

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Reprodução assexuada de anémonas para fins ornamentais

Daniela Sofia Coutinho Eiras-Novo

Março 2017

Instituto Politécnico de Leiria

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Reprodução assexuada de anémonas para fins ornamentais

Daniela Sofia Coutinho Eiras-Novo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da
Doutora Susana Margarida de Freitas Ferreira

Março 2017

Reprodução assexuada de anémonas para fins ornamentais

Daniela Sofia Coutinho Eiras-Novo

Copyright © Daniela Sofia Coutinho Eiras-Novo

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Março 2017

Agradecimentos

Antes de me prolongar em agradecer a este ou àquele, queria dirigir o maior dos meus agradecimentos aos meus pais. Sem eles, não seria muito do que hoje sou, nem teria chegado onde cheguei, graças a toda a ajuda, compreensão e paciência. À minha heroína júnior, que é a minha irmã, um grande obrigada por ser quem é e por tudo o que partilhámos. A tua força é uma inspiração, princesa. À minha mãe, uma verdadeira mãe guerreira, OBRIGADA por tantas vezes nos teres posto à frente dos teus interesses e teres SEMPRE FEITO o que podias e o que não podias por nós !! És MÃE com as letras todas. E em todos os sentidos. É a ti que dedico esta tese.

Ao meu melhor amigo, que aturou muitas das minhas “parvoeiras”, foi o meu suporte em muitos momentos, mesmo sem saber, e contribuiu imenso para me fazer crescer e abrir os olhos para muita coisa, o meu muito obrigada! Apesar de todos os altos e baixos, chatices, stresses e confusões, ainda continuas do meu lado. Obrigada por isso, e por me aturares. Gosto de ti assim, nunca mudes. E, como tu o fazes, quero que saibas que estarei sempre do teu lado. Amizades como as nossas são raras e únicas. Tu sabes.

Não me poderia esquecer da minha grande amiga Maçãs, a minha companheira de muitas loucuras! “Somos malucas mas felizes”, sempre! Obrigada por estares sempre comigo, por ouvires os meus desabaços, por me dares na cabeça e me dares conselhos, por sermos como somos quando estamos juntas, e pelos ‘milhares’ de eventos de tunas a que fomos! Não preciso dizer mais nada.

A todos os meus amigos e colegas de faculdades, um muito obrigada por se terem cruzado no meu caminho. Uns saíram dele, outros entraram, outros continuaram, mas todos me deram um bocado de si e me ensinaram muita coisa, tanto para o mal como para o bem.

Também um enorme obrigada aos meus companheiros e companheiras de vida académica! Fomos caloiros juntos, fomos praxados juntos, fomos unidos, passámos por muito e foi com muito orgulho que traçámos todos a capa! Foi o culminar de um grande ano, que sei que nunca vamos esquecer. Obrigada por este primeiro ano recheado de novidades e coisas boas que, com vocês, descobri.

Ao meu curso, a BMB, um enorme agradecimento! Ui... Tudo aquilo porque passámos, praxes, festas e jantares (ui, os jantares, as imaculadas e os penáltis!), as músicas, os desfiles e semanas académicas e do caloiro, não se explica! São vivências, conquistas, sentimentos e emoções que não se esquecem. Esta vida é única, e juntos conseguimos fazer com que fosse inesquecível! Obrigada, a superiores e caloiros. Continuem a honrar o curso. Obrigada a todos. “BMB é união e não vai emboraaa”!

À minha família académica, aquela que, em Peniche, foi o meu suporte, um agradecimento sentido. Não me escolheram, fui eu que vos escolhi a vocês! Muito obrigada por todos os jantares que passámos com a Ursinha Carinhosa. Sobrevivemos, e conviver com vocês deixa marcas, marcas de amizade e união, que quero que sejam para sempre!

Um especial obrigada aos meus padrinhos e afilhados. Vocês são o meu orgulho, pequeninos! São a minha descendência. É com enorme nostalgia que recordo o vosso pedido que, com muita honra, aceitei, o vosso baptismo, o vosso Traçar, o vosso primeiro ano como superiores, o vosso primeiro ano a praxar, os vossos afilhados, serem vocês a traçar a capa... tudo. Todo o vosso crescimento, ver o quanto cresceram, faz-me vir lágrimas aos olhos. Sinto-me tão pequenina, quando recordo todo este passado, com vocês. “Sofri” muito enquanto caloira (o qual não me arrependo minimamente!) e com isso aprendi a amar esta vida, amar o traje e respeitar tudo o que diz respeito à Vida Académica. É muito gratificante olhar para trás e ver que vos consegui passar tudo aquilo que aprendi e todos os meus ensinamentos. Continuem a ser assim e a deixar a madrinha babada! Longe ou perto, vou estar sempre com vocês, “assim na ESTM como lá fora”. Nunca se esqueçam!

Claro que não me podia esquecer da minha Grande tuna! “A_marTuna, eu amo vocês”! Nunca, mas nunca, me vou esquecer de vocês. Como? Como é que eu me poderia esquecer da minha grande família musical, aquela que me fez imensamente crescer, que me fez acreditar imenso em mim, que me fez ganhar mais autoconfiança, que me fez olhar para tudo com outros olhos e que me fez esquecer os problemas, nem que fosse pelos breves minutos dos ensaios? Vocês são demais! Como todas as famílias (sim, é o que são, embora, por vezes, diga o contrário), temos os nossos problemas, as nossas discussões (que são mais que muitas!) e as nossas

conversas, mas também temos as nossas alegrias, as nossas conquistas, as nossas descobertas, as nossas viagens, as nossas loucuras, aquelas conversas que dão sempre para o duplo sentido (somos nós e basta!), os encontros, os festivais, os convívios... Tudo isto não seria possível sem vocês! Ultrapassámos barreiras, adversidades e lutamos contra muita coisa e muita gente. Com muita dificuldade, ultrapassámos tudo isto, e isso faz-me ter ainda mais orgulho em nós! Com vocês “saí da casca” e nada nem ninguém pode apagar isso. Às minhas aprendizas de estandarte, um muito obrigada pelo vosso empenho, dedicação e treinos, por aquilo que não é só “abandar a bandeira”. Fazer estandarte é representar uma tuna, uma cidade, uma escola... É uma paixão que não se explica, mas se entrega a cada passo ou coreografia que se desenham. Continuem a amar o que fazem, assim como eu!

Por fim, não me posso esquecer de agradecer ao Diogo Costa e à Sofia Marques, que me ajudaram na realização de todo o trabalho experimental desta tese, e com os quais passei muitas horas no campo, no laboratório e na companhia das nossas meninas anémonas. Obrigada pelo vosso trabalho e espero que tenham muito sucesso em tudo o que façam.

À Cristiana Gastão, por me ter acompanhado nas derradeiras recolhas, numa das quais ficou encharcada dos pés à cabeça, graças a uma visita inesperada da nossa ‘amiga’ chuva! Muito obrigada, Cris!

À minha orientadora, Susana Ferreira, também o meu muito obrigada, pela paciência, dedicação e todo o tempo dispensado para me aturar em reuniões e em inúmeras idas ao laboratório.

Espero não me ter esquecido de ninguém. Se o fiz, peço desculpa. Posso não ter falado de toda a gente mas, à sua maneira, todas as pessoas com que me cruzei me passaram um bocado de si, e me ajudaram a seguir em frente e lutar pelos meus sonhos. Obrigada a todos aqueles que acreditaram em mim e nunca me deixaram desistir.

Da Daniela, aquela menina pequenina que, hoje em dia, tem muito orgulho no que se tornou e que, com muita nostalgia, recorda tudo aquilo que a fez crescer.

As saudades já são mais que muitas...

Peniche, 2017

Resumo

Este trabalho teve como principal objetivo, avaliar a viabilidade de propagar anémonas-do-mar *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) e *Actinia fragacea* Tugwell, 1856, através de corte longitudinal do corpo das mesma, em duas metades. Procurou avaliar-se a taxa de sobrevivência destas anémonas, o tempo que demoram a regenerar e avaliar o crescimento das novas anémonas seccionadas.

Independentemente de as anémonas *A. fragacea* terem sido inicialmente maiores que as anémonas *A. equina* (em biomassa, diâmetro e altura), ambas as espécies evidenciaram comportamentos semelhantes ao longo do ensaio experimental. As anémonas *A. fragacea* e *A. equina* conseguiram regenerar-se, sem que ocorresse qualquer mortalidade. No entanto, o facto de terem diminuído de tamanho, ao longo do procedimento experimental, evidenciou a necessidade de futuramente se investigar: 1) quais as melhores condições ambientais a fornecer a estes organismos, em cativeiro; e 2) qual a melhor dieta, que lhes permita regenerar e crescer, o mais rápido possível.

As anémonas-do-mar *A. fragacea* e *A. equina* evidenciaram características relevantes, para que possam ser exploradas como espécies ornamentais, ou mesmo como organismos para fins de investigação científica. A metodologia, de dividir os indivíduos longitudinalmente ao meio, permite obter indivíduos genotipicamente semelhantes, ao longo de todo o ano. O processo em si emprega procedimentos de baixa exigência tecnológica e, conseqüentemente, implica baixos custos económicos.

Palavras-chave: *anémonas, Actinia fragacea, Actinia equina, reprodução assexuada, fissão longitudinal, exploração económica*

Abstract

The main objective of this work was to evaluate the viability of propagating sea anemones *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) e *Actinia fragacea* Tugwell, 1856, by longitudinal fission of the anemones in two halves. It was sought to evaluate the survival rate of these anemones, the time it took them to regenerate and evaluate the growth of the new sectioned anemones.

Although anemones *A. fragacea* were initially larger than *A. equina* (in biomass, diameter and height), both species showed similar behavior throughout the experimental trial. The anemones *A. fragacea* and *A. equina* were able to regenerate, without any mortality. Nevertheless, the fact that they decreased in size, during the experimental procedure, evidenced the need to investigate in the future: 1) the best environmental conditions to be supplied to these organisms, in captivity; and 2) what would be the best diet, which allowed them to regenerate and grow, as fast as possible.

Sea anemones *A. fragacea* and *A. equina* have shown relevant characteristics, so that they can be exploited as ornamental species, or even as organisms for the purpose of scientific research. The methodology, of dividing the individuals longitudinally in halves, allowed obtaining individuals with similar genotypes, throughout the year. The process itself employed procedures of low technological demand and, consequently, implies low economic costs.

Keywords: *anemones, Actinia fragacea, Actinia equina, asexual reproduction, longitudinal fission, economic exploration.*

Índice

Agradecimentos	
Resumo	
<i>Abstract</i>	
Índice	
Índice de figuras	
Índice de tabelas	
Introdução	01
1. Anémonas-do-mar: relevância ecológica e económica	01
2. Anémonas nativas de Portugal: potencial interesse para comércio de espécies ornamentais	02
2.1. Caracterização de <i>Actinia equina</i> (Linnaeus, 1758)	02
2.2. Caracterização de <i>Actinia fragacea</i> Tugwell, 1856	04
2.3. Biologia reprodutiva de <i>Actinia equina</i> e <i>Actinia fragacea</i>	05
3. Potencial biotecnológico das anémonas	10
4. Objectivos	11
Materiais e Métodos	13
1. Recolha de indivíduos <i>Actinia equina</i> e <i>Actinia fragacea</i>	13
2. Desenho experimental	13
2.1. Sistema de suporte de vida	13
2.2. Preparação dos indivíduos <i>Actinia equina</i> e <i>Actinia fragacea</i> e aclimação	14
2.3. Monitorização e controlo da qualidade da água	15
2.4. Alimentação	16
2.5. Ensaio experimental	16
3. Análise de dados	18
Resultados	21
1. Monitorização e controlo da qualidade da água	21
2. Sobrevivência das anémonas <i>Actinia fragacea</i> e <i>Actinia equina</i>	21
3. Dimensões corporais das anémonas <i>Actinia fragacea</i> e <i>Actinia equina</i>	22
4. Recuperação das anémonas <i>Actinia fragacea</i> e <i>Actinia equina</i>	26
5. Taxa de conversão (TCA) das anémonas <i>Actinia fragacea</i> e <i>Actinia equina</i>	27

Discussão	31
Conclusão	39
Perspectivas futuras	41
Referências bibliográficas	43
Anexos	

Índice de figuras

Figura 1: Fotografias de uma anémone tomate-do-mar *Actinia equina* (Linnaeus, 1758): **a.** observada à vista desarmada, fotografada com uma câmara Canon EOS M10; **b.** cortada longitudinalmente e observada ao microscópio estereoscópico de dissecação Leica DM 125, com uma ampliação total de 15×, com destaque para os acrorhagi (seta), fotografada com câmara de 5 megapixéis Leica MC 170 HD e processada através do Software Leica Application Suite 4.4.004

Figura 2: Fotografia de uma anémone morango-do-mar *Actinia fragacea* Tugwell, 1856, observada à vista desarmada, fotografada com Canon EOS M1004

Figura 3: Ilustração da fissão longitudinal de uma anémone (Beneti, 2008
Localização do local de recolha de espécimes *Actinia fragacea* e *Actinia equina*: Praia do Portinho de Areia Norte (39°22'8,03"N; 009°22'41,82"W), em Peniche (costa central Atlântica de Portugal). Imagem obtida através de *software* Google Earth (versão 4.2.0205.5730 de 13 de Novembro de 2007)08

Figura 4 – Localização do local de recolha de espécimes *Actinia fragacea* e *Actinia equina*: Praia do Portinho de Areia Norte (39°22'8,03"N; 009°22'41,82"W), em Peniche (costa central Atlântica de Portugal). Imagem obtida através de *software* Google Earth (versão 4.2.0205.5730 de 13 de Novembro de 2007). .13

Figura 5: Representação esquemática do sistema de suporte de vida, com a disposição das diferentes espécies de anémons e o tratamento a que foram sujeitas17

Figura 6: Biomassa (a-c), diâmetro (d-f) e altura (g-i) das anémons *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, intactas e seccionadas, 1 mês após a inflição do corte longitudinal (a,f,g) e no final (b,e,h) do ensaio experimental, assim com os respectivos incrementos (c,f,i). A caixa de *box plot* representa o intervalo interquartil (do limite inferior da caixa - 1º quartil, ao limite superior da caixa - 3º quartil), que contém 50% dos registos; as linhas que se estendem desde os limites superior e inferior da caixa, até aos valores mais altos e mais baixos, representam os valores inferiores a 1,5 vezes o intervalo interquartil; a linha preta, no interior da caixa, indica a mediana. Os círculos são *outliers* - casos com valores de 1,5 a 3 vezes maiores que o intervalo

Índice de tabelas

Tabela I – Variação dos parâmetros de avaliação da qualidade da água (média \pm erro padrão), nos sistemas de suporte de vida das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, no decorrer do período de aclimação e de ensaio experimental: temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitritos e nitratos21

Introdução

1. Anêmonas-do-mar: relevância ecológica e económica

As anêmonas-do-mar são animais solitários, predadores carnívoros, que pertencem ao Filo Cnidaria, Classe Anthozoa, Subclasse Hexacorallia. Ainda assim, estes seres podem estabelecer relações simbióticas com outros organismos (De Melo & Amaral, 2005), como por exemplo: 1) o peixe-palhaço (*Amphiprion ocellaris*) - também chamado de “peixe das anêmonas”, em que há proteção mútua contra predadores e trocas de nutrientes (Roach, 2003); 2) o caranguejo-eremita, em que anêmona protege o caranguejo contra predadores, recebe os restos de comida ignorados por aquele e é transportada ao longo de uma vasta área (o que lhe permite capturar mais alimento) (Vafeiadou *et al.*, 2012); 3) as zooxantelas (dinoflagelados) e zooclorelas (algas verdes unicelulares), organismos fotossintéticos que beneficiam de abrigo, dióxido de carbono e nutrientes minerais no interior do corpo da anêmona, mas que fornecem oxigénio e nutrientes orgânicos ao seu hospedeiro (Ahmadjian & Paracer, 1986; Shick, 1991). Estas últimas são frequentemente responsáveis pelas anêmonas exibirem cores exuberantes. Por estes motivos (as relações simbióticas com outros organismos, bem como as suas cores e formas apelativas), as anêmonas têm vindo a ser exploradas comercialmente, cada vez mais, como organismos marinhos ornamentais para aquários, a nível mundial (Olivotto *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2014). No entanto, as anêmonas são animais de crescimento lento e com mecanismos de reprodução ainda desconhecidos para muitas das espécies, pelo que a sua comercialização está dependente da captura nos seus habitats naturais. Consequentemente, estas práticas poderão estar a ameaçar as populações naturais de anêmonas com maior interesse económico (Shuman *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2014). Tal representará uma ameaça, não só para os ecossistemas naturais, em que as anêmonas ocorrem, bem como para a sustentabilidade desta indústria (Whitehead *et al.*, 1986; Wabnitz *et al.*, 2003; Shuman *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2014). A recolha de espécimes, para o comércio de espécies ornamentais, ocorre frequentemente em países tropicais em desenvolvimento; pelo que, a regulamentação e gestão eficiente desta prática será muito difícil (Edwards, 1992; Wood 2001 a,b). Uma das possíveis respostas, para este problema, poderá passar pelo desenvolvimento de técnicas de

cultivo de organismos ornamentais, de forma eficiente e sustentável. Desta forma, seria possível, não só responder à procura de mercado por anémons-do-mar, mas talvez, repovoar também os ecossistemas fragilizados pela captura de uma espécie-alvo (Shuman *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2014). No entanto, o mercado de organismos ornamentais fomenta a procura de novas espécies, enquanto recurso económico, que possam vir a ser exploradas de forma sustentável.

2. Anémons nativos de Portugal: potencial interesse para comércio de espécies ornamentais

Várias espécies de anémons habitam o território marítimo Português. No entanto, duas espécies destacam-se pela sua abundância nas zonas rochosas costeiras intermareais: *Actinia equina* (Linnaeus, 1758) e *Actinia fragacea* Tugwell, 1856. Estas duas espécies apresentam uma ampla valência ecológica às variações dos parâmetros ambientais, nos seus habitats. Nomeadamente são capazes de resistir a dessecação e alterações drásticas de temperatura. Estas anémons encontram-se bem adaptadas à vida nos sistemas litorais, habitando substratos duros, em ambas as situações de exposição ou protecção a elevado hidrodinamismo (Ager, 2008). Consequentemente, ambas as espécies poderão facilmente adaptar-se a condições de cativeiro. Como apresentam pequeno tamanho corporal, não representarão um perigo de elevado risco para outros organismos marinhos, com os quais possam ser mantidas em comunidade, num mesmo sistema de suporte de vida. Todos estes motivos, conjugados com o facto de apresentarem cores exuberantes, dotam *A. equina* e *A. fragacea* como potenciais espécies para serem usadas no comércio de espécies ornamentais.

2.1. Caracterização de *Actinia equina* (Linnaeus, 1758)

Actinia equina (Linnaeus, 1758) é também chamada de “tomate-do-mar”. É uma das espécies de anémons mais abundantes nas zonas costeiras da Europa (Chomsky *et al.*, 2009).

A sua distribuição geográfica estende-se ao longo das zonas costeiras orientais do Oceano Atlântico, a partir do Mar Branco (na Rússia) até ao Equador, incluindo as ilhas Britânicas e da Macaronésia, bem como no Mar Mediterrâneo (Kruger & Griffiths, 1996; Chomsky *et al.*, 2004a,b). Existem igualmente referências da ocorrência desta espécie na África do Sul e no Japão (Yanagi *et al.*, 1999; Chomsky *et al.*, 2009).

Em termos de habitat, *A. equina* é abundante no sistema litoral, particularmente no andar infralitoral, de zonas costeiras expostas, e em poças e fendas húmidas do andar mediolitoral (Chomsky *et al.*, 2004a,b), pelo que estas anêmonas podem ser encontradas fora de água, durante a baixa-mar (Rodrigues *et al.*, 2008). Vivem em profundidades que vão desde os 0 m até aos -20 m, fixando-se em substratos duros de costas rochosas (Fish & Fish, 1989).

Como breve descrição geral (Fig. 1a), pode-se dizer que *A. equina* possui uma base larga adesiva, com bordo azul, e uma coluna lisa. Possui, ainda, cerca de 192 tentáculos retráteis, dispostos em 6 anéis que rodeiam a boca. Os tentáculos retraem total e rapidamente para o interior do corpo, quando o animal é perturbado, ou quando as condições ambientais são desfavoráveis. É possível observar manchas azuis salientes, dispostas na periferia do disco oral, exteriormente aos tentáculos - os “acrorhagi” (Fig. 1b.). Estas estruturas são tentáculos modificados, usadas especialmente para combater outras anêmonas, em situações de competição por território (Ager, 2008). A cor do corpo de *A. equina* é muito variável, com diferentes intensidades de vermelho, cor castanha ou verde. No entanto, a variedade verde foi considerada como uma espécie diferente - *Actinia prasina* Gosse, 1860, em termos genéticos, de microhabitat e distribuição no andar mediolitoral (Haylor *et al.*, 1984; Sole-Cava & Thorpe, 1987), sendo ainda válida essa classificação (Fautin, 2015). A anêmona *A. equina* pode atingir até 3 cm de altura e 7 cm de diâmetro do disco basal (Rodrigues *et al.*, 2008).

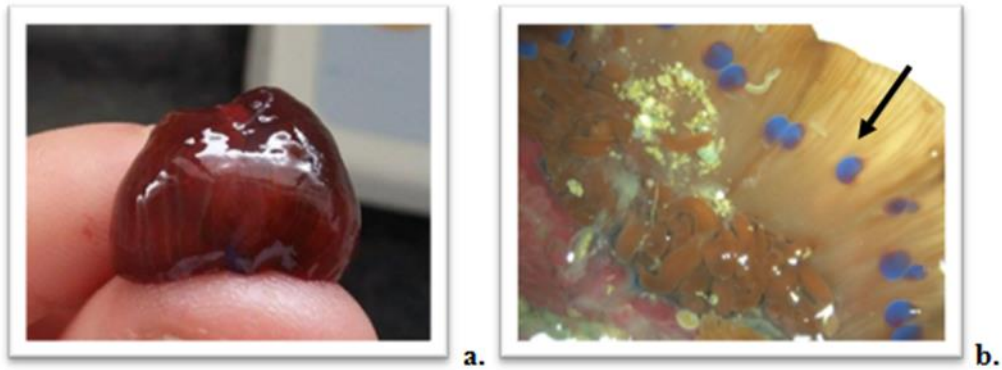


Figura 1 – Fotografias de uma anêmona tomate-do-mar *Actinia equina* (Linnaeus, 1758): **a.** observada à vista desarmada, fotografada com uma câmara Canon EOS M10; **b.** cortada longitudinalmente e observada ao microscópio estereoscópico de dissecação Leica DM 125, com uma ampliação total de 15×, com destaque para os acrorhagi (seta), fotografada com câmara de 5 megapixéis Leica MC 170 HD e processada através do Software Leica Application Suite 4.4.0.

2.2. Caracterização de *Actinia fragacea* Tugwell, 1856

Actinia fragacea Tugwell, 1856 é também chamada de “morango-do-mar”, devido à sua coloração vermelha, com pontuações verdes na coluna do corpo (Fig. 2).

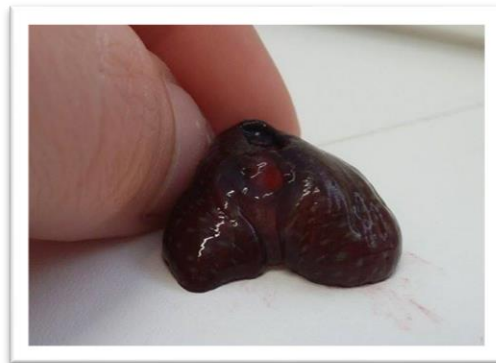


Figura 2 – Fotografia de uma anêmona morango-do-mar *Actinia fragacea* Tugwell, 1856, observada à vista desarmada, fotografada com Canon EOS M10.

A distribuição geográfica de *A. fragacea* é semelhante à de *A. equina*, embora seja mais restrita. Pode ser encontrada em zonas costeiras orientais do Oceano Atlântico, a partir do Noruega até ao Norte de África, abrangendo as ilhas Britânicas e da Macaronésia, existindo também no Mar Mediterrâneo (GBIF, 2016).

O seu habitat é semelhante ao de *A. equina*, nos andares mediolitoral e infralitoral. No entanto, surgem em zonas mais abrigadas da luz, de 0 m até aos -20 m de profundidade (Ager, 2008).

Em termos anatómicos, o corpo desta espécie é muito semelhante ao de *A. equina*, no entanto, apresenta maiores dimensões. Inicialmente, permanecia a dúvida se seriam dois fenótipos distintos de uma mesma espécie. No entanto, evidências bioquímicas e genéticas, de localização nas zonas costeiras e coloração constante, suportaram a decisão de se tratar de 2 espécies distintas, mas filogeneticamente muito próximas (Nei, 1972; Carter & Thorpe, 1981; Perrin, 1993). O corpo de *A. fragacea* apresenta uma coluna de altura reduzida, relativamente à largura do disco basal. Pode atingir um tamanho até cerca de 14 cm de diâmetro na base e 3 cm de altura (Rodrigues *et al.*, 2008). À semelhança de *A. equina*, o seu disco basal possui o bordo de cor azul. Os seus cerca de 190-200 tentáculos encontram-se dispostos em 6 anéis em torno da boca, que se retraem quando o animal é perturbado. Possui “acrorhagi” azuis (mas também cor de rosa ou brancos) dispostos na periferia do disco oral, exteriormente aos tentáculos. (Rodrigues *et al.*, 2008).

2.3. Biologia reprodutiva de *Actinia equina* e *Actinia fragacea*

As anêmonas-do-mar apresentam, em múltiplas espécies, reprodução sexuada e assexuada (Cecílio, 2012; Santos, 2015). Mas, a forma como o fazem é ainda desconhecida, para a maioria das espécies. O tipo de reprodução pode ocorrer preferencialmente de uma das formas, em diferentes populações de uma espécie (Orr *et al.*, 1982). Nestes animais, ambas os tipos de reprodução dependem das condições ambientais, sendo que a temperatura, a luz solar e a humidade são os fatores mais relevantes (Scremin, 2013).

A reprodução sexuada leva a uma identidade genética distinta e a uma descendência sem clones. Quando ocorre exclusivamente (sem reprodução assexuada), geralmente é influenciada por condições de *stress* ambiental (*e.g.*, temperatura elevadas). Este tipo de reprodução causa maior diversidade genética e maior resistência a condições adversas (Chomsky *et al.*, 2009).

Embora existam espécies que sejam gonocóricas, a maioria das anémons é hermafrodita. Desconhece-se a existência de dimorfismo sexual entre as anémons. Mas, as anémons hermafroditas geralmente produzem apenas um tipo de gâmeta, durante os períodos de reprodução sexuada, de forma a evitar a autofecundação (Ruppert & Barnes, 2004; Bocharova & Kozevich, 2011). Ainda assim, a autofecundação tem sido referida como uma das formas de reprodução destes animais (Bocharova & Kozevich, 2011; Santos, 2015). O hermafroditismo é muitas vezes associado com tamanho corporal e a reprodução de anémons jovens (Shick, 1991). Tem sido sugerido que, o hermafroditismo é uma forma de adaptação, para compensar a reduzida probabilidade de uma macho e uma fêmea se encontrarem fisicamente, ou ainda do contacto entre os seus gâmetas (Shick, 1991). O hermafroditismo é frequentemente responsável pela manutenção de associações genotípicas, especificamente adaptadas às condições ambientais de um dado local (Shick, 1991).

Análises histológicas têm revelado que as gónadas das anémons são meros agregados de células germinativas (Ruppert & Barnes, 2004; Bocharova & Kozevich, 2011; Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016). São estruturas temporárias, que formam uma faixa longitudinal entre o filamento septal e o músculo retrator (Ruppert *et al.*, 2004; Hickman *et al.*, 2014, Castro & Huber, 2016), sendo de origem gastrodérmica. A fertilização dos gâmetas pode ocorrer interna ou externamente ao corpo da anémona, consoante a espécie, ou as condições ambientais locais (Bocharova & Kozevich, 2011). A fertilização pode ser interna ou externa. Em ambos os processos o zigoto desenvolve-se até formar uma larva ciliada, a qual se desenvolve num pólipó, depois de encontrar um substrato adequado, num habitat propício (Ruppert & Barnes, 2004; Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016). No caso das anémons que se reproduzem sexuadamente, com fertilização interna, a larva planctónica pode ser libertada do adulto e fica livre no oceano, mas apenas por

um curto espaço de tempo. Depois, pode entrar na cavidade de uma outra anémone e prosseguir com o seu desenvolvimento. A anémone jovem é libertada pela anémone progenitora e prende-se ao substrato (Cecílio, 2012). Os adultos apresentam pólipos juvenis, no interior da sua cavidade gastrovascular, com frequência (Ruppert & Barnes, 2004; Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016).

Tem sido sugerido que a reprodução assexuada envolve menores custos energéticos, na formação de novos indivíduos. Por esse motivo, seria uma melhor opção para recorrer em ambientes mais austeros, embora não haja dados que suportem essa teoria (Shick, 1991). Ainda assim, a reprodução sexuada de anêmonas envolve demasiadas etapas (gametogénese, vitelogénese, libertação de gâmetas, fertilização, crescimento, desenvolvimento, dispersão e metamorfoses), em que cada uma implica a necessidade de condições ambientais específicas, mais rigorosas que as necessárias para a reprodução assexuada (Shick, 1991). A reprodução assexuada providencia meios para uma rápida colonização de um novo habitat (Schlesinger, 2010) e, muitas vezes, é desencadeada por *stress* ambiental (Beneti, 2008). Pode ocorrer por forma gamética – partenogénese (desenvolvimento de novos indivíduos a partir de oócitos não fecundados), ou agamética – propagação através de fissão transversal, fissão longitudinal, laceração pedal e gemiparidade. Também tem como vantagem, o facto de ser uma estratégia de crescimento populacional. A amplificação assexual dos indivíduos aumenta o seu potencial colonizador e diminui as suas probabilidades de extinção, ao aumentar vastamente o tamanho dos indivíduos clonados (e das suas gónadas) (Shick, 1991; Beneti, 2008).

A reprodução assexuada (produção de clones) é difundida e diversa entre os antozoários (Ruppert & Barnes, 2004; Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016). Durante a reprodução assexuada, um novo indivíduo é formado a partir de um fragmento ou parte do corpo de uma anémone (Bocharova & Kozevich, 2011), devido à elevada capacidade de regeneração destes animais. Pode proceder pela via da regeneração epimórfica (regeneração de órgãos perdidos) ou embriogénese somática (com todos os órgãos a desenvolverem-se num novo órgão) (Bocharova & Kozevich, 2011). No último caso, os mesentérios, os tentáculos e a actinofaringe são formados da mesma maneira, que durante o desenvolvimento dos pólipos, resultantes de reprodução sexuada (Bocharova & Kozevich, 2011). Por exemplo, a laceração

pedal consiste na perda de uma porção do disco basal (também designado de disco pedal), enquanto a anêmona se desloca nas rochas. Esse pedaço poderá crescer para formar um novo indivíduo, de dimensões muito reduzidas. É uma forma frequente de reprodução assexuada em anêmonas do andar infralitoral, ao passo que, a fissão longitudinal (Fig. 3) é uma forma de replicação assexuada muito frequente em antozoários do andar mediolitoral (Shick, 1991). A anêmona forma uma pequena fissura na extremidade aboral (disco basal), ou lateralmente na coluna. Esta fissura vai-se estendendo a todo o corpo, sempre paralela ao eixo oral-aboral do animal. A última região a separar-se é o disco oral (Beneti, 2008). A fissão longitudinal (Fig. 3) é, muitas vezes, irregular e pode ser estimulada por mudanças abruptas nas condições ambientais. Em laboratório, a fissão longitudinal pode ser desencadeada por mudanças de água nos aquários, temperatura ou iluminação (Bocharova & Kozevich, 2011). As anêmonas-filha resultantes são indivíduos de grandes dimensões, capazes de realizar todas as funções de um adulto. Alimentam-se durante e logo após o processo, apresentam todas as estruturas desenvolvidas (boca, actinofaringe e cavidade gastrovascular) e apresentam maior eficiência na colonização de novos ambientes (Beneti, 2008).

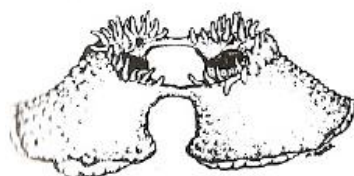


Figura 3 – Ilustração da fissão longitudinal de uma anêmona (Shick, 1991).

Apesar de ser uma das espécies de anêmonas Europeias mais estudada, o conhecimento do modo de reprodução da anêmona *A. equina* é ainda contraditório. Ao longo das costas Britânicas (Carter & Miles, 1989), Japonesa (Yanagi *et al.*, 1999) e Israelita (Chomsky *et al.*, 2009), a anêmona *A. equina* é uma espécie gonocórica. No entanto, existem referências de indivíduos hermafroditas, em outras populações desta espécie (Gadelha *et al.*, 2012; observação pessoal). Outros estudos mencionam populações de *A. equina* que se reproduzem exclusivamente de forma sexuada, como no mar Mediterrâneo (Douek *et al.*, 2002). Recentemente,

descobriram-se evidências de que em Portugal, ocorre reprodução sexuada desta espécie (Pereira *et al.*, 2014). Ainda assim, estudos bioquímicos apontam para a ocorrência de outras formas de reprodução assexuada. Uma das particularidades das anêmonas *A. equina* é o facto de transportarem consigo, no interior da cavidade gastrovascular, vários pólipos juvenis – viviparidade (Carter & Miles, 1989 em Perrin *et al.*, 1999; Yanagi *et al.*, 1999; Gadelha *et al.*, 2012). Estes juvenis são expelidos pela boca da anémoma progenitora, quando perturbada, ou quando os juvenis se encontram aptos a serem formas de vida independentes (Orr *et al.*, 1982; Carter & Miles, 1989; Yanagi *et al.*, 1999; Santos, 2015). Evidências genéticas suportam a teoria de resultarem de uma forma de reprodução assexuada, em que os juvenis são clones da anémoma progenitora (Orr *et al.*, 1982; Carter & Miles, 1989; Yanagi *et al.*, 1999; Santos, 2015). O mesmo ocorre na sua congénere *A. prasina*. Ainda assim, desconhece-se se resultam de gemiparidade, ou partenogénese (embora esta última hipótese seja difícil de explicar em populações exclusivamente gonocóricas, com observação de juvenis no interior de anêmonas de ambos os sexos) (Perrin *et al.*, 1999). Clones com a mesma informação genética não estabelecem competição-intra-específica, com recurso aos *acrorhagi* (Turner *et al.*, 2003). Cedo foi descartada a hipótese de reentrada de larvas plânulas na cavidade gastrovascular da anémoma progenitora, após fecundação e desenvolvimento embrionário no ambiente planctónico, através de pequenas experiências laboratoriais (Carter & Funnel, 1980 em Carter *et al.*, 1982; Orr *et al.*, 1982). No entanto, esta particularidade é ainda descrita para outras espécies de anêmonas, incluindo dentro do género *Actinia*. Mais ainda, é frequente encontrar larvas pré-plânula e plânula, em diferentes estágios de maturação, entre os tentáculos dos adultos; para além de pequenos pólipos juvenis de diferentes tamanhos (Carter & Funnel, 1982 e Chia & Rostron, 1970 em Perrin *et al.*, 1999 e em Carter *et al.*, 1982). Pouco se sabe sobre o sucesso de sobrevivência e dispersão destas larvas, fora da cavidade gastrovascular da anémoma progenitora. Procedimentos experimentais, de produção destes organismos, em cativeiro, revelaram a sua incapacidade de metamorfose e sobrevivência a longo prazo (Chia & Rostron, 1970 em Perrin *et al.*, 1999) Crê-se que aquelas larvas tenham resultado de autofecundação, cuja variedade genética reduzida as torne inadaptadas, para sobreviver a mudanças ambientais austeras, nas fases iniciais da sua existência.

As formas de reprodução em *A. fragacea* são igualmente crípticas, sendo referido os modos já descritos, tanto de reprodução sexuada, como assexuada. A reprodução sexuada pode ser interna (fecundação interna – os óvulos permanecem na cavidade gastrovascular, o esperma é liberto para o exterior) ou externa (fecundação externa – os óvulos e o esperma são libertados para o exterior). É uma espécie gonocórica, ovípara, que matura os seus oócitos durante o Verão, em populações das ilhas Britânicas (Larkman, 1983). Pouco mais se sabe sobre a reprodução desta espécie. Observações particulares apontam para que *A. fragacea* não faça proteção parental de juvenis, na sua cavidade gastrovascular, contrariamente à sua congénere *A. equina* (Perrin *et al.*, 1999; Fish & Fish, 2011).

3. Potencial biotecnológico das anêmonas

As anêmonas são consideradas “maravilhas regenerativas”. A sua habilidade de se dividirem ao meio, durante a reprodução assexuada (fissão longitudinal ou transversal) e regenerarem os seus tecidos de forma eficiente, caracterizam-nas como organismos com potenciais aplicações biotecnológicas, como é o caso de estudos pioneiros relacionados com a perda auditiva (Tang *et al.*, 2016).

Além do mais, as toxinas desenvolvidas pelas anêmonas também têm sido alvo de interesse, exibindo propriedades com possíveis aplicações terapêuticas, tais como: a regulação iónica de sódio e potássio em células neuromusculares (Norton, 1981; Yasunobu *et al.*, 1985; Scanlon *et al.*, 1995; Schweitz *et al.*, 1995); actividade anti-hipertensiva e antiviral (Clare *et al.*, 1989); citolisinas, toxinas com actividade inibidora de proteases de tipo-Kunitz e toxinas com actividade fosfolipase A2 (Frazão *et al.*, 2012). A anémoma *A. equina* reúne potencial aplicação nestas áreas, contendo toxinas citolíticas (equinotoxinas), hemolíticas (Macek & Lebez, 1988) e outras toxinas polipeptídicas, que exercem uma actividade letal em caranguejos (Lin *et al.*, 1996; Honma *et al.*, 2005). Da mesma forma, *A. fragacea* tem produzido resultados semelhantes (Bellomio *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2015).

4. Objectivos

As anémons-do-mar *A. equina* e *A. fragacea* reúnem características relevantes para que possam ser exploradas como espécies ornamentais, ou como potenciais organismos para extracção de compostos bioactivos. Actualmente, existem alguns registos de sucesso de propagação assexuada de anémons em cativeiro. Geralmente, essa propagação é feita por corte longitudinal de espécimes saudáveis, em metades (Olivotto *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2014). No entanto, existem poucos estudos com detalhes suficientes sobre a optimização desta propagação, *e.g.*: determinar o tamanho mínimo com o qual a anémona pode ser propagada com sucesso; a melhor técnica de fixação e os diferentes materiais adequados (Olivotto *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2014); dietas eficazes a fornecer, para obter resultados de rápida regeneração e crescimento dos indivíduos; e as melhores condições ambientais a fornecer aos indivíduos, em cativeiro.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a viabilidade de propagar anémons-do-mar *A. equina* e *A. fragacea*, através de corte longitudinal do corpo das mesma, em duas metades. Procurou avaliar-se a taxa de sobrevivência destas anémons, o tempo que demoram a regenerar e o seu crescimento. Se este processo de obtenção de dois organismos a partir de um só for viável, contribuirá para diminuir o impacto nas populações autóctones, e nos seus ecossistemas. Assim, reduzir-se-ia a necessidade da captura de exemplares naturais de anémons, para aquários ou investigação científica/aplicação biotecnológica. Este processo será passível de ser realizado em cativeiro, com a frequência desejada, para obtenção do número de indivíduos pretendidos, sem necessidade de recolha de espécimes selvagens.

Materiais e métodos

1. Recolha de indivíduos *Actinia equina* e *Actinia fragacea*

As anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina* foram recolhidas manualmente, na Praia do Portinho da Areia Norte (costa central Atlântica de Portugal; Fig. 4), durante os períodos de maré baixa. As anêmonas foram recolhidas de 14 a 20 de Dezembro de 2016 e transportadas para laboratório.



Figura 4 – Localização do local de recolha de espécimes *Actinia fragacea* e *Actinia equina*: Praia do Portinho de Areia Norte (39°22'8,03"N; 009°22'41,82"W), em Peniche (costa central Atlântica de Portugal). Imagem obtida através de *software* Google Earth (versão 4.2.0205.5730 de 13 de Novembro de 2007).

2. Desenho Experimental

2.1. Sistema de suporte de vida para as anêmonas *Actinia equina* e *Actinia fragacea*

Todos os indivíduos recolhidos foram mantidos num sistema de recirculação de água salgada. O sistema consistiu numa estante de PVC, de 3 prateleiras, com 12 aquários

e uma *sump*. Cada prateleira continha 4 aquários de 18 L, com arejamento, iluminados por uma calha LED de 11W. O fotoperíodo foi estabelecido para 12h de luz e 12h de escuridão. Em baixo, encontrava-se disposta a *sump* do sistema, com: filtro mecânico, composto por 2 esponjas de lã de vidro; filtro biológico de anéis de cerâmica Pure Water Bio-ring; 1 filtro ultravioleta EHEIM de 14W (EHEIM GmbH & Co KG, Estugarda, Alemanha); 1 escumador TMC Vecton² 400 (Tropical Marine Centre, Londres, Reino Unido), com bomba SICCE Syncra Silent 1.5 (700 – 1350 L h⁻¹; Pozzoleone, Itália); 1 bomba de circulação EHEIM Compact⁺ 5000 (2500 – 5000 L h⁻¹; EHEIM GmbH & Co KG, Estugarda, Alemanha) e 1 refrigerador Frimar C250 (FRIMAR ® F500, Fernando Ribeiro Lda, Barcarena, Portugal), regulado para 20 °C.

2.2. Preparação dos indivíduos *Actinia equina* e *Actinia fragacea* e aclimação

Em laboratório, as anémons foram individualmente colocadas no topo de pequenas pedras, previamente identificadas e pesadas – o seu novo substrato de adesão. Pois, em acções posteriores, de monitorização das dimensões corporais e biomassa das anémons, optou-se por mantê-las aderidas às pedras. Pretendeu-se, desta forma, minimizar o impacto de perturbação fisiológica dos animais, durante os procedimentos experimentais.

As pedras foram identificadas para cada espécie e numeradas para cada indivíduo (por exemplo: A₁ para o indivíduo nº 1 de *A. fragacea*, que permaneceu intacto, durante todo o procedimento experimental; B_{1/2} para o indivíduo nº 1 de *A. equina*, que foi sujeito a corte longitudinal, indicando a metade nº 2, após o corte). Para determinar o peso das pedras, estas foram colocadas em água salgada, durante 24 horas. Depois, foram secas com papel, para remover o excesso de água, e pesadas numa balança analítica Sartorius TE124S (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha). Repetiu-se esta tarefa 3 vezes, para posteriormente usar o valor médio obtido como valor de referência.

Selecionaram-se 60 indivíduos *A. fragacea* e 60 indivíduos *A. equina*, com dimensões semelhantes entre si. De todos os indivíduos encontrados no local de amostragem, as anêmonas *A. fragacea* apresentavam dimensões aparentemente maiores que as de *A. equina*. Por esse motivo, escolheram-se os espécimes *A. fragacea* mais pequenos, parecidos com as anêmonas *A. equina*.

Colocaram-se 10 anêmonas, em cada aquário do sistema de suporte de vida. As anêmonas *A. equina* foram distribuídas em 6 aquários aleatórios no sistema, sendo que as anêmonas *A. fragacea* foram inseridas nos outros 6. As anêmonas foram mantidas e monitorizadas, durante 1,5 meses, para se aclimatarem, antes de iniciar o ensaio experimental.

2.3. Monitorização e controlo da qualidade da água

Semanalmente, efetuaram-se trocas parciais da água do sistema de suporte de vida, em cerca de metade do seu volume. A monitorização da qualidade da água foi realizada três vezes por semana, sendo a última verificação feita antes da troca parcial de água. Os parâmetros ambientais salinidade, temperatura e oxigénio dissolvido foram medidos com uma sonda multiparamétrica HANNA HI 9828 (HANNA Instruments, Póvoa de Varzim, Portugal). O pH foi avaliado com o medidor VWR Symphony SP70P (VWR International, Inc., Radnor, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Os parâmetros amónia, nitritos e nitratos foram avaliados de forma qualitativa, com testes rápidos API – Aquarium Pharmaceuticals (Mars Fishcare North America, Inc., Chalfont, Pensilvânia, Estados Unidos da América). Um controlo mais preciso foi feito quinzenalmente, com a ajuda de um fotómetro HANNA HI 83203 (HANNA Instruments, Póvoa de Varzim, Portugal). Se os resultados se encontrassem fora dos intervalos considerados normais para o bem-estar animal, efetuava-se uma nova troca parcial de água e executava-se uma nova medição dos parâmetros ambientais, assim como no dia a seguir à mudança de água.

2.4. Alimentação

Durante a aclimação e o ensaio experimental, as anémons foram alimentadas com camarão congelado, sem exosqueleto. Inicialmente, foram alimentadas 3 vezes por semana, sempre à mesma hora, durante o período da manhã. Forneceu-se uma quantidade descongelada correspondente a 4,5 % do peso individual das anémons (Shick, 1991). Se tivessem os tentáculos recolhidos, os animais seriam estimulados com jactos de água, junto ao orifício bucal, através do uso de uma pipeta de Pasteur. No entanto, como muito do alimento era aceite e posteriormente descartado pelas anémons, a frequência de alimentação foi reduzida para as 2 vezes por semana, após o período de aclimação.

2.5. Ensaio experimental

O ensaio experimental iniciou-se a 3 de Fevereiro de 2016 e durou 20 semanas. Todas as anémons foram obrigadas a contraírem-se na sua máxima capacidade, de forma a minimizar as variações de: 1) conteúdo em água no interior da cavidade gastrovascular e 2) forma do corpo destes animais. Depois, cada indivíduo foi seco gentilmente com papel absorvente, para remover o excesso de água. Posteriormente, foram pesados numa balança analítica Sartorius TE124S (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha). Em 3 aquários de cada espécie, mantiveram-se os animais intactos – animais de controlo. Nos restantes, cada indivíduo foi cortado longitudinalmente ao meio, com auxílio de um bisturi – animais de tratamento. A distribuição dos tratamentos, no sistema de suporte de vida, foi feita ao acaso (Fig. 5). Uma das metades de cada anémona foi removida e fixa noutra rocha, devidamente identificada e pesada, à semelhança dos procedimentos anteriores. Depois, todas as anémons foram inseridas nos respectivos aquários e monitorizadas, relativamente à sua sobrevivência, tamanho, massa e regeneração (no caso dos indivíduos seccionados).

O corte das anémons foi executado num dia em que deveria ser fornecido o alimento, para garantir que não se perturbaria o processo de digestão dos animais. A alimentação foi suspensa, durante o período em que as anémons cortadas

mantiveram a cavidade gastrovascular exposta e desprotegida. A alimentação voltou a ser fornecida, a todas as anêmonas, 15 dias depois do corte.

Assim, todas as anêmonas identificadas foram contadas e pesadas mensalmente, de acordo com os procedimentos já descritos. No entanto, passou a medir-se também o diâmetro e a altura das anêmonas, um mês depois do início do ensaio experimental, quando quase todas as anêmonas seccionadas recuperaram a forma cilíndrica normal do seu corpo. O diâmetro do corpo anêmonas foi medido com uma craveira, imediatamente acima do disco basal. A altura foi medida de igual forma, desde o disco basal até ao topo da anêmona. As anêmonas, obtidas por corte longitudinal, foram também monitorizadas quanto: 1) ao tempo que demoraram a unir as extremidades do corte, protegendo a sua cavidade gastrovascular; 2) à quantidade de indivíduos que regeneraram totalmente; e 3) ao tempo que demoraram a consegui-lo, com desaparecimento da cicatriz de corte.

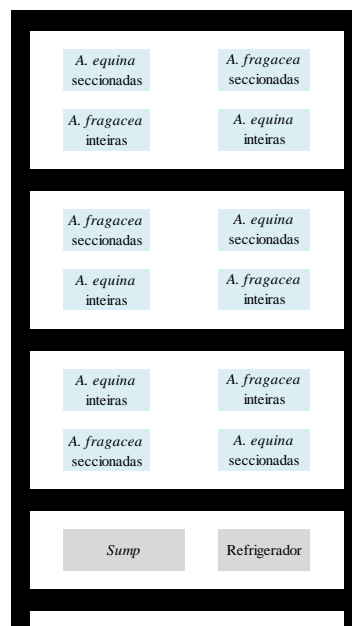


Figura 5 – Representação esquemática do sistema de suporte de vida, com a disposição das diferentes espécies de anêmonas e o tratamento a que foram sujeitas.

3. Análise de dados

Os dados foram processados e apresentados graficamente mediante a utilização do *software* Microsoft Office Excel 2010. Sempre que aplicável, os valores foram apresentados sob a forma de média \pm erro-padrão ($\bar{x} \pm se$).

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* SPSS IBM Statistics 23. Os dados foram analisados relativamente à sua distribuição normal e homogeneidade de variâncias. Se esses pressupostos se cumprissem, realizaram-se testes paramétricos, caso contrário, usaram-se testes não paramétricos (Zar, 1996). Utilizou-se o nível de significância $\alpha = 0,05$.

Testes de Mann-Whitney foram utilizados para comparar: 1) a biomassa inicial das anêmonas *A. fragacea* e *A. equina*, no início do ensaio experimental; 2) o tempo que decorreu desde que se efectuou o corte longitudinal, até ao momento em que as anêmonas conseguiram recuperar a sua forma, unindo as extremidades do corte; e 3) o tempo que os espécimes demoraram a regenerar totalmente, em que se deixou de notar a cicatriz do corte a que foram sujeitos. Os resultados foram apresentados sob a seguinte forma: $U_{\text{número de graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$.

Usou-se o teste ANOVA de 2 fatores para avaliar diferenças entre o tamanho de todas as anêmonas, passado 1 mês de ensaio experimental, em termos de biomassa, diâmetro e altura. Procedeu-se de igual forma, para comparar as diferenças de tamanho das anêmonas entre o início e o final do ensaio experimental. E ainda, para comparar a taxa de conversão alimentar das diferentes anêmonas. Como se consideraram 2 fatores, cada um com 2 níveis [espécie (*A. equina* versus *A. fragacea*) \times tratamento (íntactas versus sujeitas a corte longitudinal)], não se procedeu à execução de testes *post-hoc* de multicomparação, nos casos em que se verificou a existência de diferenças estaticamente significativas. Os resultados foram apresentados como: $F_{\text{graus de liberdade entre os grupos, graus de liberdade dentro dos grupos}} = \text{valor do teste; valor de significância } p$, para cada fator e respetivas interações. Para cada grupo, apresentaram-se os valores sob a forma de média \pm erro-padrão ($\bar{x} \pm se$), IC_{95%} como sendo o Intervalo de Confiança para a média = [limite inferior, limite superior] e o valor de significância p .

Testes ANOVA de medidas repetidas foram utilizados para comparar o tamanho das anêmonas (em termos de biomassa, diâmetro e altura), no início e no final do ensaio experimental. Os resultados foram apresentados de forma semelhante aos de uma ANOVA de 2 fatores. De cada vez que se verificou uma interação significativa entre a duração do ensaio e um ou ambos os fatores, os seus efeitos tiveram de ser interpretados com cautela entre os grupos, a cada nível, a cada factor. Nomeadamente através da comparação do incremento de tamanho, recorrendo ao uso de ANOVA de 2 fatores.

O teste de qui-quadrado de Pearson foi utilizado para comparar a quantidade proporcional de indivíduos que conseguiram cicatrizar até ao final do ensaio experimental. Os resultados foram apresentados como: $\chi^2_{\text{número de graus de liberdade}} = \text{valor do teste, valor de significância } p$.

Procedeu-se ao cálculo da taxa de conversão alimentar, como sendo a quantidade de alimento fornecido aos animais, em cada mês, relativamente ao seu incremento de biomassa:

$$[\text{TCA} = \text{massa de alimento fornecido (g)} / \text{incremento de massa do animal (g)}].$$

Resultados

1. Monitorização e controlo da qualidade da água

Os valores dos parâmetros de qualidade da água mantiveram-se em níveis concordantes com o bem-estar das anêmonas, ao longo da aclimação e do ensaio. Os parâmetros mais preocupantes, que atingiram valores próximos do máximo recomendável, foram: amónia e nitritos. Estes apresentaram valores mais elevados, em momentos anteriores às habituais trocas parciais de água, especialmente quando se registou maior rejeição de alimento, por parte das anêmonas. Posteriormente à troca parcial de água, voltavam a apresentar valores reduzidos.

Tabela I – Variação dos parâmetros de avaliação da qualidade da água (média \pm erro padrão) nos sistemas de suporte de vida das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, no decorrer do período de aclimação e de ensaio experimental: temperatura, salinidade, pH, oxigénio dissolvido, amónia, nitritos e nitratos.

Parâmetro ambiental	Valores ($\bar{x} \pm se$)
Temperatura	20,03 \pm 1,66 °C
Salinidade	31,34 \pm 0,61
pH	8,23 \pm 0,14
Oxigénio dissolvido	77,34 \pm 5,66 %
Amónia	0,65 \pm 0,09 mg L ⁻¹
Nitritos	0,98 \pm 0,77 mg L ⁻¹
Nitratos	3,76 \pm 4,07 mg L ⁻¹

2. Sobrevivência das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*

Ao longo do período de aclimação e de decorrer do ensaio experimental, não se verificou qualquer mortalidade. Todas as anêmonas sobreviveram aos procedimentos experimentais, independentemente da espécie, ou de terem sido sujeitas a corte longitudinal, ou não.

3. Dimensões corporais das anémons *Actinia fragacea* e *Actinia equina*

Apesar do esforço para se selecionar os animais de dimensões semelhantes, as anémons *A. fragacea* foram significativamente maiores que *A. equina* (teste de Mann-Whitney: $U_{118} = 5293,00$, $p < 0,001$). No início do ensaio experimental, as anémons *A. equina* apresentavam $1,98 \pm 0,14$ g ($\bar{x} \pm se$) de biomassa individual. Por sua vez, as anémons *A. fragacea* pesavam $9,81 \pm 0,79$ g ($\bar{x} \pm se$).

Passado 1 mês de ensaio experimental, continuou a verificar-se uma diferença significativa entre a biomassa das duas espécies de anémons (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 164,22$, $p < 0,001$), bem como entre os animais seccionados e os utilizados nos grupos de controlo (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 14,27$, $p < 0,001$), sem que houvesse interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 2,25$, $p > 0,05$) (Fig. 6a). As anémons *A. fragacea* foram maiores que *A. equina*, quer no grupo de controlo ($\bar{x} \pm se = 6,99 \pm 0,76$ g; IC_{95%} [6,14 g, 7,85 g] versus $\bar{x} \pm se = 1,64 \pm 0,17$ g; IC_{95%} [0,79 g, 2,50 g]), quer no grupo experimental em que os animais foram seccionados ($\bar{x} \pm se = 5,02 \pm 0,35$ g; IC_{95%} [4,43 g, 5,63 g]; versus $\bar{x} \pm se = 0,79 \pm 0,06$ g; IC_{95%} [0,19 g, 1,40 g]), sendo que, os animais seccionados representavam cerca de metade da biomassa dos seus pares que permaneceram intactos, em ambas as espécies.

Não houve qualquer efeito significativo do tempo do ensaio na evolução da biomassa das anémons inteiras e nas que foram sujeitas a corte (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 1,72$; $p > 0,05$). Também não houve qualquer interacção significativa entre o decorrer do ensaio, a espécie de anémoma e o tratamento a que foram sujeitas (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 0,13$; $p > 0,05$). No entanto, houve um efeito significativo do tempo do ensaio na biomassa das anémons (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 9,19$; $p < 0,05$), assim como uma interacção significativa entre o tempo do ensaio e a espécie de anémons ($F_{1,176} = 29,76$; $p < 0,05$), o que significa que a variação de biomassa de cada espécie foi distinta. Esta interacção implicou que os seus efeitos tiveram de ser interpretados com cautela entre os grupos, a cada nível, de cada factor. No final do ensaio experimental (Fig. 6b), as anémons *A. fragacea* foram maiores que *A. equina*, quer no grupo de controlo ($\bar{x} \pm se = 5,38 \pm 0,53$ g; IC_{95%} [4,75 g, 6,02 g] versus $\bar{x} \pm se = 1,10 \pm 0,20$ g;

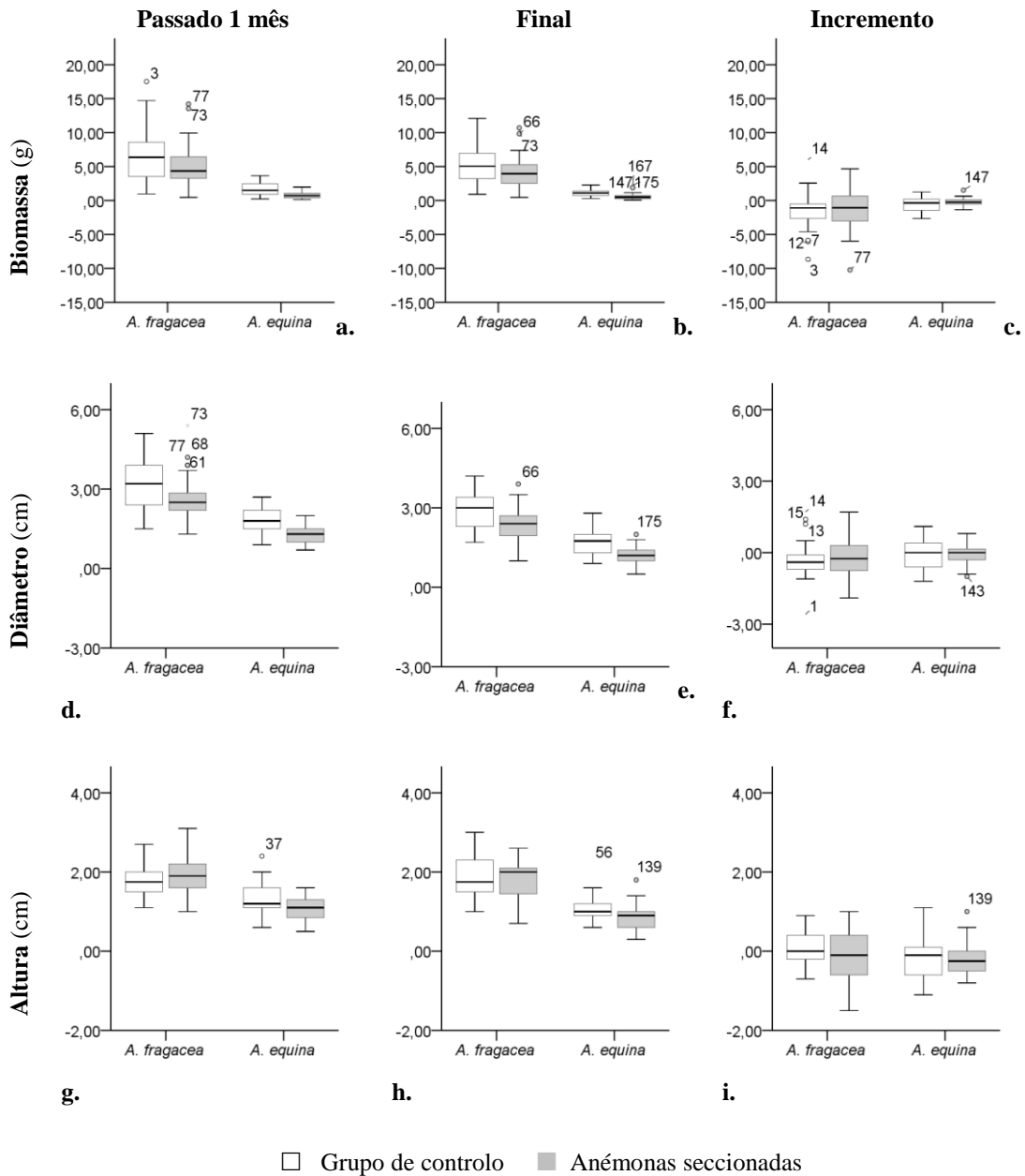


Figura 6 – Biomassa (a-c), diâmetro (d-f) e altura (g-i) das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, intactas e seccionadas, 1 mês após a inflição do corte longitudinal (a,f,g) e no final (b,e,h) do ensaio experimental, assim com os respectivos incrementos (c,f,i). A caixa de *box plot* representa o intervalo interquartil (do limite inferior da caixa - 1º quartil, ao limite superior da caixa - 3º quartil), que contém 50% dos registos; as linhas que se estendem desde os limites superior e inferior da caixa, até aos valores mais altos e mais baixos, representam os valores inferiores a 1,5 vezes o intervalo interquartil; a linha preta, no interior da caixa, indica a mediana. Os círculos são *outliers* - casos com valores de 1,5 a 3 vezes maiores que o intervalo interquartil. Os *extremos* são casos com valores superiores a 3 vezes o intervalo interquartil.

IC_{95%} [0,47 g, 1,74 g]), quer no grupo experimental, em que os animais foram seccionados ($\bar{x} \pm se = 3,94 \pm 0,28$ g; IC_{95%} [3,49 g, 4,39 g] *versus* $\bar{x} \pm se = 0,56 \pm 0,06$ g; IC_{95%} [0,12 g, 1,00 g]). As anémons seccionadas foram significativamente menores que as do grupo de controlo, em ambas as espécies. Assim, houve uma diminuição da biomassa dos indivíduos (Fig. 6c), tendo-se verificado uma diferença estatisticamente significativa entre as duas espécies de anémons (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 9,12$, $p < 0,01$), mas não entre os tratamentos que lhes foram aplicados (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 1,72$, $p > 0,05$), nem interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 0,13$, $p > 0,05$). As anémons *A. fragacea* intactas perderam $1,61 \pm 0,49$ g ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-2,33 g, -0,89 g]), enquanto as seccionadas perderam $1,08 \pm 0,35$ g ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-1,60 g, -0,57 g]). As anémons *A. equina* intactas diminuíram $0,54 \pm 0,20$ g ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-1,26 g, 0,19 g]) e as seccionadas $0,24 \pm 0,07$ g ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,75 g, 0,28 g]). Face a isto, as anémons *A. fragacea* perderam mais biomassa que as anémons *A. equina*, tanto as anémons que permaneceram incólumes, como as que foram seccionadas longitudinalmente em metades. No entanto, a quantidade de biomassa perdida foi semelhante entre os espécimes incólumes e os seccionados, em ambas as espécies.

Relativamente ao diâmetro do corpo das anémons, verificou-se uma diferença significativa entre as duas espécies (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 211,18$, $p < 0,001$), decorrido 1 mês de ensaio experimental, bem como entre os animais seccionados e os utilizados nos grupos de controlo (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 40,68$, $p < 0,001$), sem que houvesse interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 0,20$, $p > 0,05$) (Fig. 6d). As anémons *A. fragacea* foram maiores que *A. equina*, quer no grupo de controlo ($\bar{x} \pm se = 3,24 \pm 0,16$ cm; IC_{95%} [3,02 g, 3,46 cm] *versus* $\bar{x} \pm se = 1,81 \pm 0,08$ g; IC_{95%} [1,60 cm, 2,03 cm]), quer no grupo experimental em que os animais foram seccionados ($\bar{x} \pm se = 2,59 \pm 0,09$ cm; IC_{95%} [2,44 cm, 2,74 cm] *versus* $\bar{x} \pm se = 1,24 \pm 0,04$ cm; IC_{95%} [1,10 cm, 1,40 cm]). Em ambas as espécies, as anémons seccionadas foram significativamente menores que as que permaneceram intactas, (Fig. 6d).

Não se verificaram efeitos significativos do tempo de ensaio no tratamento a que as várias anêmonas foram sujeitas, relativamente à evolução do diâmetro das mesmas (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 0,43$; $p < 0,001$), ou ainda qualquer efeito significativo do tempo entre as duas espécies de anêmonas (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 2,83$; $p > 0,05$). Também não se verificou qualquer interacção significativa entre o tempo, tratamento e espécie de anémoma (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 0,02$; $p > 0,05$). No entanto, o diâmetro de todas as anêmonas foi distinto do início para o final do ensaio experimental (ANOVA de medidas repetidas: $F_{1,176} = 15,89$; $p > 0,001$). Quando este terminou (Fig. 6e), as anêmonas *A. fragacea* foram maiores que *A. equina*, quer no grupo de controlo ($\bar{x} \pm se = 2,91 \pm 0,13$ cm; IC_{95%} [2,72 cm, 3,10 cm] versus $\bar{x} \pm se = 1,67 \pm 0,08$ cm; IC_{95%} [1,48 cm, 1,86 cm]), quer no grupo experimental em que os animais foram seccionados ($\bar{x} \pm se = 2,34 \pm 0,08$ cm; IC_{95%} [3,32 cm, 3,47 cm] versus $\bar{x} \pm se = 1,16 \pm 0,06$ cm; IC_{95%} [1,02 cm, 1,29 cm]). As anêmonas seccionadas foram significativamente menores que as do grupo de controlo, em ambas as espécies (Fig. 6e). De acordo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies de anêmonas (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 2,83$, $p > 0,05$), tratamentos (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 0,43$, $p > 0,05$), nem interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 0,02$, $p > 0,05$), relativamente ao seu crescimento, em termos do diâmetro do disco basal (Fig. 6f). As anêmonas *A. fragacea* intactas perderam $0,33 \pm 0,15$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,56 cm, -0,10 cm]), enquanto as seccionadas perderam $0,25 \pm 0,10$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,41 cm, -0,08 cm]). As anêmonas *A. equina* intactas diminuíram $0,14 \pm 0,11$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,38 cm, 0,09 cm]) e as seccionadas $0,09 \pm 0,05$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,26 cm, 0,07 cm]).

Um mês após o início do ensaio experimental, não se verificaram diferenças significativas entre altura do corpo dos animais seccionados e dos utilizados nos grupos de controlo (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 1,04$, $p > 0,05$). No entanto, houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies de anêmonas (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 115,39$, $p < 0,001$), assim com uma interacção significativa entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 9,50$, $p < 0,01$) (Fig. 6g). As anêmonas *A. fragacea* foram mais altas que *A. equina*, quer no grupo de controlo ($\bar{x} \pm se = 1,79 \pm 0,07$ cm; IC_{95%} [1,65 g, 1,93 cm] versus

$\bar{x} \pm se = 1,32 \pm 0,07$ g; IC_{95%} [1,18 cm, 1,46 cm]), quer no grupo experimental em que os animais foram seccionados ($\bar{x} \pm se = 1,92 \pm 0,06$ cm; IC_{95%} [1,82 cm, 2,02 cm] *versus* $\bar{x} \pm se = 1,07 \pm 0,04$ cm; IC_{95%} [0,97 cm, 1,17 cm]).

Inexistiram efeitos significativos do tempo de ensaio na evolução da altura das várias anémons e o tratamento a que as mesmas foram sujeitas, ($F_{1,176} = 1,55$; $p > 0,05$), ou ainda qualquer interacção significativa entre o tempo, tratamento e espécie de anémona ($F_{1,176} = 1,61$; $p > 0,05$). No entanto, houve um efeito significativo do tempo do ensaio na altura das anémons ($F_{1,176} = 7,72$; $p < 0,05$), assim como uma interacção significativa entre o tempo e a espécie de anémons ($F_{1,176} = 6,15$; $p < 0,05$), o que significou que a variação da altura de cada espécie foi distinta. Esta interacção obrigou a uma interpretação cuidada dos seus efeitos entre os grupos, a cada nível, de cada factor. Consequentemente, analisou-se o crescimento das anémons, com base na sua altura do corpo. Este apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies de anémons (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 6,15$, $p < 0,05$), mas não entre os dois tratamentos (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 1,55$, $p > 0,05$), nem interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,176} = 1,61$, $p > 0,05$). As anémons *A. fragacea* intactas aumentaram $0,09 \pm 0,08$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,09 cm, 0,27 cm]), enquanto as seccionadas perderam $0,11 \pm 0,08$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,24 cm, -0,02 cm]). As anémons *A. equina* intactas diminuíram $0,21 \pm 0,09$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,38 cm, 0,09 cm]) e as seccionadas $0,21 \pm 0,04$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,26 cm, 0,07 cm]).

4. Recuperação das anémons *Actinia fragacea* e *Actinia equina*

No que toca ao tempo que decorreu, desde o momento em que se infligiu o corte longitudinal às anémons, até ao momento em que as extremidades resultantes do mesmo se uniram (Fig. 7a.), existiram diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies (teste de Mann-Whitney: $U_{118} = 4385,00$, $p < 0,001$). As anémons *A. equina* conseguiram quase todas restabelecer a sua cavidade gastrovascular em $41,75 \pm 2,45$ dias ($\bar{x} \pm se$). Foram mais rápidas, a enrolar e a fechar a zona de corte, que as anémons *A. fragacea* ($\bar{x} \pm se = 54,5 \pm 2,23$ dias).

Relativamente aos indivíduos que conseguiram regenerar totalmente (Fig. 7b), com o desaparecimento da cicatriz do corte longitudinal, existiram diferenças estatisticamente significativas entre espécies (teste de qui-quadrado de Pearson: $\chi^2_1 = 5,79$, $p < 0,05$). As anémons *A. equina* conseguiram quase todas regenerar (90,00 %), ao passo que apenas (71,70%) das anémons *A. fragacea* conseguiram eliminar a sua cicatriz de corte, durante o período de ensaio experimental.

Em relação ao tempo que os espécimes demoraram a regenerar totalmente (Fig. 7c), existiram diferenças estatisticamente significativas entre espécies (teste de Mann-Whitney: $U_{95} = 2580,00$, $p < 0,001$). As anémons *A. equina* conseguiram quase todas regenerar em $98,89 \pm 1,01$ dias ($\bar{x} \pm se$), tendo sido mais rápidas que as anémons *A. fragacea* ($\bar{x} \pm se = 105,00 \pm 0,00$ dias). O primeiro indivíduo *A. equina* a conseguir regenerar inteiramente foi observado ao 75º dia, ao passo que o primeiro indivíduo *A. fragacea* sem cicatriz foi detectado ao 90º dia.

5. Taxa de conversão (TCA) das anémons *Actinia fragacea* e *Actinia equina*

No que respeita à taxa de conversão alimentar (Fig. 8), não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies de anémons (ANOVA de 2 factores: $F_{1,16} \approx 0,00$, $p > 0,05$), nem entre os dois tratamentos (ANOVA de 2 factores: $F_{1,16} \approx 0,00$, $p > 0,05$), nem sequer interacção entre ambos os factores (ANOVA de 2 factores: $F_{1,16} = 1,76$, $p > 0,05$). As anémons *A. fragacea* intactas foram as únicas que demonstraram taxas de conversão alimentar positivas, apesar de os indivíduos apresentarem disparidade de valores ($\bar{x} \pm se = 7,27 \pm 7,88$; IC_{95%} [-1,29, 38,76]). As anémons *A. fragacea* seccionadas tiveram taxas de conversão de $-0,10 \pm 0,20$ ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,66, 0,52]), ao passo que nas anémons *A. equina* intactas foi de $-0,15 \pm 0,17$ ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,78, 0,24]) e nas seccionadas $0,21 \pm 0,06$ cm ($\bar{x} \pm se$; IC_{95%} [-0,37, -0,07]).

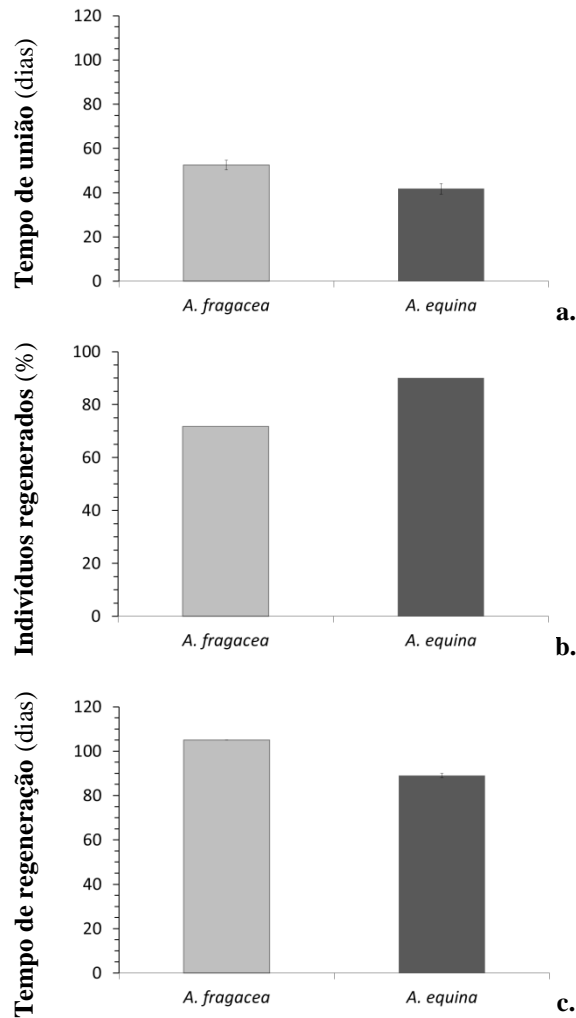


Figura 7 – Caracterização da regeneração das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, sujeitas a corte longitudinal, ao longo do ensaio experimental: **a.** tempo que demoraram a unir as extremidades do corte, protegendo a sua cavidade gastrovascular; **b.** frequência relativa de indivíduos que regeneraram totalmente; **c.** tempo que os indivíduos demoraram a regenerar inteiramente, com desaparecimento da cicatriz de corte.

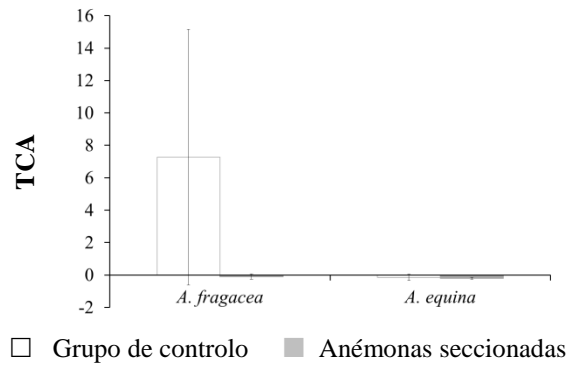


Figura 8 – Taxa de conversão alimentar (TCA; $\bar{x} \pm se$), por mês, das anêmonas *Actinia fragacea* e *Actinia equina*, seccionadas e intactas, durante o ensaio experimental.

Discussão

Todas as anêmonas sobreviveram ao período de aclimação e ao ensaio experimental, mesmo aquelas que sofreram um corte longitudinal do seu corpo em metades. Este resultado superou a taxa de sobrevivência de anêmonas *Entacmaea quadricolor* (Leuckart em Rüppell & Leuckart, 1828) – uma espécie comumente comercializada, quando sujeitas a procedimentos semelhantes (Scott *et al.*, 2014). Isto foi indicativo de que as anêmonas *A. fragacea* e *A. equina* são passíveis de adaptação a condições em cativeiro, seja para fins de investigação científica, ou mesmo para aquarioria ornamental. Mais ainda, demonstrou-se ser possível replicar o número de organismos, em condições controladas, através de reprodução assexuada, induzida por fragmentação dos indivíduos e regeneração dos mesmos. As anêmonas *A. equina* conseguiram quase todas restabelecer a sua cavidade gastrovascular em cerca 42 dias, ao passo que as anêmonas *A. fragacea* necessitaram de 55 dias. Os resultados destas últimas foram semelhantes aos de *E. quadricolor* (Scott *et al.*, 2014). Da mesma forma, 90 % das anêmonas *A. equina* conseguiram regenerar totalmente, em aproximadamente 99 dias. No entanto, somente 72 % das anêmonas *A. fragacea* conseguiram eliminar a sua cicatriz de corte, durante o período de ensaio experimental, demorando cerca de 105 dias. Estes valores poderão ser relativamente longos, para uma viabilidade económica do cultivo destes organismos, com vista à sua comercialização. Todavia, existem muitas variáveis relacionadas com os procedimentos, que necessitarão de futura investigação científica, com vista à otimização do processo.

Independentemente de as anêmonas *A. fragacea* terem sido inicialmente maiores que as anêmonas *A. equina* (em biomassa, diâmetro e altura), ambas as espécies evidenciaram comportamentos semelhantes ao longo do ensaio experimental. Ao serem seccionadas longitudinalmente em metades, as anêmonas tornaram-se significativamente menores que as do grupo de controlo, quer em termos de biomassa, quer em diâmetro. No entanto, a altura das mesmas permaneceu inalterada, pelo facto de este parâmetro não ter sido afetado pelo tipo de corte executado (longitudinalmente, no sentido oral-aboral).

No final do ensaio experimental, todas as anêmonas tinham diminuído de tamanho, em termos de biomassa, diâmetro e altura do corpo. A redução das dimensões corporais ocorreu tanto nas que permaneceram intactas, como nas que foram longitudinalmente seccionadas ao meio, de modo semelhante. As únicas exceções constaram nos factos de: os indivíduos *A. fragacea* terem perdido mais biomassa que as anêmonas *A. equina*, sem distinção entre organismos inteiros ou seccionados; e de as anêmonas *A. fragacea*, que permaneceram incólumes, terem sido as únicas que apresentaram um pequeno aumento da altura do corpo, ainda que com grande discrepância entre os vários indivíduos. As grandes variações de resultados, entre indivíduos do mesmo grupo experimental, puderam ter resultado da dificuldade em obter medições precisas e exatas em cnidários, sem recorrer a métodos destrutivos. As anêmonas são invertebrados de corpo mole, capazes de armazenar quantidades significativas de água nos seus tecidos e na sua cavidade gastrovascular, para além da capacidade de alterarem a sua forma corporal. Como uma possível defesa contra o risco de dessecação, a coluna de alguns indivíduos pode contrair-se, quando expostos ao ar e à radiação solar (Del Matto, 2016), podendo levar a uma pequena perda de biomassa aparente. O diâmetro do disco basal é apontado como a medida mais fidedigna (Leal *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2014), embora a biomassa e a altura do corpo tenham seguido a mesma tendência, no presente trabalho.

Inicialmente, poder-se-ia especular que as anêmonas seccionadas teriam diminuído de tamanho, em consequência de um desvio das suas reservas e prioridades energéticas para a sua regeneração- Ou ainda, sobre o modo de aplicação do corte longitudinal (*e.g.*: sem anestesia, ou com pressão exagerada por parte do operador...). Um maneiio menos cuidado poderia causar maior dano às estruturas internas (tais como: células da cavidade gastrointestinal, mesentérios, músculos e septos...) e, conseqüentemente, retardado a regeneração dos indivíduos e prejudicado o seu crescimento. No entanto, a diminuição de tamanho verificou-se de igual modo nos indivíduos deixados incólumes. Assim sendo, não se poderá descurar a possibilidade das condições ambientais do sistema de suporte de vida (hidrodinamismo, qualidade da água, fotoperíodo), e da alimentação fornecida (tipo de alimento, quantidade e frequência), poderem ter sido diferentes do que seria ideal.

As anêmonas são geralmente omnívoros oportunistas e generalistas (Shick 1991; Van-Praët 1985; Davenport *et al.*, 2011), embora algumas espécies exibam modo de alimentação por predação ou filtração (Perrin *et al.*, 1999). Muitos destes animais têm tentáculos curtos (como nos casos de *A. fragacea* e *A. equina*) e são incapazes de procurar ativamente uma presa. São organismos sésseis que conseguem deslocar-se, muito lentamente (Chomsky *et al.*, 2004 a,b). Ainda assim, algumas espécies são capazes de soltar-se e nadar curtas distâncias, graças à contração do corpo (Briffa *et al.*, 2011; Davenport *et al.*, 2011). As anêmonas baseiam a sua sobrevivência nas capacidades dos seus tentáculos e das suas toxinas. Alimentam-se de organismos ou detritos orgânicos, que toquem nos seus tentáculos ou caiam nos discos orais. Estes chegam até elas, através de vários mecanismos hidrodinâmicos (como marés, correntes, ondas...) Numa situação de baixo hidrodinamismo, as anêmonas dependem da deposição gravitacional de partículas flutuantes e do contacto com presas móveis. O aumento do fluxo da água é um estímulo eficaz, pois aumenta a probabilidade de contacto com alimentos viáveis. Em resposta, as anêmonas expõem os recetores nos seus tentáculos para as presas disponíveis. Desta forma, as correntes de recirculação de água no sistema de suporte de vida, em que se mantiveram as anêmonas *A. fragacea* e *A. equina*, poderão ter sido insuficientes para que aquelas se alimentassem corretamente. Foi frequentemente necessário estimular as anêmonas, com uma pipeta de Pasteur, para que estas aceitassem o alimento. No entanto, o estímulo poderá ter sido insuficiente para que completassem a digestão e/ou efetuassem uma absorção eficiente de nutrientes.

Por outro lado, um hidrodinamismo excessivo é capaz de causar *stress* fisiológico, podendo mesmo soltar os organismos do seu substrato. A circulação de água excessiva poderá danificar os tentáculos das anêmonas e/ou activar os seus cnidócitos (células especializadas no ataque a predadores e na captura de presas), através do contacto entre tentáculos de anêmonas vizinhas, destes com as paredes dos aquários do sistema de suporte de vida e/ou mesmo objetos em suspensão na água. Os cnidócitos possuem uma cápsula urticante (nematocisto), na qual se encontra um filamento que é disparado contra o organismo-alvo, injetando um líquido com toxinas. Depois de ativos, os cnidócitos expulsam o nematocisto, tendo de o regenerar inteiramente de novo. Por este motivo, as células dos tentáculos

apresentam uma elevada concentração de mitocôndrias, relacionada com uma alta requisição de energia, para síntese de novos nematocistos, bem como para o crescimento contínuo e movimentos celulares característicos dos tentáculos (Shick, 1991; Hickman *et al.*, 2014, Castro & Huber, 2016). Se as condições de cultivo intensificarem o uso de cnidócitos e danos causados aos tentáculos, a energia destinada ao crescimento somático destes organismos poderá ser divergida para a regeneração dos mesmos.

As anêmonas recorrem à produção de muco para: 1) evitar perdas de água, quando expostas ao ar e à radiação solar no andar mediolitoral; 2) reduzir o atrito com outros objectos arremessados pelas correntes de água, evitando lesões do corpo; 3) dificultar o serem arrancadas ou mordidas por predadores e 4) em resposta a condições adversas da qualidade da água (Amado, 2006). Este confere-lhes uma espécie de proteção (Scremin, 2012). Curiosamente, as anêmonas *A. fragacea* não produzem muco quando expostas ao ar, mas apenas quando sujeitas a radiação solar directa (Vidolin, 2007). A ocasional produção excessiva de muco, em resposta a dejetos ou alimento rejeitado por outras anêmonas, arremessados pela circulação de água, ou à deterioração da qualidade da água, e ainda ao maneo, poderá ter sido igualmente responsável pela divergência da energia necessária ao crescimento das anêmonas.

Relativamente à qualidade da água do sistema de cultivo das anêmonas *A. fragacea* e *A. equina*, verificou-se que a amónia e nitritos foram os parâmetros que apresentaram valores mais preocupantes. O aumento da concentração de amónia pode causar danos graves, pois dificulta a excreção da mesma pelos organismos, afetando seriamente a sua fisiologia. Consequentemente, pode provocar a redução ou paralisação da atividade alimentar das anêmonas, a fim de reduzir a produção de amónia metabólica. Por isso, pode contribuir para a redução do crescimento das anêmonas, além de bloquear o processo de fosforilação oxidativa ao nível celular, causando incapacidade de converter a energia alimentar em ATP (Gazzola, 2003). No que respeita a nitritos, a sua toxicidade em peixes é razoavelmente conhecida. Tal como, o comprometimento do transporte de oxigénio no sangue (uma vez que os nitritos oxidam a hemoglobina em metahemoglobina), mas também a disrupção de múltiplas outras funções fisiológicas, incluindo processos iónicos, respiratórios, cardiovasculares, endócrinos e excretorios (Kroupova *et al.*, 2005). Apesar disso, o

número de invertebrados investigados quanto à toxicidade de nitritos é bastante reduzido (Alonso & Camargo, 2006). Remonta apenas a espécies para as quais existe uma indústria de Aquacultura significativa, maioritariamente camarões (Mallassen & Valenti, 2006). Nestes animais, os nitritos causam atrasos no desenvolvimento larvar, da taxa de crescimento e aumento da mortalidade, ou ainda em organismos com potencial de produção aquícola, como ouriços-do-mar (Siikavuopio *et al.*, 2004). Apesar de não evidenciarem aumentos de mortalidade ou de consumo de alimento, estes invertebrados apresentam uma redução do desenvolvimento gonadal, em sequência de uma taxa de conversão alimentar menos eficaz. Face ao exposto, não se poderá excluir que, as situações em que ocorreu o aumento das concentrações de amónia e nitrito no sistema de cultivo das anêmonas *A. fragacea* e *A. equina*, ainda que esporádicas, tenham contribuído para retardar a sua regeneração e impedido o seu crescimento. Inclusivamente, as várias situações em que houve rejeição do alimento fornecido, poderão ter contribuído para o aumento da concentração daqueles elementos, e vice-versa, bem como algum problema relacionado com os filtros biológicos (Martinez *et al.*, 2006). No que respeita à temperatura, o crescimento de anêmonas *A. equina* ocorre entre os 15 - 20 °C, em Israel (Chomsky *et al.*, 2004b). Em laboratório, determinou-se que a temperatura ideal seria entre 18,7 - 19,9 °C (Chomsky *et al.*, 2004b, 2009). Embora as anêmonas consigam aclimatar-se, conforme a temperatura do ambiente em redor, a quantidade de comida ingerida por anêmonas é máxima a ≈ 20 °C (Shick, 1991). Acima ou abaixo deste intervalo, a taxa de crescimento diminui; podendo mesmo ocorrer perda de biomassa a temperaturas extremas, com redução das dimensões corporais (Chomsky *et al.*, 2004b). Tal, dever-se-á à incapacidade destes organismos conseguirem equilibrar os seus requisitos metabólicos, com a ingestão de alimento (“input” energético). Tanto a taxa de crescimento individual, como a quantidade de alimento ingerida diminuem, a temperaturas fora daquele intervalo (Ivleva, 1964; Chomsky *et al.*, 2004a).

Estudos mais recentes apontam que a dieta destes organismos depende da sua localização. Mexilhões juvenis, de concha partida, predominam no conteúdo da cavidade gastrovascular de *A. equina*, em costas de elevado hidrodinamismo. Em zonas costeiras protegidas, mais próximas do andar supralitoral, a dieta das anêmonas é dominada por insectos. Mas, em geral, moluscos, crustáceos e insetos

são encontrados inteiros, se forem de pequenas dimensões. Todavia, bivalves com conchas incólumes são excretados ainda vivos, pois a concha protege-os das enzimas hidrolíticas das anêmonas (Davenport *et al.*, 2011). Presas de maiores dimensões são encontradas em formas fragmentadas, sendo que o tamanho corporal da anêmona é um fator limitante à seleção do tamanho da presa a ingerir (Davenport *et al.*, 2011). De forma geral, os estudos de dietas alimentares de anêmonas *Actinia* apontam que estes organismos se alimentem de macroinvertebrados como: nemátodes, briozoários, moluscos (bivalves, gastrópodes e quítones), crustáceos (isópodes e anfípodes) e insectos (Kruger & Griffiths, 1995; Davenport *et al.*, 2011). Fragmentos de macroalgas também são comuns no conteúdo da sua cavidade gastrovascular de *A. equina*, não sendo ainda conhecido que estas anêmonas tenham mecanismos enzimáticos para os digerir (Shick, 1991; Chomsky *et al.*, 2004a). No entanto, não se encontram referências quanto ao tipo de organismos planctônicos dos quais as anêmonas se alimentam. Provavelmente, em virtude de serem organismos muito pequenos, que sejam facilmente hidrolisados pelas enzimas digestivas das anêmonas e, virtualmente, indetectáveis. Ainda assim, Chomsky *et al.* (2004a) usaram artémia para alimentar *A. equina ad libitum*. Estes autores registaram um crescimento positivo, em termos de biomassa e diâmetro do disco basal, no regime alimentar de maior frequência de alimentação que experimentaram (2 vezes por semana). Estes autores provaram que frequência é relevante para o crescimento destas anêmonas. No presente estudo, as anêmonas foram alimentadas com camarão descongelado, sem exosqueleto, representando 4,5% gda massa corporal de cada indivíduo, 3 vezes por semana. No entanto, durante o período de aclimação foi frequente as anêmonas rejeitarem o alimento. Posteriormente, reduziu-se a frequência de alimentação para 2 vezes por semana, que resultou na diminuição da ocorrência de rejeição. Esta quantidade de alimento poderá ter sido insuficiente para o bem-estar das anêmonas. Contudo, a frequência de alimentação poderá não ter sido o único motivo para a recusa de alimento. Outra hipótese passível de ser formulada para uma diminuição do tamanho das anêmonas, relacionada com a alimentação, prende-se com a textura do camarão. Neste caso, os músculos da parte abdominal do camarão, fornecido aos indivíduos, poderiam ser demasiados fibrosos, para uma digestão eficaz. Se a digestão do camarão for demorada, os produtos de egestão e o alimento ainda por digerir acabam por misturar-se na cavidade gastrovascular. As anêmonas serão

obrigadas a expelir o seu conteúdo, para evitar a toxicidade de metabolitos, sem obter os nutrientes necessários, visto terem um sistema digestivo incompleto. Para além do mais, estes organismos poderão ter necessidades nutricionais relacionadas com variedade de presas ingeridas, pelo que a dieta fornecida terá ter sido deficiente, em termos nutricionais, para que ocorresse crescimento. Curiosamente, a fissão longitudinal é um mecanismo para reduzir a massa corporal individual e, conseqüentemente, o requerimento de energia, quando a disponibilidade de alimento decresce. Mas tal ocorre apenas, quando é assegurado que as duas anêmonas resultantes não reduzem para um tamanho incapaz de capturar pequenas presas. O pequeno tamanho destes animais pode representar um crescimento adaptativo, destinado a otimizar o tamanho corporal para maximizar a captura das presas e a eficiente obtenção de nutrientes. Assim sendo, os excedentes de energia poderão ser direccionados para a produção gonadal, propágulos assexuais, ou ambos (Shick, 1991). Porém, este fenómeno não ocorreu no presente estudo, como possível resposta à alimentação inadequada, nem mesmo entre os indivíduos incólumes (usados como controlo).

Diferenças genéticas e ecológicas, entre as duas espécies de anêmonas, talvez estejam na origem das diferenças entre o crescimento e a regeneração de *A. fragacea* e *A. equina*. O tamanho avantajado de *A. fragacea* em relação a *A. equina* pode resultar de um maior investimento das reservas energéticas no crescimento somático. Pois desconhece-se que a anêmona *A. fragacea* faça proteção parental de juvenis, na sua cavidade gastrovascular, contrariamente à sua congénere *A. equina* (Perrin *et al.*, 1999; Fish & Fish, 2011). Anêmonas *A. equina* com diâmetro do disco basal > 1,5 cm são consideradas como adultos, com base na observação da libertação de juvenis, a partir do seu interior. Todavia, desconhece-se o tempo que demoram a atingir essas dimensões (Dalyell, 1848 e M'Bain, 1878 em Chomsky *et al.*, 2004b), apesar de se ter estimado a longevidade ecológica de *A. equina* em aproximadamente 3 anos (Briffa *et al.*, 2011). A contração do corpo da anêmona diminui a área de superfície em relação ao volume do animal. Esta reação conduz a uma redução da pressão parcial de oxigénio nos tecidos animais, relativamente à água do ambiente marinho em redor, especialmente em anêmonas maiores (Shick, 1991). A regeneração mais demorada das anêmonas *A. fragacea*, relativamente a

A. equina, poderá ter estado também relacionada com este mecanismo. Como anêmonas de maiores dimensões, a diminuição da pressão parcial de oxigénio nos tecidos de *A. fragacea* terá sido maior, prejudicando o funcionamento fisiológico destes animais, inclusivamente a sua recuperação e regeneração.

A taxa de conversão alimentar é uma forma de medir a eficiência de conversão do consumo de alimento, em peso vivo de um organismo. Pequenas alterações, na taxa de conversão, exercerão um impacto substancial nas margens financeiras de uma produção aquícola. Resolver ou evitar problemas de taxa de conversão alimentar exige bons planeamento e maneo. No presente trabalho, face à perda de biomassa das anêmonas, sujeitas ao ensaio experimental, a taxa de conversão alimentar foi negativa (com excepção de anêmonas *A. fragacea* que permaneceram intocadas). Este resultado reforçou a necessidade de, futuramente, se investigar a melhor forma de nutrir e estimular o crescimento de anêmonas, com vista à sua produção para fins comerciais.

Conclusão

As anémonas-do-mar *A. fragacea* e *A. equina* reúnem características relevantes para que possam ser exploradas como espécies ornamentais, ou mesmo como organismos para fins de investigação científica. A metodologia, de dividir os indivíduos longitudinalmente ao meio, emprega procedimentos de baixa exigência tecnológica e, conseqüentemente, implica baixos custos económicos. O processo em si, permite igualmente obter indivíduos genotipicamente semelhantes, ao longo de todo o ano. Apesar dos danos infligidos às anémonas, estas não sofrem dor, devido à inexistência de um sistema nervoso desenvolvido. Possuem apenas aglomerados de neurónios sensoriais, como estruturas essenciais de uma rede difusa, sem uma unidade central de processamento de informação (Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016). As anémonas *A. fragacea* e *A. equina* conseguiram regenerar-se, sem que ocorresse qualquer mortalidade. No entanto, o facto de terem diminuído de tamanho, ao longo do procedimento experimental, evidencia a necessidade de futuramente se investigar: 1) quais as melhores condições ambientais a fornecer a estes organismos, em cativeiro; e 2) qual a melhor dieta, que lhes permita regenerar e crescer, o mais rápido possível.

Perspectivas futuras

A partir do presente estudo, pode sugerir-se que são necessários estudos histológicos e genéticos, que possam esclarecer um pouco mais da história da biologia reprodutiva destes organismos, bem como da sua dinâmica populacional. São necessárias certas cautelas (como estudar melhor a dinâmica e estrutura populacional, biologia reprodutiva e outros fatores inerentes ao desenvolvimento das técnicas de cultivo), antes de se passar a produzir efetivamente as anêmonas.

No que toca à viabilidade económica, seria igualmente imperativo conseguir determinar: qual o tipo de condições ambientais e o tipo de alimento, que proporcionassem uma regeneração e crescimento rápidos destas espécies. Estudos futuros poderiam testar a existência de conflitos, entre o investimento de energia na defesa contra a dessecação e outras funções vitais das anêmonas (Del Matto, 2016).

Mais estudos sobre as neurotoxinas das anêmonas como ferramentas para o estudo de: 1) fisiologia de canais de potássio; 2) purificação e caracterização da fracção neurotóxica das mesmas; 3) funções analgésicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes; 4) ensaios toxicológicos; 5) regeneração celular, podem ser úteis para aumentar a vasta gama de aplicações úteis que anêmonas-do-mar têm a oferecer, ajudando na desmitificação de que só são úteis para decoração de aquários.

Referências bibliográficas

- AGER, O.E.D. (2008); *Actinia equina* Beadlet anemone; In Tyler-Walters H. and Hiscock K. (eds) Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews, [on-line]; Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom; disponível em: <http://www.marlin.ac.uk/species/detail/1561>.
- AHMADJIAN, V. & Paracer, S. (1986); *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*; London: University Press of New England.
- ALONSO, A., Camargo J. (2006); Toxicity of nitrite to three species of freshwater invertebrates; *Environmental Toxicology* 21 (1), pp. 90-94.
- AMADO, E.M. (2006); Adaptação de anêmonas do mar a variação de salinidade – evidências de mecanismos regulatórios; Dissertação (Biologia Celular), Universidade Federal do Panamá, Curitiba, Brasil.
- BELLOMIO, A., Morante K., Barlic A., Gutiérrez-Aguirre I., Viguera A.R. & González-Mañás J.M. (2009); Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*; *Toxicon* 54: pp. 869–880.
- BENETI, J.S. (2008); Estudo em Laboratório do Comportamento e Reprodução da Anêmona-do-mar *Diadumene* sp. (Cnidaria, Anthozoa Diadumenidae) do Rio Iiberê, Paranaguá, Paraná; Universidade Federal do Paraná, Curitiba (Brasil).
- BOCHAROVA, E.S. & Kozevich I.A. (2011); Modes of Reproduction in Sea Anemones (Cnidaria, Anthozoa); *Zoologicheskii Zhurnal*, No. 11, pp. 1283–1295.
- BRIFFA, M. & Greenaway J. (2011); High *in situ* repeatability of behavior indicates animal personality in the bread let anemone *Actinia equina* (Cnidaria); *PLoS One*, 6 (7).
- CARTER, M.A. & Thorpe J.P. (1981); Reproductive, genetic and ecological evidence that *Actinia equina* var. *mesembryanthemum* and var. *fragacea* are not conspecific; *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 61: pp. 79-93.
- CASTRO, P. & Huber M.E. (2016); *Marine Biology – Seventh Edition*; Mc-Graw Hills Higher Education, New York, U.S.A.
- CECÍLIO, Tânia Maria Pais (2012); Guia de Identificação Invertebrados Marinhos da Baía de Buarcos; Dissertação (Mestrado em Biologia) – Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade de Coimbra, Coimbra (Portugal).
- CHOMSKY, O., Kamenir Y., Hyams M., Dubinsky Z. & Chadwick-Furman N.E. (2004a); Effects of feeding regime on growth rate in the Mediterranean Sea anemone *Actinia equina* (Linnaeus); *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299, pp. 217-229.
- CHOMSKY, O., Kamenir Y., Hyams M., Dubinsky Z. & Chadwick-Furman N.E. (2004b); Effects of temperature on growth rate and body size in the Mediterranean Sea anemone *Actinia equina*; *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313, pp. 63– 7.
- CHOMSKY, O., Douek J., Chadwick N.E., Dubinsky J. & Rinkevich B. (2009); Biological and population-genetic aspects of the sea anemone *Actinia equina* (Cnidaria: Anthozoa) along the Mediterranean coast of Israel; *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 375, pp. 16–20.

- 📖 CLORE, G.M., Driscoll P.C., Gronenborn A.M. & Beress L. (1989); Determination of the three-dimensional solution structure of the antihypertensive and antiviral protein BDS-I from the sea anemone *Anemonia sulcata*: a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing; *Biochemistry*. 28 (5): pp. 2188–2198. doi:10.1021/bi00431a033. PMID 2566326.
- 📖 DAVENPORT, J., Moloney T.V. & Kelly J. (2011); Common sea anemones *Actinia equina* are predominantly sessile intertidal scavengers; Vol. 30, pp. 147-155; School of Biological, Earth & Environmental Sciences, University College Cork, Distillery Fields, North Mall, Cork, Ireland.
- 📖 DE MELO, V. K & Amaral F. D. (2005); Ampliação da Distribuição das Anêmonas-do-Mar (Cnidaria, *Actiniaria*) no Estado de Pernambuco, Brasil; *Tropical Oceanography*, v.33, nº1, pp. 19 – 31.
- 📖 DOUEK, J. Barki, Y. Gateño, D. & Rinkevich B. (2002); Possible cryptic speciation within the sea anemone *Actinia equina* complex detected by AFLP markers; *Zoological Journal of the Linnean Society*, 136, pp. 315 – 320.
- 📖 DEL MATTO, L.A. (2016); Anêmonas na borda de agrupamentos investem mais em defesa contra dessecação; *Ecologia da Mata Atlântica*, Curso de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 📖 EDWARDS, A.J. & Shepherd A.D. (1992); Environmental implications of aquarium-fish collection in the Maldives, with proposals for regulation; *Environmental Conservation* 19: pp. 61–72.
- 📖 FAUTIN, D. (2015); *Actinia prasina* Gosse, 1860; In: Fautin, Daphne G. (2013). *Hexacorallians of the World*; Accessed through: World Register of Marine Species em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=100806>.
- 📖 FISH, J.D. & Fish S. (1989); *A student's guide to the seashore*; Unwin Hyman Ltd., London.
- 📖 FRAZÃO, B., Vasconcelos V. & Antunes A. (2012); Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, *Actiniaria*) Toxins: An Overview; *Marine Drugs* 10(8): pp.1812-1851. doi:10.3390/md10081812.
- 📖 GADELHA, JR., Morgado F. & Soares A.M.V.M. (2012); Histological and structural analysis of *Actinia equina* L. (Cnidaria: Anthozoa); *Microscopy and Microanalysis* 18 (5): pp. 61-62.
- 📖 GAZZOLA, A.C. (2003); Efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência de alevinos de dourado, *Salminus brasiliensis*; Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- 📖 GBIF – Global Biodiversity Information Facility (2016); English Wikipedia - Species Pages; doi:10.15468/c3kkgh, disponível em: <http://www.gbif.org/species/113440779> em 2016-09-12.
- 📖 HAYLOR, G.S., Thorpe J.P. & Carter M.A. (1984); Genetic and ecological differentiation between sympatric colour morphs of the common intertidal sea anemone *Actinia equina*; *Marine Ecology Progress Series*, pp. 81-289.

- 📖 HICKMAN, C.P., Roberts L.S., Keen S.L., Larson A., l'Anson H. & Einsenhour D.J. (2008); Integrated Principles of Zoology – Fourteenth Edition; McGraw-Hill Higher Education, New York, U.S.A.
- 📖 HONMA, T., Minagawa S., Nagai H., Ishida M., Nagashima Y. & Shiomi K. (2005), Novel peptide toxins from acrorhagi, aggressive organs of the sea anemone *Actinia equina*, *Toxicon* 46(7): pp. 768-774. ISSN 0041-0101.
- 📖 KROUPOVA, H., Machova J. & Sbovodovala Z. (2005); Nitrite influence on fish: a review; *Veterinární medicína – Czech* 50 (11), pp. 461–471.
- 📖 KRUGER, L. & Griffiths C. (1996); Sources of nutrition in intertidal sea anemones from the South-Western Cape, South Africa; *South African Journal of Zoology*, 31, pp. 110-120.
- 📖 LARKMAN, A.U. (1983); An ultrastructural investigation of the early stages of oocyte differentiation in *Actinia fragacea* (Cnidaria: Anthozoa); *International Journal of Invertebrate Reproduction* 4, pp. 147-i67.
- 📖 LEAL, M.C., Nunes C., Engrola S., Dinis M.T. & Calado R. (2012); Optimization of monoclonal production of the glass anemone *Aiptasia pallida* (Agassiz in Verrill, 1864); *Aquaculture*, 354–355, pp. 91–96.
- 📖 LIN, X.Y., Ishida M., Nagashima Y. & Kazuo S. (1996); A polypeptide toxin in the sea anemone *Actinia equina* homologous with other sea anemone sodium channel toxins: Isolation and amino acid sequence; *Toxicon* 34(1): pp. 57-65, ISSN 0041-0101, disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00121-2](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(95)00121-2)>.
- 📖 MACEK, P. & Lebez D. (1988); Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L.; *Toxicon* 26(5): pp. 441-451.
- 📖 MALLASEN, M. & Valenti W.C. (2006); Effect of nitrite on larval development of giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*; *Aquaculture* 261 (4), pp. 1292–1298.
- 📖 MARTINEZ, C.B.R., Azevedo F. & Winkaler E.U. (2006); Toxicidade e Efeitos da Amônia em Peixes Neotropicais; Departamento de Ciências Fisiológicas; Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001; 86051-990 – Londrina – PR, cbueno@uel.br.
- 📖 NEI, M. (1972); Genetic distance between populations; *American Naturalist* 106: pp. 283-292.
- 📖 NORTON, T.R. (1981); Cardiotoxic polypeptides from *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt) and *A. elegantissima* (Brandt); *Federation Proceedings* 40 (1): 21–5. PMID 6108877.
- 📖 OLIVOTTO, I., Planas M., Simões N., Holt G.J., Avella M.A. & Calado R. (2011); Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals; *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 41, No.2.
- 📖 ORR, J., Thorpe J.P. & Carter M.A. (1982); Biochemical Genetic Confirmation of the Asexual Reproduction of Brooded Offspring in the Sea Anemone *Actinia equina*; *Marine Ecology - Progress Series*, Vol. 7, pp. 227-229.
- 📖 PEREIRA, A.M., Brito C., Sanches J., Sousa-Santos C. & Robalo J.I. (2014); Absence of consistent genetic differentiation among several morphs of *Actinia* (Actiniaria: Actiniidae)

- occurring in the Portuguese coast; *Zootaxa*, 3893(4), pp. 595–600. doi:10.1080/10425170500356065.
- 📖 PERRIN, M.C. (1993); Aspects of the ecology and genetics of *Actinia* colour morphs; PhD Tesis, University of Liverpool.
- 📖 PERRIN, M.C., Thorpe J.P & Solé-Cava A.M. (1999); Population structuring, gene dispersal and reproduction in the *Actinia equine* species group; *Oceanography and Marine Biology: An annual Review* 37: pp. 129-152.
- 📖 ROACH, J. (2003); No Nemo: Anemones, Not Parents, Protect Clownfish; *National Geographic News*; disponível em: http://news.nationalgeographic.com/news/2003/06/0605_030605_findingnemofish.html
- 📖 RODRIGUES, N.V., Maranhão P., Oliveira P. & Alberto J. (2008); *Guia de Espécies Submarinas – Portugal-Berlengas*; Instituto Politécnico de Leiria, Peniche.
- 📖 RUPPERT, E.W., Fox R.S. & Barnes R.D. (2004); *Zoologia dos Invertebrados – Uma Abordagem Funcional-evolutiva*; Editora Roca LTDA; São Paulo (Brasil).
- 📖 SANTOS, E.M.D. (2015); Contribuição para o estudo da biologia das anêmonas do género *Actinia* linnaeus, 1767 na costa europeia; Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha e Conservação), ISPA – Instituto Universitário – Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida.
- 📖 SCANLON, M.J., Pallaghy P.K., Norton R.S. & Monks S.A. (1995); Solution structure of the cardiostimulant polypeptide anthopleurin-B and comparison with anthopleurin-A. *Structure*. 3 (8): pp. 791–803. doi:10.1016/s0969-2126(01)00214-3. PMID 7582896.
- 📖 SCHWEITZ, H., Bruhn T., Guillemare E., Moinier D., Lancelin J.M., Béress L. & Lazdunski M. (1995); Kaliclutides and Kaliseptine: two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K⁺ channels; *Journal of Biological Chemistry*. 270 (42): pp. 25121–25126. doi:10.1074/jbc.270.42.25121. ISSN 0021-9258. PMID 7559645.
- 📖 SCOTT, A., Hardefeldt J.M. & Hall K.C. (2014); Asexual Propagation of Sea Anemones That Host Anemonefishes: Implications for the Marine Ornamental Aquarium Trade and Restocking Programs; *PLoS ONE* 9(10): e109566. doi:10.1371/journal.pone.0109566.
- 📖 SCREMIN, R. (2013); *Anêmonas-do-mar (Cnidaria, Anthozoa) da Ilha do Mel: Levantamento taxonomico e Distribuição*; Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (Brasil).
- 📖 SHICK, J.M. (1991); *A Functional Biology of Sea Anemones*; Springer-Science+Business Media, B.V., 1st. edition, p. – il.; Dordrecht, Países Baixos.
- 📖 SHUMAN, C.S., Hodgson G. & Ambrose R.F. (2004); Managing the marine aquarium trade: is eco-certification the answer?; *Environmental Conservation* 31: pp. 339–348.
- 📖 SIKAVUOPIO, S.I., Dale T., Christiansen J.S. & Nevermo I. (2004); Effects of chronic nitrite exposure on gonad growth in green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*; *Aquaculture* 242 (1/4), pp. 357–363

- ☞ SOLE-CAVA, M. & Thorpe J.P. (1987); Further genetic evidence for the reproductive isolation of green sea anemone *Actinia prasina* Gosse from common intertidal beadlet anemone *Actinia equina* (L.); Marine Ecology Progress Series 38: pp. 225-229.
- ☞ TANAKA, K., Caaveiro J.M.M., Morante K., González-Mañas J.M. & Tsumoto K. (2015); Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid; Nature Communications 6: 6337. DOI: 10.1038/ncomms7337.
- ☞ TANG, P.C., Smith K.M. & Watson G.M. (2016); Repair of traumatized mammalian hair cells via sea anemone repair proteins; Journal of Experimental Biology (2016) 219, pp. 2265-2270 doi:10.1242/jeb.135459.
- ☞ TURNER, V.L.G., Lynch S.M., Paterson L., León -Cortés J.L. & Thorpe J.P. (2003); Aggression as a function of genetic relatedness in the sea anemone *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniaria); Marine Ecology Progress Series, 247, pp. 85–92, doi :10.3354/meps247085.
- ☞ VAFEIADOU, A., Antoniadou, C. & Chintiroglou, C. (2012); Symbiosis of sea anemones and hermit crabs: different resource utilization patterns in the Aegean Sea; Helgoland Marine Research 66 (3), pp. 385-392.
- ☞ VAN-PRAET, M. (1985); Nutrition of sea anemones; Adv. Mar. Biol. 22: pp. 65-99 In: Advances in Marine Biology. Academic Press: London, New York. ISSN 0065-2881
- ☞ VIDOLIN, D. (2007); Tolerância à variação de parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas-do-mar na zona entremarés de um costão rochoso no sul do Brasil; Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas, área de concentração em Zoologia), Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Panamá, Universidade do Panamá, Curitiba (Brasil).
- ☞ WABNITZ, C., Taylor M., Green E., Razak T. (2003); From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species; Cambridge, UK: UNEP-WCMC.
- ☞ WHITEHEAD, MJ, Gilmore E., Eager P., McGinnity P., Craik W & MacLeod P. (1986); Aquarium fishes and their collection in the Great Barrier Reef region; Townsville: GBRMPA, pp. 1–39.
- ☞ WOOD, E.M. (2001a); Global advances in conservation and management of marine ornamental resources; Aquarium Sciences and Conservation 3: pp. 65–77.
- ☞ WOOD, E.M. (2001b); Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies; UK: Marine Conservation Society, 80 pp.
- ☞ YANAGI, K., Segawa S. & Tsuchiya K. (1999); Early development of young brooded in the enteron of the beadlet sea anemone *Actinia equina* (Anthozoa: Actiniaria) from Japan; Invertebrate Reproduction and Development, 35: 1, pp. 1-8.
- ☞ YASUNOBU, K.T., Norton T.R., Reimer N.S. & Yasunobu C.L. (1985); Amino acid sequence of the *Anthopleura xanthogrammica* heart stimulant, anthopleurin-B; Journal of Biological Chemistry 260 (15): 8690–3. PMID 4019448.

Anexos

1. Anémons-do-mar: breve descrição

Todos os animais deste filo apresentam simetria radial do corpo. Todavia, os antozoários nunca originam a forma corporal “medusa”, ao longo do seu ciclo de vida. Caracterizam-se por serem organismos sésseis. Durante a reprodução sexuada, desenvolve-se uma “larva plânula”, Esta larva móvel tem por objetivo procurar um substrato, num habitat adequado, que lhe permita fixar-se. Posteriormente, a larva desenvolve-se numa forma corporal tubular, designada de “pólipo”. As anémons são pólipos e apresentam a extremidade inferior do corpo fechada, fixa a um substrato – “disco basal” ou “pé”. No centro da extremidade oposta do corpo encontra-se a “boca”, em redor da qual se projecta um número variável de “tentáculos”. Dependendo da espécie, as anémons podem ser algumas unidades até várias centenas de tentáculos. Estes dispõem-se em um ou em vários círculos concêntricos, à volta da boca do animal (Bocharova & Kozevich, 2011). Na maioria das anémons, os tentáculos podem retrair-se para o interior do corpo. Estas estruturas servem tanto para caçar presas, recolher e direccionar o alimento para a boca, como para defesa contra predadores ou outros organismos inoportunos. As anémons são comuns nas zonas costeiras, apresentando formas variadas e muito coloridas. (Rodrigues *et al.*, 2008).

As anémons são pólipos desprovidos de esqueleto calcário, mas ainda assim são animais de grandes dimensões. Este facto permite-lhes a captura e digestão de presas maiores, como peixes e crustáceos (Castro & Huber, 2016). A parede corporal das anémons é composta por 3 camadas distintas: 1) epiderme, tecido de revestimento externo, originado a partir da ectoderme e especializado na protecção e defesa; 2) mesogleia, uma matriz gelatinosa com amebócitos, que faz o preenchimento e suporte dos tecidos; 3) gastroderme, tecido de revestimento interno, de origem endodérmica, que rodeia a cavidade gastrovascular (Fig. 1).

Para se defender ou caçar, as anémons usam os tentáculos. Estes são providos de células na epiderme que são exclusivas deste filo – os “cnidócitos”. Estas células possuem organelos específicos – “nematocistos” ou “cápsulas urticantes”, de onde deriva o nome do filo Cnidaria (Hickman *et al.*, 2014).

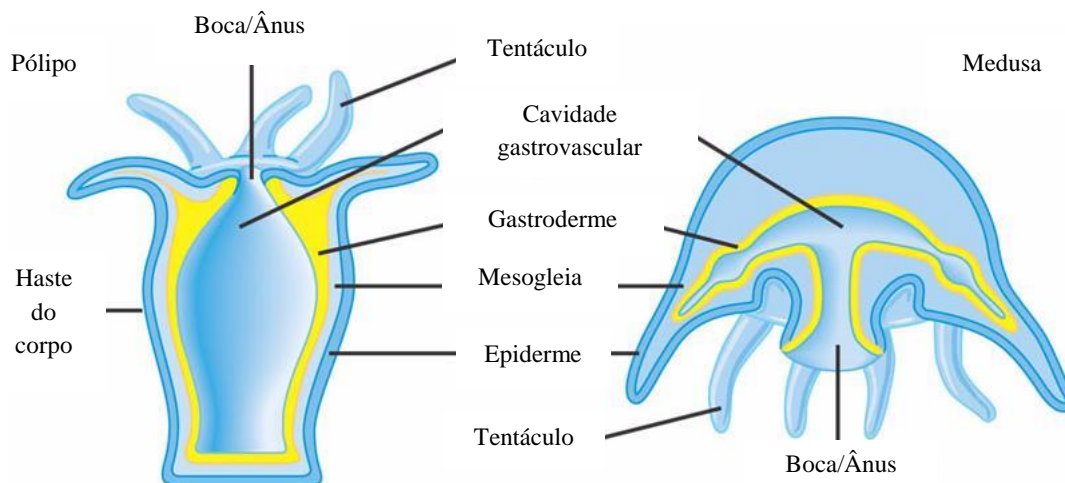


Figura 1 – Estrutura corporal de cnidários: pólipos e medusas (adaptado de Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. publishing Benjamin Cummings).

Para se defender ou caçar, as anêmonas usam os tentáculos. Estes são providos de células na epiderme que são exclusivas deste filo – os “cnidócitos”. Estas células possuem organelos específicos – “nematocistos” ou “cápsulas urticantes”, de onde deriva o nome do filo Cnidaria (Hickman *et al.*, 2014). Cada nematocisto contém uma pequena vesícula preenchida com um líquido urticante (com actinotoxinas), um filamento interno (“cnidocílio”), e uma fibra sensorial externa (“gatilho”). Quando uma estrutura orgânica toca no gatilho, aciona mecanicamente uma explosão celular, na qual, o cnidocílio é disparado contra possíveis presas/predadores, arpoando-os e injetando o líquido urticante, que as/os imobilizará. No caso de ser uma presa, os tentáculos retraem-se conduzindo-a até à boca, passando pela faringe, até à cavidade gastrovascular (Fig. 1).

Sulcos ciliados – “sifonoglifos” - correm ao longo da boca e promovem a circulação de água para a faringe (Fig. 1), de forma a auxiliar na respiração e manutenção da pressão hidrostática de suporte ao corpo (Finnerty, 2003). Cílios localizados em outros pontos da faringe, retornam a água para o exterior do corpo, removendo resíduos (Hickman *et al.*, 2014). A cavidade gastrovascular é revestida pela

gastroderme e dividida por septos radiais -“mesentérios” (Fig. 1). Os mesentérios contêm feixes longitudinais de fibras musculares contrácteis, que permitem ao animal comprimir o corpo inteiro. Os mesentérios primários (completos) estendem-se verticalmente da parede corporal à faringe. Seis pares de mesentérios primários dividem a cavidade gastrovascular em 6 câmaras radiais (Classe Hexacorallia; Fig.1). No topo da faringe há aberturas nos mesentérios primários, que permitem a circulação de água entre as câmaras radiais – “perfurações septais” (Fig.1; Hickman *et al.*, 2014). Os mesentérios secundários e terciários (incompletos; Fig.1) subdividem parcialmente essas câmaras, contribuindo para aumentar a área superficial da cavidade gastrovascular. Os mesentérios também existem no disco basal e/ou disco oral (boca). As extremidades livres de todos os mesentérios incompletos formam filamentos sinuosos revestidos por epitélio contendo células glandulares secretoras de enzimas digestivas – “filamentos septais” (Fig.1; Hickman *et al.*, 2014). Em algumas anêmonas, as partes inferiores desses filamentos prolongam-se em acontios (Fig.1), os quais podem ser projectados pela boca e poros na parede corporal, para auxiliar na captura de presas, ou em situações de defesa. Assim, estes auxiliam a função dos tentáculos (Bocharova & Kozevich, 2011; Hickman *et al.*, 2014). Os poros, por onde passam os acontios, auxiliam na eliminação rápida de água do corpo da anêmona, para redução do volume corporal, em casos de ameaça ou condições ambientais desfavoráveis (Hickman *et al.*, 2014). O sistema digestivo destes animais é incompleto, pelo que os resíduos dos alimentos não digeridos terão de ser eliminados também pela faringe e pela boca (Hickman *et al.*, 2014; Castro & Huber, 2016).

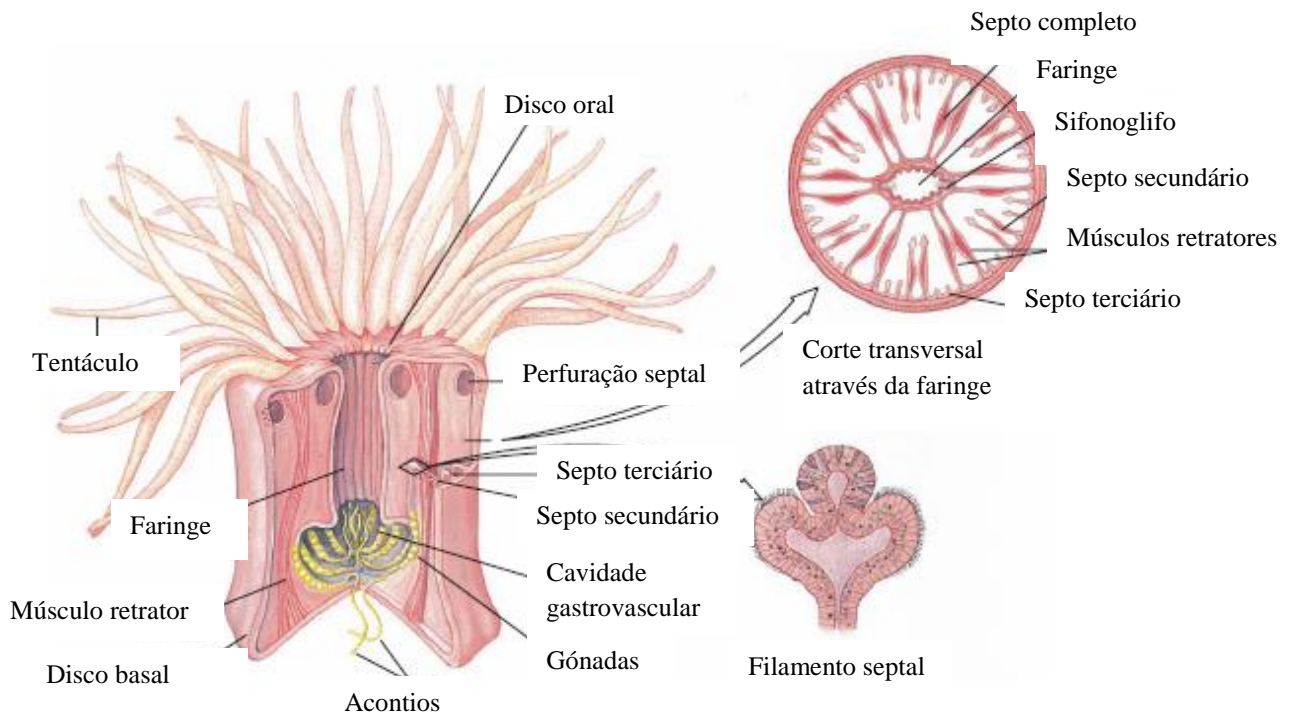


Fig. 2 – Esquema da anatomia de uma anêmona, com incidência num corte longitudinal ao nível do centro do corpo e de um corte transversal ao nível da actinofaringe (adaptado de Hickman *et al.*, 2014).

