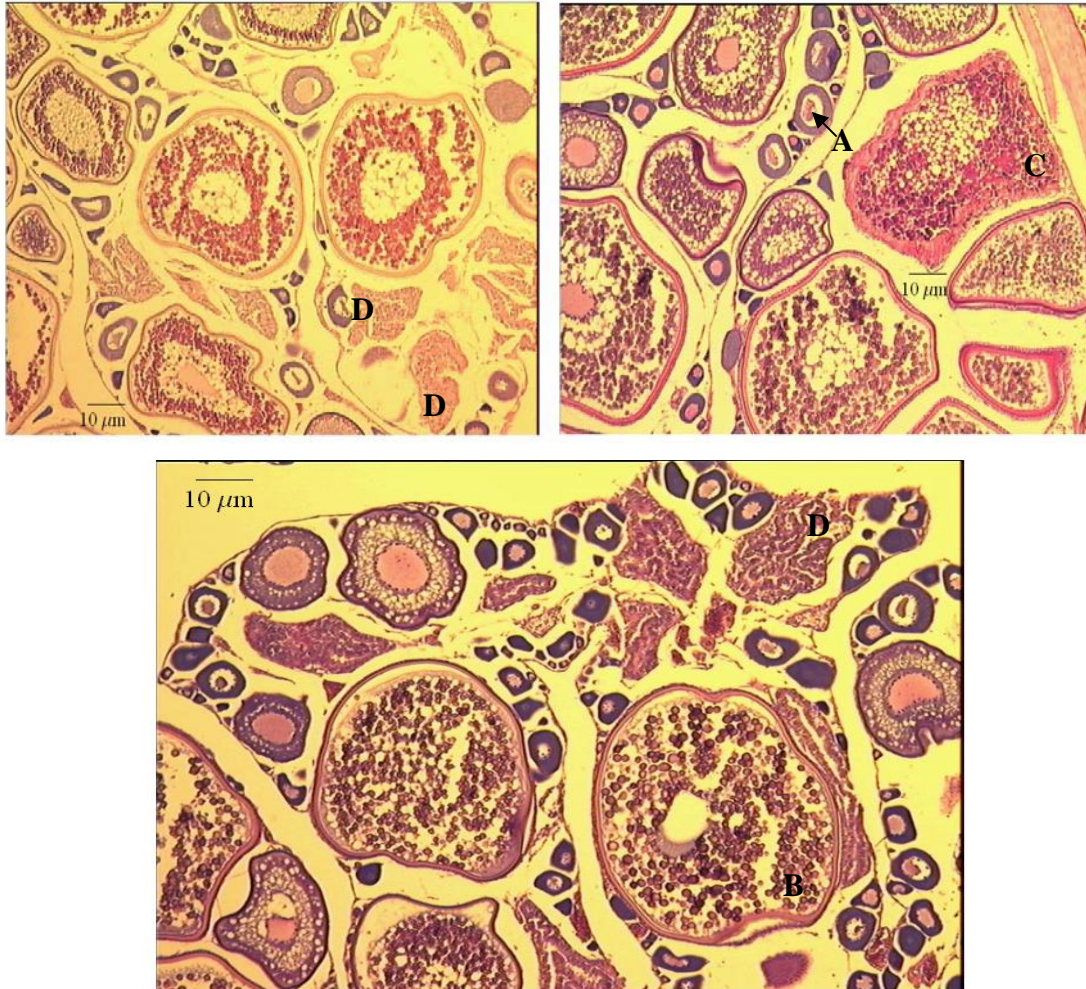


Figura 6 – Aspecto microscópico de uma gónada em fase de pós-postura; **A**- oócito não-vitelado; **B**- oócito vitelado; **C**- oócito atrético; **D**- folículo pós-ovulatório.



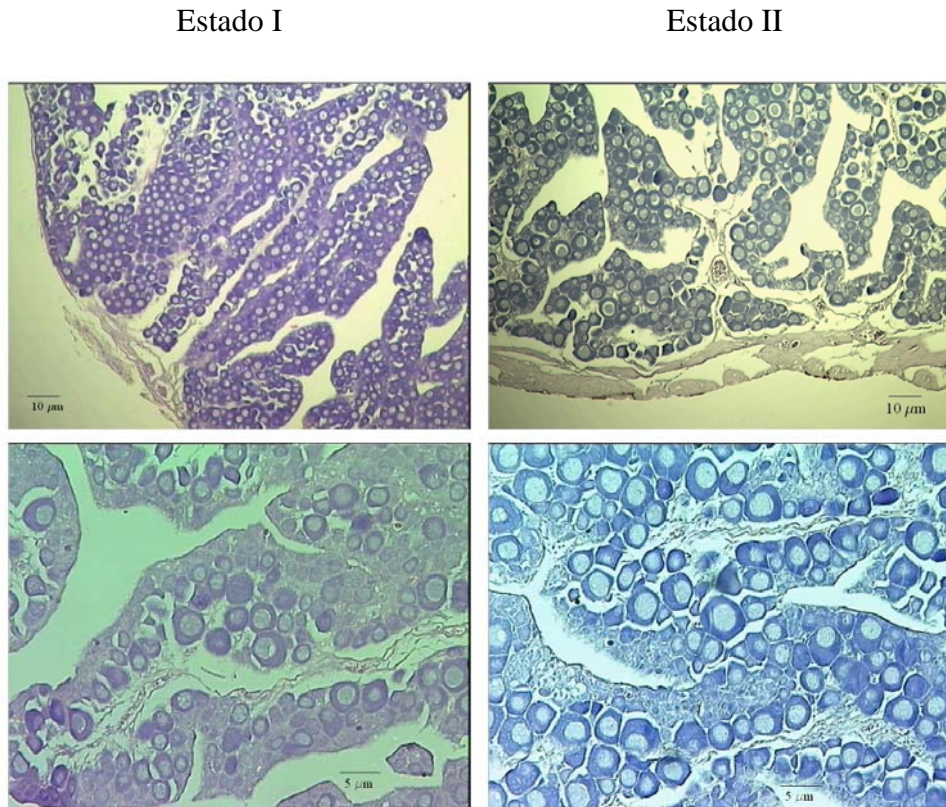


Figura 7 – Dois aspectos diferentes de gónadas pertencentes quer ao estado I quer ao estado II, de identificação macroscópica.

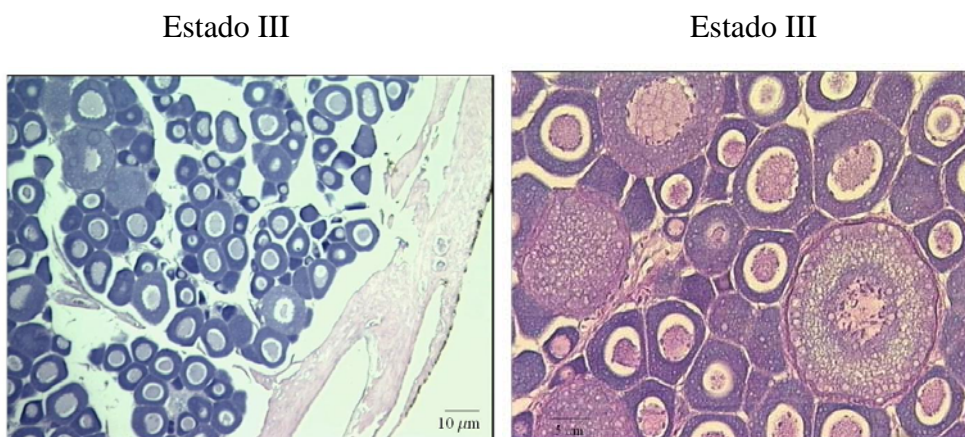


Figura 8 – Dois aspectos diferentes de cortes histológicos de gónadas pertencentes ao estado III da escala macroscópica.

## Estado III

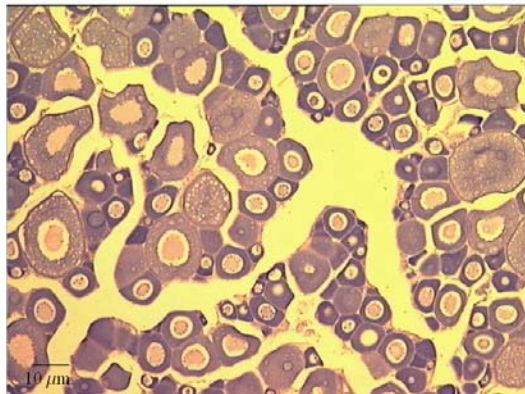


Figura 9– Aspecto microscópico de uma gónada em e.m. III (escala macroscópica).

## Estado VIII/III

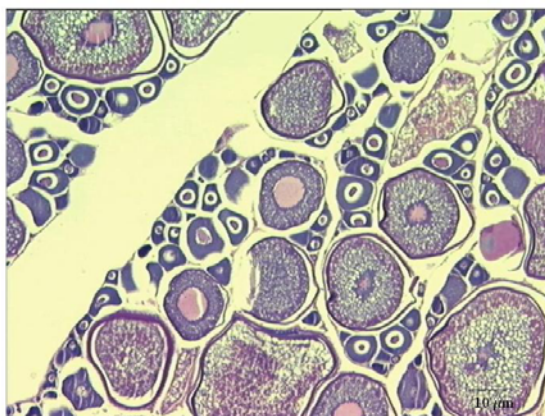


Figura 10– Aspecto microscópico de uma gónada em e.m. VIII/III (escala macroscópica).



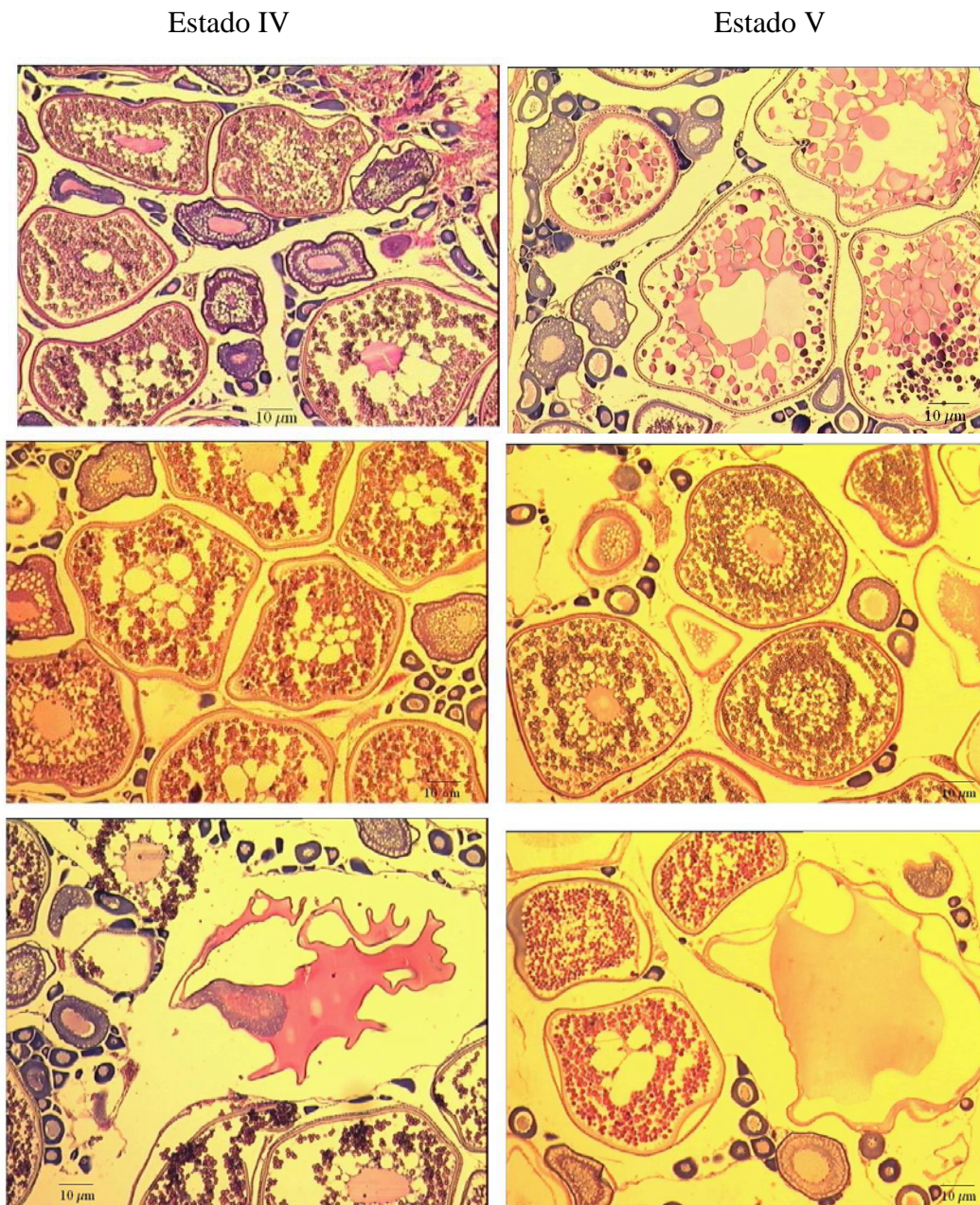


Figura 11 – Três aspectos diferentes de gónadas pertencentes quer ao estado IV quer ao estado V da identificação macroscópica.

## Estado VI

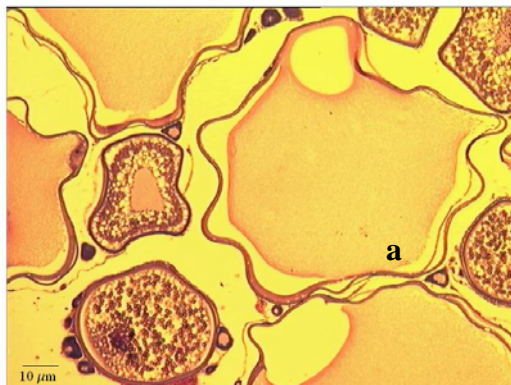


Figura 12 – Aspecto microscópico de uma gónada em e.m. VI (escala macroscópica), onde se destaca a presença em maior número de oócitos hidratados (**a**).

## Estado VI/IV

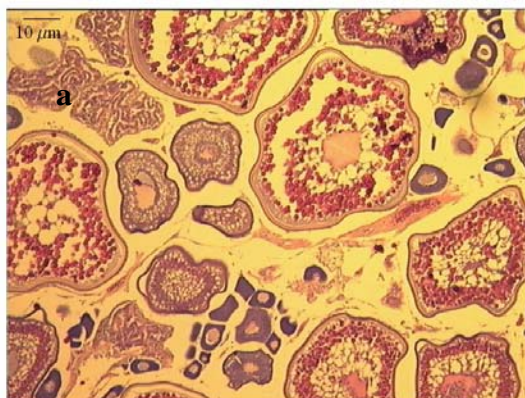


Figura 13 – Aspecto microscópico de uma gónada em e.m. VI/IV (escala macroscópica), onde se destaca a presença de POF's (**a**).



**Anexo I** – Escala de maturação macroscópica de 10 estados para as fêmeas de pescada.

**Estado I** Gónadas muito pequenas, triangular, rosa/avermelhado.



**Estado II** Gónadas ovóides, translúcidas, rosadas, sem oócitos visíveis.



**Estado III** Gónadas ovóides, translúcidas, rosadas, pequenos oócitos visíveis.



**Anexo I (cont.)** – Escala de maturação macroscópica de 10 estados para as fêmeas de pescada.

**Estado IV** Gónadas de maiores dimensões, com oócitos brancos, opacos, sem espaço entre eles, podendo observar-se nas mais adiantadas oócitos transparentes.



**Anexo I (cont.)** – Escala de maturação macroscópica de 10 estados para as fêmeas de pescada.

**Estado V** Gónadas volumosas com oócitos transparentes e opacos, mas com predomínio dos primeiros.



**Estado VI** Gónadas com a membrana envolvente muito fina, observando-se **a saída de ovos transparentes (“running”)**.

Esta característica é que define este estado embora as gónadas apresentem aspectos diferentes:

**A** - Gónadas volumosas com aspecto homogéneo, rosadas semelhantes ao estado V, **ovos quase todos hialinos**. Observa-se a saída de ovos hialinos (“running”)-**desova total**.

**B** - Gónadas com aspecto semelhante ao estado IV mas apresentando perto do hilo (orifício de saída) **uma massa de ovos hialinos, que estão saindo** (“running”)-**desova parcial**



**Anexo I (cont.)** – Escala de maturação macroscópica de 10 estados para as fêmeas de pescada.

**Estado VI/IV** Gónadas semelhantes ao estado IV, mas apresentando **depressões longitudinais**, maior flacidez, podendo observar-se alguns ovos transparentes perto do orifício de saída (OTS).



**Estado VIII** Gónadas com aspecto de saco vazios. Este estado é raro de se encontrar.

**Estado VIII/II** Gónada semelhante ao estado II, mas mais flácida e rosada escura (gónada em **recuperação**).

**Estado VIII/III** Gónada semelhante ao estado III, mas mais distendida, cor mais escura, maior flacidez (gónada em **recuperação**).

**Anexo II - Comparação das técnicas histológicas usadas para a pescada (HKE – código FAO para a pescada)**

| <b>Referência Bibliográfica</b>     | <b>Fixador</b>   | <b>Inclusão e espessura dos cortes ao micrótomo</b> | <b>Coloração</b>  |
|-------------------------------------|--|---|---|
| Murua <i>et al.</i> , 1998          | 4% formaldeído tamponado   |   |   |
| Balbontín & Fisher, 1981            | Formol a 10% - para a detecção de oócitos em processo de reabsorção  |   |   |
| Balbontín & Fisher, 1981            | Líquido de Gilson – para estimar a distribuição de tamanhos e o número total de oócitos presentes na gónada        |   |   |
| Osborne <i>et al.</i> , 1999        |  | Inclusão em parafina<br>Cortes de 5-7µm             | Hematoxilina-Eosina Harris  |
| Alheit & Wegener, 1986              | 4% solução tamponada de formalina<br>( <i>Ir.</i> Hunter & Macewicz, 1985)   |   |   |
| Tsimenidis & Papaconstantinou, 1985 | Líquido de Gilson – permite destruir a membrana que envolve a gónada facilitando a contagem dos Oócitos Hidratados |   |   |
| Louge & Christiansen, 1993          | Formol a 10%   | Inclusão em parafina<br>Cortes de 5µm               | Hematoxilina-Eosina Harris  |
| Foucher & Beamish, 1980             | Bouin  | Inclusão em parafina a 61°C<br>Cortes de 6µm        | 4 min em hematoxilina Harris seguida de 30 segundos numa solução 0.5% eosina e 95% álcool |
| Balbontín & Bravo, 1993             | Formol a 10%   |   |   |
| Sarano, 1983                        | Bouin-Allen  | Inclusão em parafina<br>Cortes 5-10µm               | Trichrome de Masson<br>Azan de Heidenhain   |

**Anexo III** - Os reagentes e os tempos de reacção dos mesmos nas respectivas fases do processamento dos tecidos, encontram-se descritos na tabela seguinte:

| <b>Reagente</b>                            | <b>Duração</b>                | <b>Fase do processamento</b> |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| Àlcool a 90%                               | 15 min                        | Desidratação                 |
| Àlcool a 96%                               | 15 min                        | Desidratação                 |
| Àlcool Absoluto                            | 15 min                        | Desidratação                 |
| Butanol                                    | 30 min                        | Desidratação                 |
| Butanol                                    | 3 horas                       | Desidratação                 |
| Parafina<br>(comp.f.*42-44°C)<br>+ butanol | 6 horas<br>na estufa a 50°C   | Inclusão dos tecidos         |
| Parafina<br>(comp.f.*42-44°C)              | 1 hora<br>na estufa a 50°C    | Inclusão dos tecidos         |
| Parafina<br>(comp.f.*56°C)                 | 1h 30 min<br>na estufa a 50°C | Inclusão dos tecidos         |

\* ponto de fusão

**Anexo IV** - Os reagentes e os seus tempos de reacção durante a fase de coloração (método Hematoxilina-Eosina) dos tecidos, encontram-se descritos na tabela seguinte:

| <b>Reagente</b>                 | <b>Duração</b>     | <b>Observações</b>  |
|---------------------------------|--------------------|---|
| Xilol                           | 15 min             |   |
| Xilol                           | 15 min             |   |
| Álcool a 90°                    | Passagem rápida    |   |
| Álcool a 70°                    | Passagem rápida    |   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Hematoxilina                    | 4 a 6 min          | Este tempo depende da intensidade do corante e do estado de desenvolvimento (maturação) a que se referem os cortes.   |
| Água da torneira                | Passagem rápida    |   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Álcool clorídrico               | Passagem rápida    |   |
| 0.3ml HCl + 250ml de Álcool 70° |                    |   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Água da torneira                | 1 min              | Colocar os cestos junto à torneira com um fio de água a correr; tendo o cuidado deste não cair directamente sobre eles – pois poderá soltá-los.   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Eosina                          | + ou – 30 segundos | Este tempo depende da intensidade do corante e do estado de desenvolvimento (maturação) a que se referem os cortes.<br>Exemplo:<br>cortes referentes a fêmeas em estado de postura ou pré-postura, absorvem mais rapidamente o corante. |
| Água da torneira                | Passagem rápida    |   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Água destilada                  | Passagem rápida    |   |
| Álcool a 95°                    | Passagem rápida    |   |
| Álcool a 95°                    | Passagem rápida    |   |
| Álcool absoluto                 | Passagem rápida    | Nesta fase ter o especial cuidado de escorrer muito bem o cesto, para evitar que quando mergulhado em xilol este fique saturado.  |
| Xilol                           | 10 min             |   |
| Xilol                           | 10 min             |   |