

### 3. PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DE OTÓLITOS E DETERMINAÇÃO DA IDADE

Este protocolo, baseado no Manual de Determinação da Idade (ICES, 2009), foi desenvolvido para harmonizar metodologias de preparação de otólitos e leitura de idades de enguias, no âmbito do projeto SUDOANG. O sexo dos indivíduos deve ser determinado através da análise macroscópica das gónadas (ver Protocolo de amostragem de gónadas para avaliação do rácio sexual).

#### 3.1. Extração e armazenamento

- Extrair ambos os otólitos *sagittae* de cada enguia;
- Limpar os otólitos com água e, em seguida, secá-los;
- Armazenar os otólitos secos em pequenos recipientes (por ex. *Eppendorfs*), assegurando que estes estão completamente secos para evitar deterioração.

#### 3.2. Desbaste e polimento

- Escolher o otólito direito para maior consistência nas leituras. Caso tal não seja possível, deve escolher-se o otólito esquerdo e mencionar esta informação nas observações;
- Os otólitos podem ser observados inteiros (sem preparação) com luz forte transmitida ou sobre uma superfície escura com boa incidência de luz. Se existirem menos de 4 ou 5 marcas, a idade pode ser lida sem qualquer preparação ou, então, após imersão dos otólitos em álcool a 96% para melhor visualização das marcas de crescimento.
- Se a idade for superior a 5 anos, os otólitos devem ser impregnados em resina;
- As secções sagitais são obtidas impregnando o otólito diretamente em resina; no caso de se pretender obter secções transversais, será necessário fazer a impregnação em duas camadas de resina, de modo que o otólito fique posicionado no centro do bloco de resina;
- O processo de desbaste deve ser cuidadosamente controlado até se alcançar o plano médio do otólito. Para tal, o otólito deve ser examinado à lupa binocular, com a maior ampliação possível, e usando diversos tipos de luz, incluindo luz transmitida, refletida ou polarizada;
- O otólito deve ser desbastado ao longo do plano sagital (se a enguia tiver até 12 anos e o otólito não for curvo) ou no plano transversal (requer cortar uma fatia do otólito ao longo do eixo transversal usando uma serra de diamante) (dependendo da curvatura do otólito e dependendo do tamanho do otólito) até alcançar o centro do núcleo;
- O processo de desbaste pode ser feito manualmente ou usando uma roda de desbaste com lixa de sílica, lubrificada com água destilada;
- Deve polir-se a superfície desbastada do otólito usando lixa de carboneto de silício uma gama decrescente de dureza (grão entre 1200-4000), panos de joalharia ou pastas à base de alumínio ou pó de diamante, lubrificado com água destilada.

Para mais informações sobre os procedimentos, ver Manual de Determinação da Idade da enguia atlântica (ver link que aparece depois das referências).

### 3.3. Determinação da idade

- Após preparação dos otólitos, devem obter-se imagens dos mesmos para partilhar entre os vários leitores;
- As secções sagitais requerem desbaste e coloração para realçar as marcas de inverno. As secções transversais não requerem este procedimento;
- Deve proceder-se à leitura da idade, isto é, à contagem do número de marcas de inverno. As zonas translúcidas (inverno) são claras, e as zonas opacas (verão) são escuras, quando o otólito é observado com **luz transmitida**. Ao utilizar **luz refletida**, as zonas opacas (verão) são claras, e as zonas translúcidas (inverno) são escuras.

### 3.4. Material

- Lupa binocular (com câmara digital e captura de imagens e software de análise Image J);
- Lâminas de vidro para microscópio;
- Pinças de ponta fina;
- Agulhas de dissecação;
- Recipiente de lâminas;
- Reagentes necessários para a preparação:
  - Cera, resina epoxy, para impregnação do otólito;
  - Pasta de alumina e pasta de diamante para desbastar otólitos.

### Referências

[ICES. 2009. Workshop on Age Reading of European and American Eel \(WKAREA\). Bordeaux, France: ICES CM 2009\ACOM: 48, 66 pp.](#)

[ICES 2009. Manual for the Ageing of Atlantic Eel. In Workshop on Age Reading of European and American Eel, \(WKAREA\) Annex 4, 57 pp.](#)

[illegible]