

DUARTE JOSÉ FARIA VILAR DE FIGUEIREDO

Parâmetros biológicos dos juvenis de *Chelon labrosus*,
Liza ramada, *Liza aurata* e *Atherina presbyter* do
estuário do Douro obtidos a partir da análise da
estrutura dos otólitos *sagitta*



Mestrado em Ecologia Aplicada

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2003.

DUARTE JOSÉ FARIA VILAR DE FIGUEIREDO

Parâmetros biológicos dos juvenis de *Chelon labrosus*,
Liza ramada, *Liza aurata* e *Atherina presbyter* do
estuário do Douro obtidos a partir da análise da
estrutura dos otólitos *sagitta*



Mestrado em Ecologia Aplicada

**Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Porto, 2003.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências da Universidade do Porto
para a obtenção do Grau de Mestre
em Ecologia Aplicada.

Ao António Duarte

Eras o primeiro dia inteiro e puro
Banhando os horizontes de louvor
Eras o espírito a falar em cada linha
Eras uma madrugada em flor
Entre a brisa marinha.
Eras uma vela bebendo o vento dos espaços
Eras o gesto luminoso de dois braços
Abertos sem limite
Eras a pureza e a força do mar
Eras o conhecimento pelo amor

Sophia de Mello Breyner Andresen

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Santos agradeço ter aceite ser o meu orientador. Pelo seu excepcional apoio científico, disponibilidade, incentivo e amizade demonstrada ao longo deste trabalho estarei sempre reconhecido e grato. Agradeço também a minuciosa e atenta revisão deste trabalho.

Ao Dr. José Eduardo Martins, meu especial amigo e Secretário de Estado do Ambiente, que permitiu que as minhas funções de seu Adjunto e a elaboração desta dissertação de mestrado coexistissem, com natural prejuízo das primeiras.

Ao Professor Doutor José Américo de Sousa, Coordenador do Curso de Mestrado, pela sua dedicação, simpatia e empenhamento na resolução de toda e qualquer questão.

À Eng. Daniela do CEMUP, pela disponibilidade, paciência e empenho demonstrados na execução das fotografias de microscopia electrónica de varrimento dos otólitos.

Ao Daniel, Alexandra, Ana Antão, Ana Mesquita, Marta, Joana e Catarina, colegas solidários deste curso de Mestrado, os quais sempre que preciso souberam dizer presente.

À Vânia Freitas, pela revisão do nome científico das espécies citadas.

À Tina, pela sua presença tranquila com que sempre me apoiou, quer nos momentos de bonança, quer nos períodos mais conturbados de elaboração desta dissertação.

Aos meus pais que, no fundo, tornaram tudo isto possível.

Resumo

A partir da análise da estrutura dos otólitos determinaram-se as idades, as datas de nascimento, o crescimento e as datas de entrada no estuário do Douro de indivíduos juvenis de *Chelon labrosus* (Risso, 1826), *Liza ramada* (Risso, 1826) *Liza aurata* (Risso, 1810) e *Atherina presbyter* Cuvier, 1829.

Os parâmetros das relações peso total-comprimento total ($W_t = a \cdot L_t^b$) para as diferentes espécies são: *C. labrosus* ($a=0,00128$ e $b=2,8607$); *L. ramada* ($a=0,0092$ e $b=3,0385$); *L. aurata* ($a=0,0091$ e $b=3,0086$); *A. presbyter* ($a=0,0058$ e $b=3,0848$).

As relações entre o peso (W) dos indivíduos e o comprimento máximo dos seus otólitos (OL) obtidas foram: *L. aurata* ($W = 2E-10 OL^{2,9702}$); *L. ramada* ($W = 2E-08 OL^{2,4104}$); *C. labrosus* ($W = 1E-08 OL^{2,4734}$); *A. presbyter* ($W = 1E-10 OL^{3,0186}$). As relações entre o comprimento dos indivíduos (L) e o comprimento máximo dos seus otólitos (OL) foram: *L. aurata* ($L = 0,0027 OL + 0,1137$); *L. ramada* ($L = 0,0024 OL + 0,5719$); *C. labrosus* ($L = 0,0025 OL + 0,5462$); *A. presbyter* ($L = 0,0029 OL - 0,0015$).

As equações de crescimento obtidas a partir da contagem dos microincrementos dos otólitos das diferentes espécies foram: *L. aurata* ($L_t=0,0175 t + 1,0931$); *L. ramada* ($L_t=0,0152 t + 1,682$); *C. labrosus* ($L_t = 0,0125 t + 1,9947$); *A. presbyter* ($L_t=0,0085 t + 4,987$). Sendo t a idade em dias

As taxas de crescimento médio das espécies estudadas foram: *L. aurata* (0,222 mm/dia); *L. ramada* (0,324 mm/dia); *C. labrosus* (0,240 mm/dia); *A. presbyter* (0,456 mm/dia).

As idades de entrada das espécies no Estuário obtidas a partir da contagem dos microincrementos dos otólitos foram: *L. aurata* (18 dias); *C. labrosus* (20 dias).

Das resinas utilizadas, a Struers Specifix-20 foi a que obteve melhores resultados. Um período de *etching* de 50 segundos em EDTA (5%) foi o que permitiu melhores imagens de microscopia electrónica.

Estes dados contribuirão para um melhor conhecimento dos ciclos de vida destes peixes da costa portuguesa, bem como para um melhor conhecimento da dinâmica do ecossistema do estuário do Douro.

Abstract

Age, growth and birthdays determinations and the entry's date in the Douro's estuary of *Chelon labrosus* (Risso, 1826), *Liza ramada* (Risso, 1826) *Liza aurata* (Risso, 1810) and *Atherina presbyter* Cuvier, 1829 juvenile's were obtained from theirs otoliths structure analyses.

The total weight–total length relationship parameters for the different species are: *C. labrosus* ($a=0,00128$ e $b=2,8607$); *L. ramada* ($a=0,0092$ e $b=3,0385$); *L. aurata* ($a=0,0091$ e $b=3,0086$); *A. presbyter* ($a=0,0058$ e $b=3,0848$).

The individual weight (W)–otolith total length (OL) relationships were best described by the following equations: *L. aurata* ($W = 2E-10 O_L^{2,9702}$); *L. ramada* ($W = 2E-08 O_L^{2,4104}$); *C. labrosus* ($W = 1E-08 O_L^{2,4734}$); *A. presbyter* ($W = 1E-10 O_L^{3,0186}$). The individual length (L) – otolith total length (OL) relationships were: : *L. aurata* ($L = 0,0027 O_L + 0,1137$); *L. ramada* ($L = 0,0024 O_L + 0,5719$); *C. labrosus* ($L = 0,0025 O_L + 0,5462$); *A. presbyter* ($L = 0,0029 O_L - 0,0015$).

The growth equations obtained from the microincrement counting were: *L. aurata* ($L_t=0,0175 t + 1,0931$); *L. ramada* ($L_t=0,0152 t + 1,682$); *C. labrosus* ($L_t = 0,0125 t + 1,9947$); *A. presbyter* ($L_t=0,0085 t + 4,987$).

The average growth rate for the studied species were: *L. aurata* (0,222 mm/day); *L. ramada* (0,324 mm/day); *C. labrosus* (0,240 mm/day); *A. presbyter* (0,456 mm/day).

The entry's age in the estuary obtained from the microincrements readings were: *L. aurata* (18 days); *C. labrosus* (20 days).

This data will contribute to a better knowledge of the fish's life cycles on the Portuguese shore as well to a better knowledge of the Douro's estuary ecosystem dynamics.

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Características dos otólitos.....	4
1.1.1. <i>Annuli</i>	6
1.1.2. Incrementos diários.....	8
1.1.3. Marcas	14
1.2. Aplicações do estudo da microestrutura dos otólitos.....	15
1.2.1. Determinação da Idade.....	18
1.2.2. Determinação do crescimento e modelos de crescimento.....	24
1.2.3. Retrocálculo	30
1.2.4. Determinação de alterações fisiológicas e ambientais.....	32
1.2.5. Estimativas de recrutamento e mortalidade	35
1.3. Principais métodos utilizados na preparação de otólitos para observação em Microscópio Electrónico de Varrimento	38
1.4. Caracterização das espécies em estudo	41
1.5. Âmbito e objectivos do trabalho.....	43
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1. Relação entre o crescimento dos otólitos e dos peixes.....	53
3.2. Microestrutura dos Otólitos.....	56
3.2.1. Determinação da relação idade/comprimento.....	56
<i>Liza aurata</i>	56
<i>Liza ramada</i>	58
<i>Chelon labrosus</i>	61
<i>Atherina presbyter</i>	63
3.2.2. Determinação das taxas de crescimento médio das espécies estudadas.	65
3.2.3. Determinação da idade média de entrada dos indivíduos no Estuário do Douro	66
3.2.4. Determinação de datas de eclosão.....	68
3.3. Análise comparativa dos resultados obtidos com a montagem dos otólitos em diferentes tipos de resinas.	71

3.4. Análise comparativa dos resultados obtidos com diferentes períodos e agentes de etching	72
4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
5. BIBLIOGRAFIA	78
6. ANEXOS	87
ANEXO 1 – Dados dos Peixes capturados em 11/02/02.....	88
ANEXO 2 – Dados dos Peixes capturados em 20/08/02.....	90
ANEXO 3 - Medições dos microincrementos.....	94
ANEXO 4 – Determinação das taxas de crescimento	110
ANEXO 5 – Determinação da idade de entrada no Estuário	113
ANEXO 6 – Determinação da data de nascimento dos indivíduos.....	114
ANEXO 7- Determinação do <i>etching</i> adequado	117

Índice Figuras

Figura 1 – Vista dorsal da cabeça de um teleósteo (adaptado de Harkonen, 1986).....	2
Figura 2 – Vista lateral da parte direita do labirinto de um teleósteo (adaptado de Harkonen, 1986)	3
Figura 3 – Otólitos <i>sagitta</i> de <i>Atherina presbyter</i> , observados em Lupa Binocular.	4
Figura 4 - Otólitos <i>sagitta</i> de <i>Solea lascaris</i> , observados em Lupa Binocular ...	6
Figura 5 – Pormenor de otólito <i>sagitta</i> de <i>Liza ramada</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	9
Figura 6 – Pormenor de otólito <i>sagitta</i> de <i>A. presbyter</i>	14
Figura 7 - Fotografia aérea do estuário do rio Douro (adaptado de http://ortos.cnig.pt/igeoe).....	44
Figura 8 - Fotografia de otólito <i>sagitta</i> de <i>Liza aurata</i> , com indicação do eixo de medição do comprimento máximo	45
Figura 9 – Imagem de bloco de resina epoxy contendo otólito.	46
Figura 10 - Relações peso – comprimento ($W_t = a \cdot L_t^b$), das espécies de juvenis de Teleósteo capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto 2002.....	51
Figura 11 - Relação Peso dos Indivíduos/Comprimento máximo dos otólitos (Coluna da esquerda); Relação Comprimento dos Indivíduos/Comprimento Máximo dos otólitos (Coluna da direita)	55
Figura 12 - Imagem parcial de <i>sagitta</i> de <i>L. aurata</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	56
Figura 13 - Relação comprimento–idade, dos juvenis de <i>Liza aurata</i> capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.....	57
Figura 14 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de <i>Liza ramada</i> capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.....	59
Figura 15 - Imagem parcial de <i>sagitta</i> de <i>L. ramada</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	60

Figura 16 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de <i>Chelon labrosus</i> capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.....	61
Figura 17 - Imagem parcial de <i>sagitta</i> de <i>C. labrosus</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	62
Figura 18 - Imagem parcial de <i>sagitta</i> de <i>A. presbyter</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	63
Figura 19 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de <i>Atherina presbyter</i> capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.....	63
Figura 20 - Imagem parcial de <i>sagitta</i> de <i>C. labrosus</i> visto ao microscópio electrónico de varrimento.....	66
Figura 21 – Distribuição das datas de eclosão das espécies capturadas no Estuário do Douro e cuja microestrutura dos otólitos foi analisada.....	68
Figura 22 – Imagens parciais de <i>sagittae</i> vistos ao microscópio electrónico de varrimento. Imagem da esquerda – <i>C. labrosus</i> com <i>etching</i> com EDTA (5%) durante 50 segundo; Imagem da direita – <i>A. presbyter</i> com <i>etching</i> com HCl (0,1%) durante 30 segundos.	73

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Número de indivíduos capturados, comprimento (cm) e peso (g) mínimos e máximos. 49

Tabela 2 - Relações peso – comprimento ($W_t = a \cdot L_t^b$) dos indivíduos capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto 2002..... 50

Tabela 3 - Parâmetros da relação comprimento/peso ($W_t = a \cdot L_t^b$) para as espécies estudadas no Estuário do Douro, na Ria de Aveiro, Ria Formosa e Estuário do Mondego. 52

Tabela 4 - Resultados dos Testes de *t* bicaudais efectuados aos comprimentos máximos dos otólitos direitos e esquerdos 53

Tabela 5 - Equações das relações entre o peso em gramas (W) e comprimentos, em centímetros, dos peixes (L) e o comprimento máximo, em micrómetros, dos otólitos (O_L)..... 53

Tabela 6 - Comprimento médio (cm) de *L. aurata* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos..... 58

Tabela 7 - Comprimento médio (cm) de *L. ramada* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos..... 60

Tabela 8 - Comprimento médio (cm) de *C. labrosus* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos..... 62

Tabela 9 – Taxas de Crescimento Somático diário médio (mm/dia) das diferentes espécies estudadas no presente trabalho..... 65

Tabela 10 - Percentagem de blocos de resina com um desgaste/polimento adequado, para os diferentes tipos de resinas utilizados. 71

Tabela 11 – Resultados obtidos com diferentes períodos e agentes de *etching*. 72

Mar sonoro, mar sem fundo mar sem fim.
A tua beleza aumenta quando estamos sós.
E tão fundo intimamente a tua voz
Segue o mais secreto bailar do meu sonho
Que momentos há que eu suponho
Seres um milagre criado só para mim.

Sophia de Mello Breyner Andresen

1. INTRODUÇÃO

Os otólitos de peixes ósseos são constituídos por uma parte inorgânica, carbonato de cálcio (CaCO_3) sob a forma de aragonite, vaterite ou calcite e por uma parcela orgânica constituída pela proteína otolina (Degens *et al.*, 1969). A calcite e a vaterite são encontradas com pouca frequência e estão associadas a otólitos com características aberrantes (Morales-Nin, 1985; Strong *et al.*, 1986).

Embora os factores que influenciam as diferentes formas de deposição de carbonato de cálcio nos otólitos ainda sejam pouco conhecidos (Wright *et al.*, 2002), o aparecimento de vaterite e de calcite foi atribuído ao movimento do otólito no sáculo (Strong *et al.*, 1986), a *stress* mecânico (Strong *et al.*, 1986) e térmico (Jonsson, 1966; Gauldie, 1986 todos *in* Bowen *et al.*, 1999), a deficiências nutritivas (David *et al.*, 1994 *in* Bowen *et al.*, 1999) e danos mecânicos nas células maculares (Strong *et al.*, 1986).

Resultados experimentais (*e.g.* Degens *et al.*, 1969; Morales-Nin, 2000) indicam que o crescimento dos otólitos se processa através da deposição de carbonato de cálcio, segregado pelas células maculares situadas na face interna da membrana que rodeia os otólitos, numa matriz proteica. O processo de acreção decorre continuamente, embora os ritmos de deposição da fracção mineral e da fracção orgânica variem ciclicamente, o que origina uma estrutura bipartida (Brothers, 1981; Mugiya, 1987). A forma do otólito é determinada pela interacção entre os seus componentes orgânicos e inorgânicos (Gauldie e Nelson, 1990).

A otolina possui um peso molecular superior a 150.000, apresentando uma constituição, ao nível dos aminoácidos, que não é afectada significativamente por diferenças filogenéticas entre as espécies nem por diferenças ambientais (Degens *et al.*, 1969). No entanto, a variação da quantidade total de proteína existente no otólito e a quantidade de isótopos existentes na aragonite já eram apresentados por Degens *et al.* (1969) como possíveis critérios a utilizar na distinção de peixes marinhos e dulciaquícolas,

bem como um meio de detecção de padrões migratórios e de quantificação da temperatura do meio.

Os otólitos localizam-se na região posterior da cavidade craniana, numa zona denominada labirinto (Figura 1). Esta estrutura está envolvida na manutenção do equilíbrio, possuindo células nervosas sensíveis à pressão, gravidade, movimento angular e vibração sonora (Wright *et al.*, 2002). Os labirintos têm uma estrutura membranosa e possuem três pares de cápsulas óticas (Harkonen, 1986; Popper e Lu, 2000). É o líquido endolinfático que está na base da deposição dos materiais que constituem o otólito (Gauldie e Nelson, 1990; Ré, 1993; Morales-Nin, 2000).

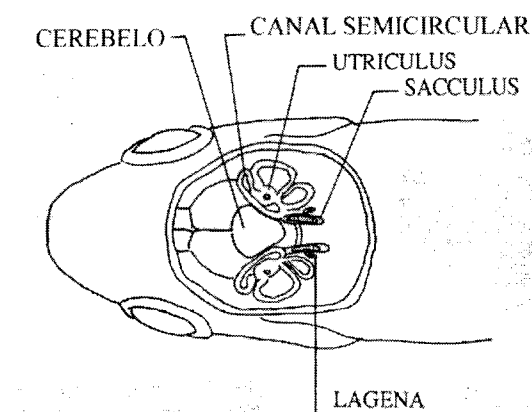


Figura 1 – Vista dorsal da cabeça de um teleosteo (adaptado de Harkonen, 1986).

Nos peixes ósseos existem três pares de otólitos localizados no interior das cápsulas óticas respectivas (Figura 2). Na maior dessas cápsulas (*Utriculus*) encontram-se os otólitos denominados *Lapilli* (sing. *Lapillus*), na cápsula de dimensões intermédias (*Sacculus*) podem-se achar os *Sagittae* (sing. *Sagitta*). A *Lagennus*, que é a cápsula de menores dimensões, possui no seu interior os *Asterisci* (sing. *Asteriscus*). O *Lapillus* é o otólito de menores dimensões, sendo que na generalidade dos peixes ósseos é o *Sagitta* que apresenta um tamanho maior (Nolf, 1985 *in* Secor *et al.*, 1992). É de sublinhar que a morfologia dos otólitos é característica de cada espécie e pode ser usada em estudos taxonómicos (Harkonen, 1986).

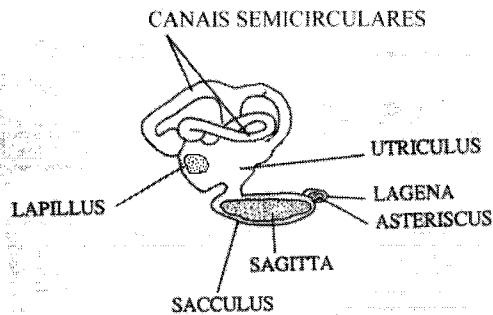


Figura 2 – Vista lateral da parte direita do labirinto de um teleósteo (adaptado de Harkonen, 1986)

As funções dos otólitos estão essencialmente relacionadas com a percepção da força da gravidade e do som (Harkonen, 1986; Gauldie e Nelson, 1990; Ré, 1993; Morales-Nin, 2000; Popper e Lu, 2000), eles actuam estimulando os cílios das células sensoriais que forram internamente as cápsulas óticas e que reagem a diferenças de pressão, gerando estímulos nervosos. A forma do otólito determina as frequências de som que o peixe pode captar (Gauldie e Nelson, 1990; Popper e Lu, 2000). Dai resulta que o seu crescimento esteja intimamente associado com a manutenção das suas propriedades funcionais, sendo controlado pela forma da cápsula ótica e do crânio (Morales-Nin, 2000).

Por muitas aplicações científicas que o seu estudo possa ter, não podemos deixar de ter em atenção que a função dos otólitos é a recepção de estímulos sensoriais, nomeadamente a percepção da frequência, amplitude e direcção do som, bem como a manutenção do posicionamento dinâmico e estático do peixe e não o aumento da facilidade com que os investigadores da área possam obterem resultados interessantes.

1.1. Características dos otólitos

Juntamente com as escamas, ossos opérculares, vértebras e raios das barbatanas, os otólitos (Figura 3) são frequentemente usados para determinação da idade e crescimento de peixes (e.g. Campana e Neilson, 1985; Jones, 1992; Santos, 1995; Campana, 2001).

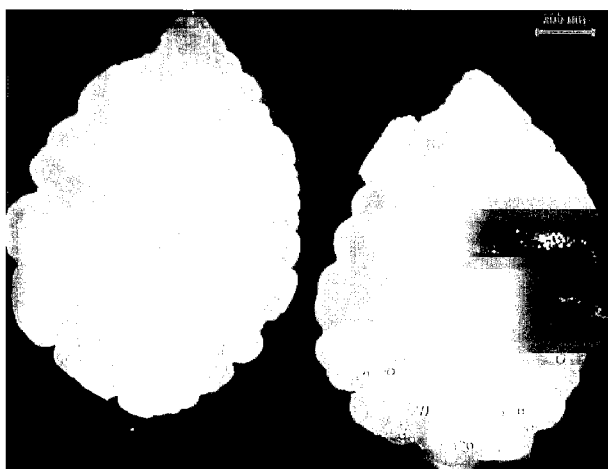


Figura 3 – Otolitos sagitta de *Atherina presbyter*, observados em lupa binocular (barra=300 micrómetros)

Como a morfologia dos otólitos é uma característica específica, é possível identificar espécies presas de predadores piscívoros, bem como efectuar o estudo quantitativo e qualitativo da alimentação desses predadores (e.g. Fitch e Brownell, 1968; Harkonen, 1986; Santos, 1995). Estes estudos são possíveis devido ao facto de o tamanho e o peso dos peixes ingeridos poder ser facilmente calculado a partir dos otólitos encontrados no estômago dos predadores (Fitch e Brownell, 1968).

É também possível, recorrendo ao estudo dos otólitos, a diferenciação de unidades de população, bem como determinar a origem geográfica dos indivíduos (e.g. Campana *et al.*, 1994; Santos, 1995; Campana *et al.*, 2000).

Devido à sua natureza acelular, os otólitos não sofrem reabsorção em situações de maior pressão ambiental, tornando-se indicadores mais fiáveis do que as outras estruturas normalmente usadas para a determinação da idade e crescimento (Gauldie e Nelson, 1990; Jones, 1992). No entanto, possíveis

fenómenos de reabsorção de otólitos são referidos por Cieri e McCleave (2000) durante a metamorfose de leptocefalos para juvenis em *Anguilla rostrata*.

Diversos estudos (Marshall e Parker, 1982; Campana, 1983; Neilson e Geen, 1985; Barber e Jenkins, 2001) referem que os otólitos continuam a crescer mesmo perante situações de falta de alimento ou de exposição a situações de *stress*. Para além disso, os otólitos são geralmente as primeiras estruturas calcificadas a formarem-se durante as etapas iniciais de desenvolvimento dos Teleósteos (Campana e Neilson, 1985), pelo que permitem determinar a idade de peixes que ainda não possuam escamas.

Campana e Neilson (1985) explicam a diferença de “comportamento” dos otólitos e das escamas em situações de *stress* pelo facto de a função dos primeiros estar relacionada com o equilíbrio e com a audição, o que implicará a manutenção duma configuração bastante precisa em relação às restantes partes da cápsula ótica, o mesmo não se passará com as escamas, pois as suas funções de revestimento permitem uma maior variabilidade de tamanho e forma, podendo desse modo funcionar como reservas de cálcio a ser utilizada pelo peixe quando necessário.

Há, no entanto, algumas desvantagens na utilização dos otólitos (Jones, 1992):

- A sua extracção implica a morte do peixe;
- Os otólitos de peixes mais velhos podem ser de difícil leitura, pois os incrementos (Ver capítulos 1.1.1 e 1.1.2.) podem ser incompletos e estarem comprimidos na região mais periférica do otólito;
- A técnica de análise de otólitos, é relativamente demorada, necessitando de meios auxiliares sofisticados e de observadores treinados.

Os otólitos são caracterizados pela presença de três tipos de estruturas periódicas, todas utilizadas na determinação da idade dos peixes: *Annuli*; Incrementos diários e alguns tipos de marcas (Bagenal, 1974 *in* Gauldie, 1990).

1.1.1. *Annuli*

Um dos aspectos morfológicos mais característicos dos otólitos é a sua estruturação em bandas (Figura 4), sucedendo-se faixas translúcidas (ou hialinas) e faixas mais opacas, nalguns casos perceptíveis à vista desarmada. Um *annulus* será formado por um anel opaco e um anel translúcido, o primeiro formado na Primavera-Verão e o último durante o Outono-Inverno e corresponderá a um período de um ano de vida do peixe.

A zonação opaca/hialina é o resultado da influência da variação de factores ambientais na fisiologia do peixe, a qual se irá reflectir nos seus otólitos (Morales-Nin, 1992; Fowler, 1995).

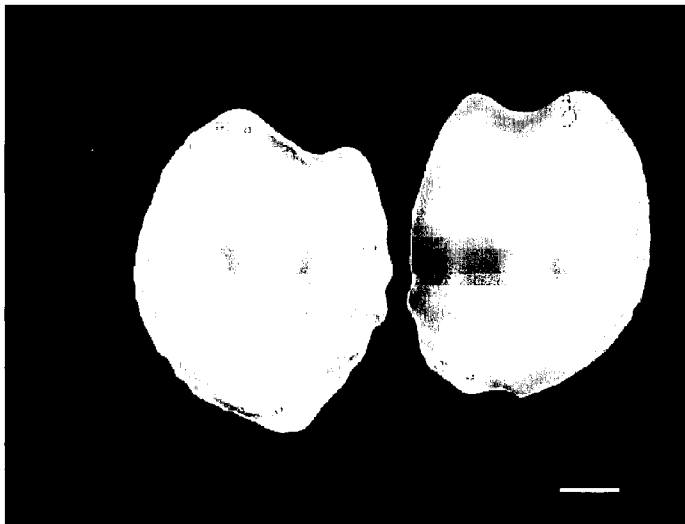


Figura 4 - Otólitos *sagitta* de *Solea lascaris*, observados em lupa binocular (barra=300 micrómetros)

O mecanismo fisiológico responsável pela deposição de material opaco e hialino é pouco claro (Beckman e Wilson, 1995; Fowler, 1995). Fowler (1995) e Wright *et al.* (2002) referem como possíveis causas para essa deposição distinta as diferenças na largura dos microincrementos, as diferenças na relação proteínas:CaCO₃, bem como diferenças nas taxas de calcificação ou nas características dos cristais de aragonite.

Pensa-se que nas zonas opacas predominam os materiais orgânicos e as translúcidas são dominadas por carbonato de cálcio. A deposição de Ca²⁺

varia entre o Verão e o Inverno, apresentando as zonas translúcidas (depositadas durante o Inverno) maior teor em Cálcio do que as opacas (depositadas durante a Primavera-Verão) (Casselman, 1987 *in* Fowler, 1995).

O padrão de formação das zonas opacas e hialinas também pode ser associado a variações sazonais na largura dos incrementos diários dos otólitos. Pannella (1974) *in* Beckman e Wilson (1995) sugere que a deposição das regiões opacas está associada a incrementos diários (ver capítulo 1.1.2.) mais largos do que nas zonas translúcidas. No entanto, Radtke *et al.* (1985) *in* Beckman e Wilson (1995) referem que a deposição nas regiões opacas estará associada a incrementos diários mais finos ligados a uma diminuição do metabolismo do peixe. Daqui resulta a necessidade de se aprofundar o estudo do crescimento dos otólitos e do seu controlo.

Mesmo perante as incertezas referidas atrás, pode-se afirmar que formação das zonas translúcidas e opacas é atribuível a diversos factores, tais como: ciclos sazonais de temperatura, disponibilidade de alimento, ciclos reprodutivos e condições hidrológicas (Beckman e Wilson, 1995).

Estes incrementos foram desde há muito tempo usados para determinar a idade dos peixes (Jones, 1992). A sua formação constante e a proporcionalidade existente entre os otólitos e o crescimento dos peixes foram características que tiveram muita importância na adopção do estudo dos otólitos para a determinação da idade e ritmo de crescimento dos peixes.

Os métodos de preparação e interpretação dos *annuli* diferem de autor para autor e também dependem da espécie em estudo (Jones, 1992). No entanto, o estudo dos anéis anuais dos otólitos não é um método adequado para determinar a idade de peixes que ainda não tenham formado o seu primeiro *annulus*, vivam em águas profundas ou em ambientes tropicais (Campana e Neilson, 1985; Harkonen, 1986; Jones, 1992). No primeiro caso, só poderemos afirmar que o indivíduo terá menos de um ano, nos dois seguintes, a inexistência de alterações sazonais de temperatura e fotoperíodo não permitem a existência dum padrão sazonal regular de deposição de Verão – deposição de Inverno. No entanto, Morales-Nin (1988) refere a existência de

autores que determinaram a idade de peixes tropicais através da interpretação dos anéis anuais existentes nos otólitos

Para além destes problemas, foi também demonstrado que a idade do peixe e factores genéticos influenciam a formação dos *annuli* (Blacker, 1974 *in* Campana e Neilson, 1985), o mesmo se passa com a frequência de alimentação e com o fotoperíodo (Bilton, 1974 *in* Campana e Neilson, 1985). Morales-Nin *et al.* (1998) em estudos levados a cabo no Mediterrâneo concluíram que os anéis formados na pescada-branca (*Merluccius merluccius*), peixe que habita profundidades abaixo do termoclino, não podem ser considerados como *annuli*, sendo a formação destes mais dependente de factores fisiológicos do que temporais.

É de sublinhar que os próprios métodos de observação dos otólitos podem influenciar a classificação de uma determinada região como hialina ou opaca. Beckman e Wilson (1995) referem as condições de iluminação, ampliação e a variabilidade de interpretação dos investigadores, como potenciais fontes de dificuldades na correcta identificação das zonas hialinas/opacas. Tanto mais que a distinção entre zonas opacas e cristalinas não depende directamente da densidade óptica ou da taxa de deposição de cálcio, mas sim na transparência relativa de duas zonas adjacentes do otólitos.

No entanto, é comum na bibliografia consultada (*e.g.* Campana e Neilson, 1985) a opinião que a estimativa da idade através da contagem de anéis anuais (*annuli*) se aplica relativamente bem a peixes adultos de ambientes temperados, pois as vincadas alterações sazonais reflectem-se na existência de bandas opacas e translúcidas ao nível dos otólitos, as quais correspondem a um ano de vida do peixe.

1.1.2. Incrementos diários

Pannella, em 1971 (Campana e Neilson, 1985), constatou que os anéis observados nos otólitos dos peixes e interpretados como anuais, eram constituídos por unidades microestruturais de crescimento cujo número correspondia aproximadamente ao “*número de dias existentes num ano*”.

Verificou-se desse modo, ainda que indirectamente, que as referidas unidades de crescimento seriam de natureza circadiana. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de um método de determinação de idade e crescimento dos peixes muito preciso e que não apresentava os constrangimentos que se colocavam na análise dos *annuli*.

A largura destes microincrementos varia entre 1 μm e 12 μm (Wright *et al.*, 2002), sendo a sua deposição nos otólitos de peixes um fenómeno generalizado, encontrando-se descrita em espécies dos mais diferentes biótopos e latitudes (Campana e Neilson, 1985).

Quando observado ao microscópio óptico é possível constatar que um anel diário é formado por duas regiões: uma zona incremental (ou zona L), mais larga e translúcida, e uma zona descontínua (ou zona D), mais estreita e opaca (Campana e Neilson, 1985; Ré, 1993, 1999; Kalish *et al.*, 1995). Uma observação através de Microscopia Electrónica de Varrimento (Figura 5), também permite distinguir as duas zonas que constituem um anel diário: a zona incremental, que pode ser descrita como sendo uma região mais larga e mais clara e a zona descontínua, a qual é a mais estreita e escura (Campana e Neilson, 1985).



Figura 5 – Pormenor de otólito *sagitta* de *Liza ramada* visto ao microscópio electrónico de varrimento (barra = 8 micrómetros). A - Zona Incremental; B - Zona descontínua.

O seu crescimento resulta da deposição ininterrupta e diferencial de CaCO_3 e proteína durante um período de 24 horas (Brothers, 1981; Campana e Neilson, 1985; Mugiya, 1987; Ré, 1993, 1999; Morales-Nin, 2000), formando-se a porção rica em proteína durante a noite (Brothers, 1981; Mugiya, 1987).

A zona incremental é formada principalmente através da deposição de carbonato de cálcio, enquanto que a zona descontínua do microincremento resulta de uma deposição reduzida de carbonato de cálcio e de um aumento da deposição de proteína (Campana e Neilson, 1985; Ré, 1999; Wrigth *et al.*, 2002).

Considera-se que as alterações na concentração de cálcio do plasma e subsequentemente na endolinfa será a hipótese mais adequada para explicar os mecanismos responsáveis pelas variações no ritmo de acreção dos otólitos, bem como pela formação dos microincrementos (Mosegaard e Morales-Nin, 2000).

Mugiya (1987) conclui que o processo de calcificação do otólito é mais activo durante o dia, atingindo um pico máximo pelas 16 horas e diminuindo a partir daí até atingir um mínimo às 22 horas. O mesmo investigador verifica que o processo de deposição de aminoácidos também apresenta características cíclicas. Neste caso a taxa de deposição é muito baixa durante o dia – atingindo o mínimo pelas 16 horas – e aumenta durante a noite, sendo o período de maior actividade às 22 horas. É possível constatar que o período mais activo de deposição da matriz proteica do otólito ocorre quando a deposição de cálcio atinge o seu nível mais baixo, decorrendo estes ciclos em antifase.

Contudo, existem resultados contraditórios no que diz respeito ao período em que ocorre deposição da porção do microincremento rica em proteínas. Brothers (1981) refere que em *Haemulon flaviolentatum* (HAEMULIDAE) a porção rica em proteína se forma durante a noite. Ré *et al.* (1985) referem resultados experimentais semelhantes em larvas de *Sardina pilchardus* (CLUPEIDAE). Por seu lado, Ré *et al.* (1986) detectaram a formação da zona descontínua em larvas de *Dicentrarchus labrax* (MORONIDAE) durante as primeiras horas de luz. Os mesmos autores referem a obtenção de resultados semelhantes por parte de Tanaka *et al.* (1981). Parece que o

momento exacto em que se inicia a deposição de anéis diários varia consoante a espécie, sendo determinado independentemente para cada uma.

Jones (1986) refere a discrepância de resultados obtidos em estudos relativos ao efeito da luz, temperatura e alimentação na formação de microincrementos.

Taubert e Coble (1977) defendem que existe um relógio biológico interno desencadeado por ciclos de luz-escuridão de 24 horas, o qual será responsável pela formação de incrementos diários. Brothers (1978) *in* Campana e Neilson (1982) considerava a flutuação da temperatura como o factor chave na determinação do ritmo de deposição dos incrementos.

Campana e Neilson (1982) chegaram à conclusão que períodos de luz e temperaturas não naturais não desencadeiam um desvio assinalável do padrão diário de incrementos em peixes pré-condicionados com um ritmo natural. Estes autores sublinham que os resultados por eles obtidos não permitem afirmar que o fotoperíodo e a temperatura não têm efeito na deposição de incrementos, mas que um ritmo circadiano se mantém a despeito da influência que estes factores possam ter.

A deposição de anéis diários será, então, regida por um ritmo circadiano endógeno de crescimento que se encontra sob controlo endócrino (Campana e Neilson, 1985; Campana, 1992). O fotoperíodo seria o agente sincronizador do ritmo endógeno, sendo este susceptível a pequenas alterações por acção de outras variáveis ambientais (Campana e Neilson, 1985; Ré *et al.*, 1985 e 1986; Jones, 1986), nomeadamente a temperatura e a disponibilidade de alimento (Jones, 1986; Campana, 1992; Morales-Nin, 2000). Como resultado destas alterações, podem surgir incrementos subdiários de origem ambiental, para além daqueles que se depositam diariamente e resultam do ritmo endógeno do peixe.

Neilson e Geen (1985) consideram que o facto de peixes com múltiplas alimentações ao longo de 24 horas formarem mais de um incremento por cada 24 horas se deve à interacção entre um ritmo endógeno de produção de incrementos e um fenómeno ambiental de natureza regular.

Campana e Neilson (1985) também analisam resultados experimentais relativos à influência da alimentação na formação de incrementos diários nos

otólitos, concluindo ser improvável existir uma relação directa entre a alimentação e a formação de incrementos diários.

Jones (1986) faz referência a estudos experimentais relativos à influência de fotoperíodos anormais na deposição de microincrementos. A autora regista a existência de resultados contraditórios. Existem espécies onde fotoperíodos anormais interrompem a formação de incrementos diários e espécies onde a luz constante não altera a deposição de anéis diários. Relativamente à periodicidade da alimentação, Jones (1986) refere resultados experimentais indiciando que múltiplas alimentações ao longo do dia podem provocar o aparecimento de incrementos não diários.

Estudos recentes reforçam a ideia de que as condições ambientais, mediadas pela fisiologia do peixe, afectam o ritmo de crescimento do otólito, já a periodicidade de deposição dos materiais só é alterada em casos extremos de *stress* fisiológico (Morales-Nin, 2000).

Em suma: o crescimento dos otólitos é um fenómeno extremamente complexo, integrando vários factores (endógenos e exógenos), embora sempre regulados pela fisiologia do peixe.

Um problema que se colocou inicialmente à interpretação dos incrementos diários em otólitos de peixes foi o aparecimento de microincrementos, com uma periodicidade de formação diferente da diária e que pareciam infirmar a natureza circadiana da formação destes.

Estudo levados a cabo por Campana *et al.* (1987) em *Clupea harengus* (CLUPEIDAE) permitiram concluir que a determinação da idade, crescimento e estimativas da mortalidade baseadas na análise de microincrementos de otólitos podem ser influenciadas pela capacidade de resolução do microscópio óptico, a qual não permite distinguir os incrementos que se encontrem separados por uma distância inferior ao seu limite de resolução, sendo estes observados como se fossem um só. Segundo estes autores, a própria determinação de marcas de eclosão pode ser afectada pela resolução do microscópio óptico, pois aquilo que se considera como sendo uma marca, pode ser o resultado da observação de um conjunto de incrementos diários muito juntos. Para Campana *et al.* (1987) a aparente susceptibilidade dos otólitos das larvas pelágicas ao problema da falta de resolução do microscópio óptico é o

resultado da baixa taxa de crescimento dos seus otólitos quando comparados com o que se passa com os juvenis.

Campana *et al.* (1987) avançam com uma hipótese explicativa da observação de incrementos não diários baseada na limitação da capacidade de resolução dos microincrementos observados, o que fará com que se confunda os anéis diários, resultantes dum ritmo circadiano de deposição, com anéis não diários, resultantes de flutuações de temperatura ou de alimento disponível no meio. A irregularidade de tamanho e contraste destes últimos não é detectável com o poder de resolução do microscópio óptico, pelo que em muitas investigações foram confundidos com os verdadeiros incrementos diários.

Jones e Brothers (1986) também tinham concluído que o uso de microscopia óptica pode resultar numa estimativa errada da idade de larvas de *Morone saxatilis*.

Os incrementos subdiários, quando confundidos com incrementos diários, podem levar a uma sobrestimação da idade e a uma subestimação da taxa de crescimento somático (Neilson, 1992).

Os anéis diários existentes nos otólitos são uma boa ferramenta para a determinação da idade de larvas e juvenis. É importante ter em atenção que variáveis tais como a temperatura, o fotoperíodo, a frequência de alimentação e os ritmos endógenos podem afectar os mecanismos de deposição dos microincrementos, quer ao nível da sua largura quer ao nível do seu número. Como tal é importante ter em atenção a necessidade de validar a natureza diária dos incrementos (Ver Capítulo 1.2.1.1.).

Um outro problema que se coloca aquando da análise de microincrementos de otólitos em populações selvagens é a existência de um grande número de estímulos ambientais que podem afectar o número de microincrementos depositados, bem como a sua largura (Neilson *et al.*, 1985). Em situações naturais, parece ser altamente provável que vários fenómenos cíclicos com períodos diferentes coexistam, o que poderá provocar um desvio na periodicidade diária de deposição dos microincrementos, pelo que esse aspecto deverá ser devidamente acautelado aquando dos trabalhos experimentais.

1.1.3. Marcas

Um aspecto característico da estrutura dos otólitos é a existência de marcas (Figura 6). Estas são típicas de todas as espécies (Wright *et al.*, 2002) e a sua origem nunca foi devidamente definida, principalmente devido ao grande número de causas responsáveis pela sua formação e ao seu aspecto muito variável (Gauldie, 1990; Campana, 1992). Surgem em períodos de intenso *stress* ambiental para o peixe, eclosão, metamorfose, transições de habitat (Campana, 1983 *in* Campana, 1992; Campana e Neilson, 1985; Morales-Nin, 2000) e correspondem a zonas de crescimento reduzido ou mesmo de interrupção de crescimento do otólito. Pensa-se que estas são devidas a mudanças na sua estrutura cristalina.

A datação da sua formação é um processo relativamente simples, bastando para isso contar o número de incrementos diários existentes entre a marca e a periferia do otólito (data de captura) e validar essa contagem. As marcas podem ser utilizadas para datar acontecimentos relevantes na vida do peixe, nomeadamente a maturidade sexual (Pannella, 1980; Campana, 1983 *in* Campana e Neilson, 1985), as mudanças de ambiente ou a eclosão (Marshall e Parker, 1982; Neilson e Geen, 1982 *in* Campana e Neilson, 1985).



Figura 6 – Pormenor de otólito *sagitta* de *A. presbyter*. As setas vermelhas assinalam marcas (barra=10 micrómetros)

1.2. Aplicações do estudo da microestrutura dos otólitos

O estudo dos otólitos é importantíssimo para a caracterização das populações piscícolas, pois para além de permitir caracterizar as suas estruturas etárias e as suas taxas de crescimento, permite também, determinar rotas de migração, caracterizar a salinidade e temperatura dos meios anteriormente ocupados pelos peixes, detectar fenómenos de anadromia, (Campana, 1999) datar alguns dos aspectos mais importantes dos seus ciclos de vida, identificar *stocks*, efectuar estimativas de recrutamento e de mortalidade (Campana e Neilson, 1985; Ré, 1999). Permite também a marcação química em massa e a marcação natural dos peixes (Campana, 1999).

Em termos genéricos, o estudo da microestrutura dos otólitos pode fornecer dois tipos de informações: uma baseada na contagem dos incrementos diários; outra sustentada num exame rigoroso das características de cada incremento (Brothers, 1981).

A contagem dos incrementos diários permite determinar com bastante rigor a idade dos peixes com idade até um ano. A partir desta informação será possível estimar o crescimento médio do indivíduo, bem como a data de nascimento. Com base nestes últimos dados, será possível obter informações sobre a mortalidade, recrutamento e determinação de locais prováveis de desova (Garland, 1987). A determinação da idade dos peixes é fundamental para a gestão e estudo de pescarias. Parâmetros determinados pela idade, como a mortalidade e crescimento, são a base dos modelos de dinâmica populacional usados na análise de pescarias (Morales-Nin, 1992).

A determinação da idade poderá fornecer outros dados, tais como a estrutura etária de uma determinada população, a idade de primeira maturação, a frequência de posturas, as respostas a nível individual e populacional a alterações de habitat bem como o sucesso ao nível do recrutamento (Morales-Nin, 1992).

Estudos relativos às características dos incrementos, seja o seu diâmetro, conteúdo proteico ou existência de incrementos subdiários ou marcas, fornecem informações relativas ao crescimento diário e às condições ambientais vividas pelo peixe.

O uso de otólitos na interpretação de “acontecimentos” da história de vida de um peixe baseia-se em três premissas: as taxas de deposição dos incrementos são aproximadamente constante e conhecidas durante a fase em estudo; os otólitos registam fielmente acontecimentos da história do peixe (se existirem alterações no ambiente ou na fisiologia do peixe, estas ficarão registadas no otólito); os registos dos otólitos são contínuos (o crescimento do otólito não pára, nem este é reabsorvido).

No que diz respeito à determinação da idade de peixes adultos, o estudo dos microincrementos, para além de nos poder fornecer uma estimativa precisa da idade dos indivíduos também poderá servir para validar a natureza temporal dos *annuli* ou das marcas existentes ao nível da estrutura dos otólitos (Garland, 1987; Morales-Nin, 1988, 1992). São disto exemplo os trabalhos de Morales-Nin *et al.*, (1998), Al-Hossaini *et al.* (2001) e Waldron e Kerstan (2001).

Para além de informações relativas à idade e crescimento do peixe, também se pode inferir o momento em que ocorrem eventos específicos na vida do peixe a partir da análise dos seus otólitos. A eclosão e as metamorfoses podem provocar alterações na deposição dos constituintes dos otólitos. Um exemplo desta situação é o que ocorre nos PLEURONECTIFORMES *Platichthys stellatus*, *Pleuronectes platessa* (Al-Hossaini *et al.*, 1989; Sogard, 1991), *Pleuronectes americanus* (Jearld *et al.*, 1993) e *Scophthalmus aquosus* (Neuman *et al.*, 2001). Durante as suas metamorfoses surgem novos focos de crescimento do otólito, os quais podem ser usados como marcadores temporais da metamorfose nestas espécies, bem como de alterações de habitat.

Diferenças no tamanho dos incrementos diários foram correlacionadas com transições na vida dos peixes, alterações das condições ambientais e factores fisiológicos (Campana e Neilson, 1985; Neilson *et al.*, 1985; Jones, 1986; Ré, 1999). É neste contexto que Ré (1993; 1999) estabelece uma analogia entre os otólitos dos peixes e as caixas negra de um avião. Isto no

que diz respeito à possibilidade de se detectar e datar acontecimentos ecológicos importantes do ciclo de vida de um peixe a partir do estudo dos seus otólitos.

A grande dificuldade em interpretar a deposição de microincrementos nos otólitos resulta, em grande parte, da complexidade estrutural destes. Os otólitos são os órgãos responsáveis, em primeira análise, pela transdução das vibrações sonoras e manutenção do posicionamento dinâmico e estático do peixe. Este facto condicionar a sua forma. Não podemos esquecer que as estruturas que podemos utilizar para determinar a idade serão o resultado de mudanças, dependentes do tempo, nos processos fisiológicos que determinam a forma e tamanho do otólito.

Uma outra dificuldade que se pode colocar é aquela que Gauldie (1990) constatou em otólitos de *Hoplostethus atlanticus* (TRACHICHTHYIDAE). Estes possuem duas fases minerais de aragonite na região do sulco (inferior) e do anti-sulco (superior). Estas diferenças na fase mineral caracterizam-se por diferenças na direcção de crescimento do cristal, o que, por sua vez altera o padrão de anéis observados na parte superior e inferior do otólito. O que dificulta a reconciliação de determinações de idades obtidas nestas duas zonas do otólito.

1.2.1. Determinação da Idade

A determinação da idade dos peixes é um aspecto fundamental para a correcta gestão das pescarias (Gauldie e Nelson, 1990). Ela está na base de modelos de controlo e exploração adequada dos recursos pesqueiros (Garland, 1987).

A determinação da idade de um peixe pode ser feita em duas escalas: Anual e diária. A primeira é usada principalmente para cálculo das capturas possíveis de obter mantendo os recursos em equilíbrio e estudos populacionais (Campana, 2001). A segunda está principalmente associada a estudos de recrutamento e de estados larvares (Campana e Neilson, 1985).

Numa escala anual, a determinação da idade de um peixe, baseada em parâmetros mensuráveis (diâmetro, raio, área, peso) dos otólitos apresentaria, à partida, vantagens relativamente às técnicas tradicionais, as quais se sustentam na contagem dos *annuli*. Pawson (1990) indica como vantagens, a maior facilidade no tratamento dos dados, a facilidade de padronização de critérios e a maior objectividade de análise. No entanto, Pawson (1990) testou a utilização do peso dos otólitos na determinação da idade de *Sardinella aurita* (CLUPEIDAE), concluindo que não era possível determinar a idade dos indivíduos unicamente a partir deste parâmetro.

Numa espécie em que a formação diária de incrementos tenha sido validada, o número de microincrementos será proporcional, embora não necessariamente igual, à idade do peixe (Campana e Jones, 1992), pelo que poderá ser efectuado um cálculo muito aproximado da idade real. No entanto, como Jones (1986) refere, o fotoperíodo, a periodicidade da alimentação e a flutuação da temperatura são factores importantes na determinação da periodicidade de formação dos incrementos. Quando estes factores se encontram dentro dos seus valores normais, é natural que a deposição dos incrementos se faça diariamente. Quando os peixes experimentam condições

para lá dos limites toleráveis é também natural que a periodicidade de deposição dos incrementos não seja exactamente diária.

Casas (1998) constatou que nos otólitos de larvas de *Pleuronectes americanus*, quando sujeitas a temperaturas inferiores a 5º C, não ocorria deposição de microincrementos. Como em condições naturais são atingidas temperaturas inferiores, a determinação da idade de *P. americanus* através da contagem dos microincrementos dos seus otólitos nem sempre é aplicável.

Para uma determinação correcta da idade de um peixe a partir da análise dos incrementos diários dos seus otólitos é necessário obter a idade do indivíduo aquando da formação do primeiro incremento, bem como assegurar uma correcta contagem e validação dos incrementos diários (Jones, 1986 e 1992). A idade de formação do primeiro incremento pode ser determinada através da detecção do momento em que espécimes criados em laboratório depositam o primeiro microincremento ou assumindo-se que a deposição ocorreu aquando da eclosão, ou da absorção do saco vitelino. A contagem de microincrementos pode também iniciar-se a partir de qualquer marca existente no otólito à qual se possa associar uma data precisa (Campana e Jones, 1992). No entanto, tais suposições podem não ser válidas (Campana e Neilson, 1985; Jones, 1986). Se tal acontecer todas as estimativas de idades feitas a partir desses dados estarão distorcidas. Além disso, a formação do primeiro incremento varia muito de espécie para espécie, em algumas espécies surge antes da eclosão (Neilson e Geen, 1982 *in* Campana e Neilson, 1985) e noutras por altura da primeira alimentação exógena (Brothers *et al.*, 1976 *in* Campana e Neilson, 1985). Sem o conhecimento de quando os incrementos diários se começam a formar, a contagem dos incrementos diários com o objectivo de estimar a idade do peixe é de interesse relativo (Neilson, 1992). Campana e Neilson (1985) fazem referência à possibilidade de a eclosão, para certas espécies, não ser um acontecimento fisiologicamente relevante, pelo que nesses casos não será detectada qualquer marca no otólito, o que irá inviabilizar a determinação da idade do peixe unicamente a partir da contagem dos incrementos diários.

A determinação da idade de um peixe a partir da contagem dos incrementos diários é, aparentemente, uma tarefa fácil. No entanto, na realidade, o exame da microestrutura dos otólitos é dificultado pela subjectividade associada à sua análise. Entre os problemas que se colocam ressalta a existência de marcas ou interrupções do crescimento (Campana e Neilson, 1985; Campana, 1992; Neilson, 1992), bem como a incorrecta interpretação de incrementos subdiários como sendo diários. Esta última fonte de erro toma especial relevância aquando de estudos utilizando o Microscópio Óptico.

As estimativas da distribuição etária dos peixes são normalmente usadas para criar modelos de dinâmica populacional. Logo, erros na estimativa da composição etária certamente levam a uma má interpretação da dinâmica populacional.

Beamish e McFarlane (1995) referem a existência de dois tipos de erros associados à determinação da idade dos peixes, os quais podem afectar a exactidão e a precisão dessa determinação. Estes autores consideram que exactidão é *“... a relação entre a idade estimada e a real...”* e precisão será *“... a reprodutibilidade de uma determinada estimativa de idade...”*.

Para Beamish e McFarlane (1995) os erros relacionados com a exactidão da estimativa das idades podem ser ultrapassados com uma validação do método de análise. Relativamente aos erros relacionados com a precisão, estes autores consideram-nos mais difíceis de ultrapassar. Beamish e McFarlane (1995) consideram possíveis dois tipos de erros ao nível da precisão. O mais comum resulta da variabilidade entre as estimativas de idades de diferentes investigadores e tende a diluir a verdadeira distribuição etária ao imputar incorrectamente idades das classes mais fortes às mais fracas. O tipo de erro menos comum tem a ver com um enviesamento sistemático dos investigadores que imputam idades de classes mais fracas às que se sabe serem mais fortes, o que provoca o efeito contrário ao anteriormente referido.

Campana (2001) refere duas fontes de erro na estimativa da idade dos peixes: erros de processo, associados à estrutura do otólito a ser examinado, que podem ser ultrapassados com uma validação correcta da frequência de deposição dos microincrementos e erros associados à subjectividade inerente

à estimativa da idade, ou seja, às diferenças de interpretação dos otólitos entre investigadores e laboratórios.

As fontes de erro indicadas por Beamish e McFarlane (1995) e Campana (2001), como facilmente se constata, são as mesmas.

Tem-se procurado um método objectivo de distinguir os anéis diários dos subdiários, mas os métodos utilizados para o efeito baseiam-se em análises subjectivas da aparência da microestrutura dos otólitos e não numa clara compreensão do seu processo de formação (Neilson, 1992). Os critérios normalmente utilizados para se fazer esta distinção são:

- Incrementos com limites “difusos”, mais baixos e que se fundem com outros incrementos são incrementos não diários (Wild, 1986 *in* Neilson, 1992)
- Grossura relativa e conteúdo proteico (Brothers, 1988 *in* Neilson, 1992)
- Definição visual aquando de observação com Microscópio Óptico (Taubert e Coble, 1977 *in* Neilson, 1992)

Parece difícil resolver o problema colocado pela existência de incrementos subdiários através de critérios objectivos durante a fase de contagem dos incrementos. A única solução para obviar a este problema parece ser uma cuidada validação dos resultados obtidos.

Wilson *et al.* (1983) *in* Geffen (1992) definem validação como sendo “a confirmação da natureza temporal de um incremento. É usada para determinar o rigor da determinação de uma idade”, Powles (1966) *in* Santos (1987) considera que cabe à validação o “estabelecimento da relação realmente existente entre as marcas periódicas e o tempo”, para Santos (1997) a validação “consiste na verificação da correspondência entre as marcas periódicas e uma determinada escala temporal”.

Campana (2001) indica que o objectivo da validação deveria ser a confirmação da idade absoluta dos peixes. O mesmo autor reconhece que o que normalmente ocorre, é a validação da frequência de formação de um

incremento através da validação da deposição dos incrementos apenas para alguns grupos etários.

Quando a validação da idade absoluta não é possível, Campana (2001) recomenda dois passos experimentais a efectuar: determinar a idade de formação do primeiro incremento e verificar a periodicidade de formação dos incrementos ao longo de todo o leque de idades com interesse, nomeadamente os grupos etários mais jovens e mais velhos.

Francis (1995) sublinha as diferentes interpretações que o termo “validação” tem na literatura. Para este autor coexistem duas perspectivas. A de sentido mais restrito, na qual “validação” se aplica à confirmação da natureza temporal de uma qualquer marca. E a de sentido mais lato, que se refere a todo o processo de determinação da idade. Neste ponto de vista a validação teria como objectivo demonstrar que uma dada técnica de determinação de idade seria precisa.

Idealmente, a validação deveria passar pela monitorização de uma população de idade conhecida desde a sua eclosão até à idade pretendida, num meio que contribuísse para um bom crescimento dos indivíduos e para um comportamento natural por parte dos peixes.

Existe o risco de o crescimento dos otólitos de peixes em condições de cativeiro ser diferente do que ocorre em condições naturais, particularmente no caso de larvas e juvenis mais pequenos, os quais são mais sensíveis a qualquer alteração do meio, devido ao seu pequeno tamanho, fragilidade e hábitos alimentares particulares (Campana e Neilson, 1985; Joyeux *et al.*, 2001), o que tornaria erróneo todo o processo de validação. Por isso, Geffen (1992) considera que o ambiente ideal para estudos de validação seria um grande recinto exterior onde o fotoperíodo e os ciclos de temperatura reflectissem as condições naturais.

As técnicas utilizadas para validar o ritmo de deposição de materiais nos otólitos normalmente envolvem a marcação e posterior morte dos indivíduos, contando-se o número de incrementos entre a marca e a sua morte. Numerosos problemas podem surgir do facto de se criar os animais em cativeiro, pois o *stress* resultante do manuseamento, das condições de

manutenção ou da alimentação inadequada pode afectar o crescimento dos otólitos.

Existem diversos métodos de validação, os quais podem implicar a utilização de técnicas mais ou menos complexas. Campana *et al.* (1990) utilizaram a relação entre a composição em ^{210}Pb e em ^{226}Ra do núcleo de otólitos de *Sebastes mentella* (SEBASTIDAE) para validar a periodicidade de deposição dos *annuli* dessa espécie. Andrews *et al.* (1999) também utilizaram esse método para validar as determinações de idades efectuadas através da contagem de *annuli* em *Coryphaenoides acrolepsis* (MACROURIDAE).

Gjosaeter *et al.* (1984) in Joyeux *et al.* (2001) apresentam um método de validação da periodicidade de deposição de *annuli* sem envolver a marcação dos otólitos. A periodicidade foi testada através de uma regressão linear entre o número de incrementos e a data de captura. Joyeux *et al.* (2001) utilizam o mesmo princípio aplicando-o à validação de microincrementos. No entanto, estes autores referem algumas limitações ao método que utilizaram. A sua utilização restringe-se a peixes tropicais, onde a inexistência de anéis de Inverno não limita a leitura dos microincrementos; aplica-se somente a larvas e juvenis, pois a reprodução poderia induzir crescimento mais lento e ritmos anormais de deposição

Campana (2001) fez uma análise crítica das diferentes técnicas de validação do crescimento diário e anual de peixes. Por ordem decrescente do seu valor científico, o autor considera os seguintes métodos:

- Libertação de peixes de idade conhecida e sua posterior recaptura;
- Determinação do carbono radioactivo incorporado nos peixes proveniente de testes nucleares;
- Marcação e recaptura de peixes marcados quimicamente;
- Datação radioquímica do núcleo do otólito;
- Análise da progressão da moda do comprimento dos peixes ao longo do tempo;

- Marcação resultante de fenómenos naturais com datação precisa;
- Análise dos incrementos marginais;
- Criação de peixes em cativeiro.

Após uma revisão de 372 artigos publicados entre 1983 e 2001, Campana (2001) constata que o método de validação da deposição diária de microincrementos mais utilizado é a criação de peixes em cativeiro. Sendo referido em mais de 90% dos artigos referentes ao crescimento diário analisados por Campana (2001). No que diz respeito à validação do crescimento ao nível anual, o autor refere que a maioria dos trabalhos utiliza a análise dos incrementos marginais, um dos métodos menos rigorosos que existe para levar a cabo tal tarefa.

Mesmo após uma correcta validação, continuam a poder existir erros na interpretação das estruturas devido à subjectividade inerente a essa tarefa. Para tentar ultrapassar esse constrangimento, Campana (2001) sugere a implementação de um sistema de colecções de referência de otólitos, o que iria permitir controlar a consistência de interpretação dos otólitos entre diferentes investigadores bem como de um investigador ao longo do tempo.

1.2.2. Determinação do crescimento e modelos de crescimento.

A obtenção de modelos de crescimento devidamente parametrizados é um resultado típico do estudo de otólitos (Campana e Jones, 1992). A determinação do crescimento de peixes larvares e juvenis é muitas vezes efectuada usando o crescimento diário dos otólitos como um indicador do crescimento somático. Esta metodologia baseia-se na proporcionalidade existente entre o crescimento somático e o dos otólitos. A relação estabelecida raramente é linear ao longo de todo o desenvolvimento do indivíduo, pensa-se que este facto se deve a alterações na taxa de crescimento somático relacionadas com mudanças metabólicas associadas à maturação sexual (Harkonen, 1986), bem como a uma grande diversidade de factores

ambientais, tais como temperaturas extremas, reduzida disponibilidade de alimento e baixos níveis de O₂ dissolvido (Neuman *et al.*, 2001).

Diversos investigadores identificaram pontos de inflexão na relação entre o crescimento somático e o crescimento dos otólitos durante os primeiros períodos de ontogenia (Sogard, 1991; Jearld *et al.*, 1993; Neuman *et al.*, 2001).

Uma explicação para este facto é referida por Neuman *et al.* (2001). Citando Mugyia e Tanaka (1992), Neuman *et al.* (2001) referem que, enquanto uma componente do crescimento dos otólitos está dependente dos mesmos processos bioquímicos que controlam o crescimento somático - o que fará com que ambos respondam de uma forma bastante semelhante a um determinado acontecimento – uma outra componente do crescimento dos otólitos pode ser controlada por processos físico-químicos independentes dos processos biológicos que controlam o crescimento somático. O papel dos otólitos na manutenção do equilíbrio pode ser determinante na existência desta última componente.

Um outro aspecto relevante que importa sublinhar é o facto de indivíduos com um crescimento somático mais lento apresentarem otólitos maiores e mais pesados do que peixes do mesmo tamanho com crescimento mais rápido (Reznick *et al.*, 1989; Secor e Dean, 1989; Wright *et al.*, 1990).

Secor e Dean (1989) explicam as diferenças nos tamanhos relativos dos otólitos com base no mecanismo inerente à sua formação. Segundo estes autores, sendo a formação dos incrementos diários contínua e controlada por ritmos endógenos, se a deposição continua mesmo quando o crescimento somático é muito baixo ou nulo, então o ritmo de aumento dos otólitos excederá o ritmo de crescimento somático, resultando em otólitos relativamente maiores em peixes com um crescimento somático mais lento. Estas diferenças nas dimensões dos otólitos poderão fornecer um índice do crescimento relativo que será útil para estabelecer comparações entre populações de peixes.

É de sublinhar que Fey (2001) refere resultados obtidos por Munk (1993) e Folkvord *et al.* (2000) em que não se observa diferenças na relação entre o comprimento do otólito e o comprimento do peixe em larvas caracterizadas por diferentes ritmos de crescimento. Um outro resultado experimental interessante é referido por Casas (1998), que observou a formação de otólitos relativamente mais pequenos em larvas de *Pleuronectes americanus* com um crescimento

mais lento. Esta diferença de resultados parece indicar que, muito frequentemente, o crescimento dos otólitos poderá estar mais correlacionado com o ritmo metabólico do peixe do que com o seu crescimento somático (Fey, 2001)

Estudos levados a cabo por Barber e Jenkins (2001) revelam a existência de crescimento dos otólitos de *Sillaginodes punctata* (SILLAGINIDAE) quando o crescimento somático é negligenciável. Os mesmos autores concluíram que enquanto o crescimento somático é influenciado pela quantidade de alimento disponível, o crescimento dos otólitos está relacionado com a temperatura da água, a qual tem um papel preponderante relativamente ao alimento.

Destes resultados é possível concluir que há a possibilidade de, em determinadas condições, existir ao nível do curto prazo (11-12 dias) uma perda da relação entre o crescimento dos otólitos e o crescimento somático.

O facto de o crescimento dos otólitos estar mais dependente da temperatura do que do alimento disponível parece querer indicar que o ritmo de acreção de materiais nos otólitos estará relacionado primariamente com o ritmo metabólico do peixe (Barber e Jenkins, 2001). Então, a relação que se estabelece entre o crescimento dos otólitos e o crescimento somático resulta do facto deste último estar também relacionado com a taxa metabólica.

Barber e Jenkins (2001) não registam uma desconexão a longo prazo entre o crescimento dos otólitos e o crescimento somático de *Sillaginodes punctata*. Estes autores consideram que isto se deve à existência de flutuações de curto prazo ao nível da temperatura e alimento disponível, as quais se acabaram por anular.

O trabalho experimental de Barber e Jenkins (2001) parece indicar que a análise do crescimento dos otólitos nem sempre é um indicador preciso do crescimento somático, principalmente no que diz respeito a períodos de tempo reduzidos. Este efeito diferencial da alimentação e da temperatura pode ter implicações significativas em estudos onde se pretenda estimar o crescimento somático a partir do crescimento dos otólitos. Principalmente se no meio natural existirem flutuações da temperatura e do alimento disponível.

Resultados contraditórios com os obtidos por Barber e Jenkins (2001) são referidos por Folkvord *et al.* (2000). Estes autores registam um aumento do

crescimento dos otólitos de larvas de *Clupea harengus* em resposta a um aumento da densidade de presas.

A partir do momento em que se pode relacionar a idade e o comprimento de cada indivíduo podem-se obter modelos de crescimento.

O cálculo do crescimento pode-se basear em equações resultantes de modelos empíricos ou de modelos mais ou menos padronizados (por exemplo: regressão linear, modelo de Gompertz, modelo de von Bertalanffy). A vantagem destes últimos é que lhes estão associados parâmetros facilmente interpretáveis por qualquer investigador da área (Campana e Jones, 1992).

Os modelos assentes numa regressão linear são muito utilizados para a descrição do crescimento de um peixe ao longo de um determinado intervalo de tempo durante o qual o ritmo de crescimento se tenha mantido constante (Campana e Jones, 1992). Fey (2001) descreve o crescimento de várias coortes de *Clupea harengus* através de regressões lineares.

No entanto, de acordo com Campana e Jones (1992) os modelos curvilíneos são particularmente indicados para a descrição do crescimento de larvas. Os modelos exponenciais, de potência, de Gompertz, logístico e de von Bertalanffy, são os mais utilizados dentro deste grupo. A escolha entre estes baseia-se essencialmente na maior capacidade de ajuste que os modelos revelem relativamente aos resultados obtidos.

Os modelos exponenciais¹ e de potência² podem ser usados nos casos em que a curva de crescimento não apresenta pontos de inflexão. São adequados para descrever curtos períodos de crescimento em larvas (Campana e Jones, 1992).

¹ A forma mais usada deste modelo é: $L = ae^{GX}$

Onde a é o comprimento médio quando $t=0$; G é uma constante representativa do coeficiente de crescimento e X é a idade do peixe (Campana e Jones, 1992)

² A forma mais usada deste modelo é: $L = aX^b$

Onde a é o comprimento médio quando $t=0$; b é uma constante representativa do coeficiente de crescimento e X é a idade do peixe (Campana e Jones, 1992)

O modelo de Gompertz³ tornou-se o modelo mais usado na descrição do crescimento de larvas (Campana e Jones, 1992). No entanto, a sua aplicação a todas as fases da vida de um peixe é difícil (Campana e Jones, 1992). Este modelo é bastante adequado para curvas de crescimento sigmóides e caracteriza-se por as regiões antes e após o ponto de inflexão não serem simétricas (Campana e Jones, 1992). Jearld *et al.* (1993) aplicaram este modelo aos primeiros dois meses de vida de *Pleuronectes americanus*. Al-Hossaini *et al.* (1989) também aplicaram o modelo de Gompertz ao crescimento de larvas de *Pleuronectes platessa*. Ekau e Blay (2000) descrevem o crescimento de larvas de *Sarotherodon melanotheron* (CICHLIDAE) através do modelo de Gompertz. O mesmo fazendo Quiñonez-Velázquez (1999) com as espécies *Melanogrammus aeglefinus* (GADIDAE) e *Pollachius virens* (GADIDAE) e D'Amours *et al.* (1990) com *Scomber scombrus* (SCOMBRIDAE).

A aplicação do modelo logístico⁴ normalmente resulta numa curva muito semelhante à obtida com o modelo de Gompertz. A diferença reside no facto de no modelo logístico as porções da curva antes e após o ponto de inflexão serem simétricas (Campana e Jones, 1992).

O modelo de von Bertalanffy⁵ é tipicamente utilizado para descrever o crescimento de peixes adultos, podendo também ser aplicado ao período juvenil e larvar, embora tenha menor aplicabilidade a estes períodos do que os restantes modelos (Campana e Jones, 1992). O modelo de von Bertalanffy aplica-se a curvas de crescimento sem pontos de inflexão, pelo que não se aplica crescimentos sigmóides (Ralston e Williams, 1988). Pertierra e Morales-

³ A forma mais usada deste modelo é: $L_t = L_0 e^{k(1-e^{-at})}$

Onde L_t é o comprimento médio na idade t ; L_0 é o comprimento médio quando $t=0$; k é um parâmetro adimensional; t é a idade do peixe; a é a taxa de crescimento quando $t=t_0$, sendo t_0 a idade média a partir da qual a taxa de crescimento começa a diminuir, ou seja o ponto de inflexão da curva (Quiñonez-Velázquez, 1999)

⁴ A forma mais usada deste modelo é: $L_t = L_\infty \left(1 + e^{[-G(t-t_0)]}\right)^{-1}$

Onde G é a taxa de crescimento instantâneo na origem da curva; t_0 é a idade no ponto de inflexão (idade com taxa de crescimento máximo); t é a idade; L_∞ representa o comprimento assintótico médio. (Campana e Jones, 1992)

⁵ A forma mais usada deste modelo é: $L_t = L_\infty (1 - e^{-K(t-t_0)})$.

Onde t é a idade do peixe; L_t é o comprimento médio na idade t ; L_∞ representa o comprimento assintótico médio; K é uma constante representativa do coeficiente de crescimento; t_0 é a idade que o peixe teria se o seu comprimento fosse zero (Francis, 1995)

Nin (1989) utilizaram o modelo de von Bertalanffy para descrever o crescimento de *Sardina pilchardus* (1 a 8 anos de idade) do Mar da Catalunha. Morales-Nin e Ralston (1990) também utilizaram este modelo para descrever o crescimento no LUTJANIDAE *Lutjanus kasmira* (1 a 6 anos de idade). Karlou-Riga (2000) também utilizou este modelo para descrever o crescimento de *Trachurus mediterraneus* (CARANGIDAE). O mesmo se passou com Masuda *et al.* (2000), que descreveram o crescimento de *Platycephalus indicus* (PLATYCEPHALIDAE) através do modelo de von Bertalanffy, Mug-Villanueva *et al.* (1994) com *Cynoscion albus* (SCIAENIDAE) e Massuti *et al.* (1999) com *Coryphaena hippurus* (CORYPHAENIDAE).

Apesar de mais usados, estas não são as únicas equações que descrevem o crescimento. Outros autores pensam que se devem incluir outras variáveis, como a temperatura e a disponibilidade de alimento. Campana e Hurley (1989) desenvolveram um modelo que associa a temperatura à parametrização do modelo de crescimento. Esta associação tem especial interesse quando se estuda amostras recolhidas de ambientes heterogêneos ou durante épocas diferentes do ano. O modelo, segundo os seus autores, demonstra também grande relevância quando a diferença de temperaturas é elevada ou o crescimento das espécies estudadas é muito sensível a pequenas alterações de temperatura. É neste contexto que Campana e Jones (1992) sublinham a inexistência de modelos de crescimento que incluam a temperatura e o alimento nos seus termos e que possam ser facilmente parametrizáveis no terreno.

Os modelos de crescimento resultantes de trabalhos experimentais servem como veículos para o teste de hipóteses. No entanto, estudos relativos ao crescimento de larvas em estado selvagem utilizam principalmente modelos de crescimento baseados em regressões Idade – Comprimento (Campana e Hurley, 1989). Esta situação reflecte a dificuldade que modelos mais complexos têm na sua parametrização, nomeadamente no que diz respeito à alimentação e temperatura. É de sublinhar que juntamente com a idade, estas duas variáveis são as que têm mais peso na determinação do crescimento das larvas. Como resultado desta parametrização incompleta os modelos resultantes não são verdadeiramente aplicáveis a diferentes massas de água, estações e populações (Campana e Hurley, 1989).

1.2.3. Retrocálculo

O retrocálculo do crescimento dos peixes a partir da medição de uma série de microincrementos nos otólitos é um das mais importantes aplicações do estudo dos microincrementos (Campana e Jones, 1992). Francis (1990) define retrocálculo como sendo *"...uma técnica que utiliza uma série de medidas efectuadas no peixe num determinado momento, para inferir o seu tamanho em momentos anteriores."*

Teoricamente, através do tamanho de um conjunto de incrementos diários e da relação entre o tamanho do peixe e o tamanho do otólito é possível determinar o tamanho e a taxa de crescimento para cada dia da vida de um peixe. Na realidade, este tipo de cálculo sofre uma série de dificuldades ao nível operacional e teórico (Campana e Jones, 1992)

O retrocálculo do crescimento baseado no estudo dos otólitos fundamenta-se na assunção que a relação entre o tamanho do peixe e do otólito é proporcional ao longo do tempo (Vigliola *et al.*, 2000). Sendo a frequência de formação dos microincrementos também constante ao longo do tempo e a distância entre microincrementos consecutivos proporcionais ao crescimento do peixe (Campana e Jones, 1992; Vigliola *et al.*, 2000).

Campana e Jones (1992) referem a existência de espécies em que a correlação entre o tamanho do peixe e o tamanho do otólito é não-linear. Nestes casos o retrocálculo torna-se mais difícil, só sendo possível entre intervalos de valores em que essa relação possa ser descrita matematicamente.

Os comprimentos dos peixes obtidos a partir de retrocálculo têm sido utilizados para uma multiplicidade de fins. Nomeadamente aumentar o número de dados relativos ao comprimento em diferentes idades para ajustar curvas de crescimento ou estimar o comprimento em idades dificilmente observáveis (Francis, 1990). Curvas de crescimento criadas a partir de comprimentos obtidos por retrocálculo permitem comparar os ritmos de crescimento entre sexos, coortes e populações da mesma espécie, bem como relacionar os ritmos de crescimento a diversos factores exógenos (Francis, 1990).

A comprovação do pressuposto relativo à proporcionalidade entre o crescimento do otólito e o crescimento do peixe é realizada a partir de correlações determinadas experimentalmente entre estes dois aspectos (Campana e Jones, 1992). No entanto, estudos referidos por Campana (1990), por Campana e Jones (1992) e por Morita e Matsuishi (2001) indicam que a relação comprimento do peixe/comprimento do otólito pode variar sistematicamente com a taxa de crescimento somático, o que acarreta a existência de otólitos relativamente grandes em peixes de crescimento lento (Reznick *et al.*, 1989; Secor e Dean, 1989).

Morita e Matsuishi (2001) referem ainda estudos em que se constata um aumento do tamanho do otólito mesmo quando o crescimento somático é zero. Também existem resultados (Campana e Neilson, 1985; Barber e Jenkins, 2001) que apontam para a existência de uma dessincronização entre a data em que ocorre o aumento de tamanho no peixe e o aumento do otólito, o qual é mais uma potencial fonte de erro aquando do retrocálculo.

Os métodos tradicionais de retrocálculo baseiam-se no princípio que a relação comprimento do peixe/comprimento do otólito não varia ao longo do tempo de uma forma sistemática com o ritmo de crescimento (Campana, 1990; Campana e Jones, 1992). Campana (1990), Sirois *et al.* (1998), Vigliola *et al.* (2000) e Morita e Matsuishi (2001), entre outros autores, desenvolveram modelos de retrocálculo para ultrapassar o problema causado pelas já referidas mudanças na relação comprimento do peixe/comprimento do otólito ao longo do tempo, nomeadamente devido a mudanças ontogénicas e pela dependência do tamanho do otólito relativamente ao crescimento somático.

Campana (1990) desenvolveu o método do “*Biological Intercept*” (BI), o qual se baseia na determinação experimental do momento em que se inicia uma relação de proporcionalidade entre o crescimento do peixe e do otólito. O autor refere que esse momento ocorre aquando da eclosão.

Pelo que foi referido anteriormente, o uso do tamanho dos incrementos como indicadores do crescimento instantâneo de peixes é algo que deve ser feito com muita precaução, devendo ser adoptados todos os cuidados ao nível de um rigoroso controlo experimental (Campana e Neilson, 1985) e uma análise matemática cuidada.

1.2.4. Determinação de alterações fisiológicas e ambientais

Estudando as marcas existentes nos otólitos, bem como a composição química destes, é possível datar (ao nível do dia) quer acontecimentos marcantes do ciclo de vida (metamorfoses, maturação sexual), quer alterações de habitat por parte dos peixes (Jones, 1992).

O retrocálculo do crescimento dos indivíduos a partir da análise dos microincrementos, já referido no capítulo 1.2.3., poderá ser correlacionado com factores ambientais. Este tipo de estudo alarga o campo de uso da análise dos microestrutural dos otólitos da simples determinação de idades e crescimento para a obtenção da estrutura populacional, migração e comportamento dos peixes.

O momento de migração de peixes anádromos pode ser determinado pela observação de mudanças na largura dos incrementos dos otólitos (Neilson *et al.*, 1985), bem como por alterações na relação entre o Cálcio e o Estrôncio existente na sua composição (Jones, 1992).

Campana e Thorrold (2001) referem que é possível reconstruir a história ambiental de um indivíduo a partir do estudo dos seus otólitos. Já em 1969 Degens *et al.* referiam que dados obtidos a partir da análise isotópica (Carbono e Oxigénio) dos otólitos permitiam concluir que a aragonite se formava em equilíbrio isotópico com a água. Pelo que se poderia distinguir peixes que tivessem habitado diferentes massas de água ao longo das suas vidas.

Vários estudos utilizaram a composição isotópica dos otólitos em Carbono (*e.g.* Schwarcz *et al.*, 1998) e em Oxigénio e Carbono (*e.g.* Gao e Beamish, 1999; Campana e Thorrold, 2001) para determinar a temperatura média da água habitada por um peixe, bem como para obter informação sobre as tendências migratórias dos peixes.

Existem também estudos referindo a composição química do otólito como um indicador fiável da concentração de alguns elementos (Estrôncio e Bário) na massa de água. A análise do Estrôncio existente no otólito é também utilizado como um indicador da salinidade do meio onde o peixe se encontrou

em determinado momento da sua vida (Friedland *et al.*, 1998; Bath *et al.*, 2000; Secor e Rooker, 2000), podendo ser utilizada como registo de migrações de peixes entre habitats com diferentes salinidades. Secor e Rooker (2000) analisam criticamente o uso do Estrôncio dos otólitos para mapear os movimentos estuarinos dos peixes. Embora registem a existência de uma relação entre o teor de Estrôncio dos otólitos e a salinidade dos habitats, estes autores sublinham a escassez da investigação relativa ao papel da temperatura, estágio ontogénico e estado fisiológico do peixe no teor de Estrôncio existente no otólito. Pelo que sugerem prudência nas conclusões que se possam vir a tirar desta quantificação. Para tal, deverá ser feita uma análise rigorosa no que diz respeito à influência dos factores atrás referidos na deposição de Estrôncio nos otólitos antes de se poder avaliar a utilidade deste elemento químico como indicador da história de peixes estuarinos.

É importante sublinhar que, tal como Campana e Thorrold (2001) afirmam, embora existam elementos químicos constituintes dos otólitos que podem ser usados como indicadores das condições ambientais, para a maioria não será possível estabelecer qualquer relação.

Vários autores (*e. g.* Neilson e Geen, 1985; Neilson *et al.*, 1985; Thorrold e Williams, 1989) têm utilizado as variações na largura dos microincrementos e as interrupções de crescimento (marcas) para detectar transições ao longo do ciclo de vida dos peixes, nomeadamente as mudanças de habitat.

A deslocação de um ambiente marinho para um meio estuarino, estará associada a alterações ao nível da temperatura da água e/ou do regime alimentar. Naturalmente, estas alterações irão reflectir-se na microestrutura do otólito.

Neilson *et al.* (1985) utilizaram as alterações na largura dos microincrementos de otólitos de *Oncorhynchus tshawytscha* (SALMONIDAE) para determinar o momento de entrada destes no estuário. Campana (1984) in Campana e Neilson (1985) utilizou as mudanças nos tamanhos dos microincrementos para detectar o momento de metamorfose em *Platichthys stellatus*. Fischer (1999) através da análise da largura dos microincrementos em *Lota lota* (LOTIDAE) detectou o momento de em que os indivíduos desta espécie deixam de ser pelágicos e passam a bentónicos.

Neuman *et al.* (2001) associaram a formação de centros de crescimento acessórios no otólito à finalização da migração do olho em *Scophthalmus aquosus* e à adoção de hábitos bentônicos por parte desta espécie. Sogard (1991) constata a correlação entre a metamorfose em *Pseudopleuronectes americanus* e o aparecimento de centros de crescimento acessório.

A identificação das mudanças de habitats (ou de formas de vida – estádios de desenvolvimento) unicamente baseadas em alterações no tamanho dos incrementos ou no aparecimento de interrupções do crescimento são difíceis e caracterizam-se por um elevado teor de subjectividade (Campana e Neilson, 1985), pelo que poderão (e deverão) ser complementadas por uma análise à constituição química dos otólitos.

Para além dos constituintes químicos dos otólitos, também é possível utilizar os seus dados biométricos para identificar diferentes *stocks* ou mananciais. Os otólitos possuem uma série de características mensuráveis, ao nível da morfometria linear e superficial, da densidade óptica, da zonação microestrutural e dos padrões de crescimento bem como das relações entre as dimensões e peso dos otólitos e as dimensões e peso do corpo do peixe (Begg *et al.*, 2001).

As diferenças ao nível das dimensões dos otólitos podem servir para distinguir fenotipicamente duas populações (DeVries *et al.*, 2002), pois diferenças ao nível das taxas de crescimento entre populações terão reflexos na estrutura dos otólitos. Variações no crescimento do peixe alteram a taxa de crescimento dos cristais dos otólitos, o que irá determinar o tamanho e a forma dos cristais individuais e, em última análise, o tamanho e a forma do próprio otólito (Gauldie, 1990 *in* Begg *et al.*, 2001). Dai que populações sujeitas a condições ambientais diferentes terão otólitos morfologicamente diferentes. Os quais poderão ser usados para discriminar fenotipicamente essas mesmas populações.

Begg *et al.* (2001) estudaram diferentes populações de *Melanogrammus aeglefinus* (GADIDAE) na região de George Bank – Atlântico Norte. Estes investigadores chegaram à conclusão que os dados biométricos dos otólitos são úteis para a identificação de *stocks*, mas não para a sua discriminação,

pois existe uma sobreposição significativa entre as variáveis biométricas em estudo.

Por seu lado, DeVries *et al.* (2002) através da análise da forma dos otólitos de *Scomberomorus cavalla* (SCOMBRIDAE) conseguiram distinguir indivíduos provenientes de *stocks* diferentes e discriminar as suas origens aquando da coabitação das populações.

Há referências (e. g. Rybock *et al.*, 1975 in Neilson *et al.*, 1985) à utilização das dimensões (comprimento e área) do núcleo de otólitos para a identificação de *stocks*. No entanto, Neilson *et al.* (1985) constata que em Salmonídeos, a variação de dimensões dos núcleos impedem a sua utilização como critério para identificação de *stocks*.

1.2.5. Estimativas de recrutamento e mortalidade

Como já foi referido, a análise da microestrutura dos otólitos permite determinar a data de nascimento dos diferentes peixes, bem como a sobrevivência de uma determinada classe etária.

A capacidade de determinar a idade dos peixes ao nível do dia, bem como a de colocar um determinado peixe numa determinada coorte, permite estimar a mortalidade e definir uma relação quantitativa entre, por um lado, a mortalidade e características ambientais (temperatura, correntes, padrões de desova) e, por outro lado, a abundância das coortes (Jones, 1992). Uma determinação precisa da idade dos peixes está na base de cálculos exactos de taxas de crescimento e mortalidade, bem como na determinação da altura em que as perdas devido ao recrutamento são maiores (Quiñonez-Velázquez, 1999). Dessa forma é possível avaliar os factores que influenciam o recrutamento.

A capacidade de quantificar a abundância e sobrevivência de uma determinada classe etária é uma melhoria significativa relativamente à estimativa da mortalidade baseada unicamente no tamanho dos indivíduos (Campana e Jones, 1992). Pois o tamanho em peixes jovens não é um bom

indicador de idade, visto ser comum um determinado grupo de indivíduos de tamanhos semelhantes conter uma grande variedade de idades (Campana e Jones, 1992).

A tentativa de discriminação das diferentes coortes de espécies com um período de postura mais ou menos prolongado através da análise de curvas de frequência de comprimentos é frequentemente afectada pelas diferentes taxas de crescimento dos indivíduos. O método clássico para determinar a taxa de crescimento de larvas de peixes passava pela análise da distribuição da frequência de comprimentos. Como Wang e Tzeng (1999) referem, este método pode ser afectado por alterações das taxas de crescimento típicas de uma determinada idade ou coorte e como os seus valores dizem respeito a períodos de meses ou ano, podem não permitir distinguir acontecimentos críticos para os indivíduos que se desenrolem em escalas temporais ao nível do dia ou da semana.

Por seu lado, a análise dos otólitos permite a obtenção de informação detalhada acerca do crescimento das formas larvares de peixes (Campana e Neilson, 1985). Determinar a idade de uma larva através da contagem dos incrementos diários vai permitir relacionar o comprimento do indivíduo com uma determinada idade. A partir desta informação é possível calcular curvas de crescimento e estimar a distribuição temporal dos nascimentos (Thorrold e Williams, 1989).

Como foi referido anteriormente, a análise dos incrementos diários dos otólitos permite uma quantificação directa da relação entre o comprimento do peixe e a sua idade. A qual pode ser usada no cálculo da taxa de crescimento e da distribuição natural dos nascimentos. A partir destes dados, a variabilidade das taxas de crescimento pode ser analisada numa escala temporal e espacial.

Como Wang e Tzeng (1999) referem, através do retrocálculo da distribuição das datas de eclosão é possível discriminar as diferentes coortes produzidas em espécies com períodos de postura prolongados, bem como as diferenças entre as suas taxas de crescimento. Estes autores, através da análise da microestrutura dos otólitos, estudaram as diferentes taxas de crescimento em coortes de *Encrasicholina punctifer* e *Engraulis japonicus*

(ambos ENGRAULIDAE), chegaram à conclusão que em larvas de *E. punctifer* existem diferenças ao nível das taxas de crescimento das diferentes coortes, o que não ocorria em *E. japonicus*.

Inúmeros factores bióticos e abióticos podem afectar a sobrevivência dos peixes durante a sua fase larvar. Em espécies com um período de postura longo é possível que as proles que eclodem em diferentes momentos experimentem condições ambientais diferentes, o que se irá reflectir na sua sobrevivência.

Pequenas variações nas taxas diárias de crescimento e mortalidade parecem influenciar o recrutamento, especialmente se ocorrerem na fase larvas (Narimatsu e Munehara, 1999). Podendo provocar variações da duração de fases de desenvolvimento em que a mortalidade é mais ou menos elevada (Wang e Tzeng, 1999).

A microestrutura dos otólitos pode revelar informação sobre as condições ambientais experimentadas pelo peixe. Nomeadamente alterações da temperatura da água e da quantidade de alimento disponível (Neilson *et al.*, 1985, Thorrold e Williams, 1989). Dessa forma será possível relacionar a maior ou menor sobrevivência duma coorte com algumas condições ambientais

A variabilidade das taxas de mortalidade e de crescimento diário dos estados larvares de peixes, podem ser facilmente determinados com base no estudo dos microincrementos, dessa forma é possível estabelecer uma relação entre alterações ambientais ou fisiológicas e as taxas de mortalidade ou de crescimento. O que permite determinar qual (ou quais) os factores que afectam estas últimas. Por exemplo, Neilson *et al.* (1985) verificaram que o crescimento de juvenis de *Oncorhynchus tshawytscha* no estuário do Rio Sixes (Oregon – E.U.A.) depende da sua densidade e é limitado pela disponibilidade de alimento.

1.3. Principais métodos utilizados na preparação de otólitos para observação em Microscópio Electrónico de Varrimento

O Microscópio Electrónico de Varrimento deverá ser utilizado no estudo de microincrementos de otólitos com largura inferior a $1\mu\text{m}$ (Campana e Neilson, 1985; Secor *et al.*, 1992), pois a partir deste valor o limite de resolução dos Microscópios Ópticos não permite uma identificação fiável dos microincrementos.

Entre as vantagens da utilização do Microscópio Electrónico de Varrimento pode-se referir (Campana e Neilson, 1985): o elevado poder de resolução, a inexistência de artefactos ópticos, a possibilidade de efectuar contagens e medições a partir de fotografias.

Entre as desvantagens da sua utilização é de sublinhar a necessidade de equipamentos caros e de operação complexa e a necessidade de uma preparação das amostras mais morosa e complexa do que para microscopia óptica (Campana e Neilson, 1985; Jones e Brothers, 1986).

No sentido de uma melhor compreensão do crescimento dos otólitos, investigações recentes têm utilizado a Tomografia de Raios-X para obter uma imagem em três dimensões, bem como a distribuição de densidade no otólito. Hamrin *et al.* (1999) têm vindo a desenvolver essa técnica e, segundo esses autores, será dessa forma possível uma determinação mais fiável e rápida da idade dos peixes.

Têm sido também testadas diferentes técnicas de microscopia electrónica de varrimento (*e.g.* Waldron e Gerneke, 1997). Os autores referidos utilizaram detectores de electrões retrodifundidos, o que torna desnecessário proceder ao realce dos otólitos. No entanto, esta técnica não apresenta vantagem ao nível do detalhe da imagem obtida relativamente à técnica clássica de microscopia electrónica de varrimento (Waldron e Gerneke, 1997).

Os diferentes passos para a preparação de otólitos para observação em Microscópio Electrónico de Varrimento encontram-se detalhadamente descritos em Secor *et al.* (1992) e McCurdy *et al.* (2002). Basicamente, a preparação para observação em Microscópio Electrónico de Varrimento pode-se dividir em cinco etapas:

- Montagem do otólito em meio adequado (Permout, bálsamo do Canadá; Euparal, Spurr, Epon, LR White, resinas epoxy, colas termoplásticas, hidroximetil metacrilato, entre outros). Na análise bibliográfica efectuada sobre o assunto, não se encontrou uma clara predominância de qualquer destes meios.
- Desgaste dos otólitos, para dessa forma se obter uma secção ao longo de um plano que contenha todos os incrementos existentes ao nível da sua microestrutura. Utiliza-se uma grande variedade de discos abrasivos, com granularidades muito variadas. Para finalizar esta fase de preparação deve-se efectuar um polimento com uma lixa de grão fino ou pasta de alumina, para dessa forma se obter uma superfície de observação mais uniforme.
- *Etching* ou realce da superfície; com esta fase pretende-se obter um relevo tridimensional da superfície previamente desgastada, aumentando o contraste entre as zonas descontínuas e incrementais do microincremento. Para o efeito tem-se utilizado classicamente três agentes (Secor *et al.*, 1992; McCurdy *et al.*, 2002): HCl diluído (0,1-2%), EDTA (5-7%) e Glutaraldeído (2%), com períodos diversos de incubação. Seria de esperar que estas substâncias químicas reagissem principalmente com o CaCO_3 , mas efectivamente desalojam inicialmente a matriz orgânica. O que faz com que, frequentemente, estes métodos não permitam uma correcta distinção entre a região incremental e a descontínua. Mais recentemente foi utilizada, com bastante sucesso, a Proteinase K para aumentar o contraste e a visibilidade dos microincrementos em algumas espécies de peixes, pois esta substância dissolve a componente

proteica do otólito, não degradando o CaCO_3 (Shiao *et al.*, 1999). A generalização do uso da Proteinase K, para realce de otólitos de outras espécies poderá ser um contributo importante para a melhoria das condições de análise dos microincrementos de otólitos.

- Revestimento da superfície a observar com filme de Ouro ou Carbono em câmara de vácuo
- Observação em Microscópio Electrónico de Varrimento.

1.4. Caracterização das espécies em estudo

Caracterização dos Mugilidae – *Chelon labrosus* (Risso, 1826), *Liza ramada* (Risso, 1826); *Liza aurata* (Risso, 1810)

Espécies de Habitat pelágico, penetram nos estuários e lagunas litorais. Permanecem nestes meios durante a fase juvenil, sendo rara a sua ocorrência na fase adulta (Antunes *et al.*, 1988; Rebelo, 1993).

Os Mugilídeos são espécies com fases de colonização dos estuários longas, no caso da Ria Formosa, este período pode atingir os 4 anos (Monteiro, 1989). Sendo a sua postura oceânica, o seu recrutamento à área estuarina é feito na fase pós-larvar.

O recrutamento de *Chelon labrosus* na Ria Formosa ocorre em Fevereiro/Março, com um comprimento médio de 3,2 cm (Monteiro, 1989). No estuário do Mondego, o recrutamento desta espécie teve início em Abril com um comprimento próximo de 6 cm (Sobral, 1999).

Monteiro (1989) refere que na Ria Formosa, *Liza aurata* é recrutada em Outubro, com um comprimento médio de 2,0 cm, assistindo-se à migração das classes 2⁺ e 3⁺ no início do Verão. Sobral (1999) obteve resultados muito semelhantes no Estuário do Mondego: recrutamento da coorte 0⁺ em Setembro/Outubro, com um comprimento médio de 2,9 cm.

L. ramada, no estuário do Mondego, tem o seu recrutamento em Abril, com um comprimento médio de 2,7 cm (Sobral, 1999).

Estas espécies alimentam-se de Diatomáceas bentónicas, Algas epífitas, pequenos invertebrados e detritos (Ben-Tuvia, 1986; Muus *et al.*, 1998).

Apresentam o corpo alongado, cabeça larga, achatada no topo, duas barbatanas dorsais bem separadas. Não possuem linha lateral.

Para se proceder à identificação destas espécies durante o estado juvenil utilizam-se os seus padrões de pigmentação (Reay e Cornell, 1988;

Serventi *et al.*, 1996), bem como o número e disposição dos cecos pilóricos (Garcia e Moyano, 1990).

Cunha (1994) refere a existência a capturas destas espécies na Ria de Aveiro, estuário do Mondego, estuário do Tejo, Lagoa de Albufeira, estuário do Sado, estuário do Mira, na Ria de Alvor, Lagoa de Santo André, Ria Formosa. Em Portugal há também a assinalar as capturas na Lagoa de Óbidos (Moura e Gordo, 2000)

Caracterização do Peixe-Rei – *Atherina presbyter* Cuvier, 1829.

É uma espécie que habita regiões perto da costa e zonas estuarinas, onde podem permanecer durante toda a sua vida (Antunes *et al.*, 1988; Monteiro, 1989; Rebelo, 1993; Sobral, 1999).

Alimenta-se de pequenos Crustáceos e larvas de peixes (Quignard e Pras, 1986).

Apresentam um corpo estreito com duas dorsais bem separadas, uma banda prateada ao longo dos flancos e cauda bifurcada. Os indivíduos atingem 20 cm de comprimento máximo (Saldanha, 1997) e uma idade entre os 3 e 4 anos. Com um ano de idade atingem 7 cm (Quignard e Pras, 1986).

Cunha (1994) refere a existência de capturas desta espécie na Ria de Aveiro, estuário do Mondego, estuário do Tejo, Lagoa de Albufeira, estuário do Sado, estuário do Mira, na Ria de Alvor, Lagoa de Santo André, Ria Formosa.

1.5. Âmbito e objectivos do trabalho

O âmbito deste trabalho insere-se na problemática da gestão e ordenamento dos recursos pesqueiros e da exploração racional dos recursos zoológicos marinhos. O conhecimento preciso dos ciclos de vida das espécies, nomeadamente a sua época de reprodução, idade de primeira maturação, idade de entrada em ambiente estuarino (quando aplicável), recrutamento, mortalidade, taxa de crescimento, é um factor de primordial importância para uma correcta gestão dos recursos.

Com este trabalho pretende-se:

- Determinar a idade (em dias) dos peixes em estudo;
- Determinar a data de nascimento dos peixes em estudo;
- Determinar a data de entrada, em dias, no sistema estuarino;
- Determinar as taxas de crescimento dos peixes em estudo;
- Caracterizar a microestrutura dos otólitos das espécies estudadas;

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Efectuaram-se 2 amostragens em 11 de Fevereiro e 20 de Agosto de 2002 na margem esquerda do estuário do rio Douro - Cabedelo (41°08'N e 08°39'W).

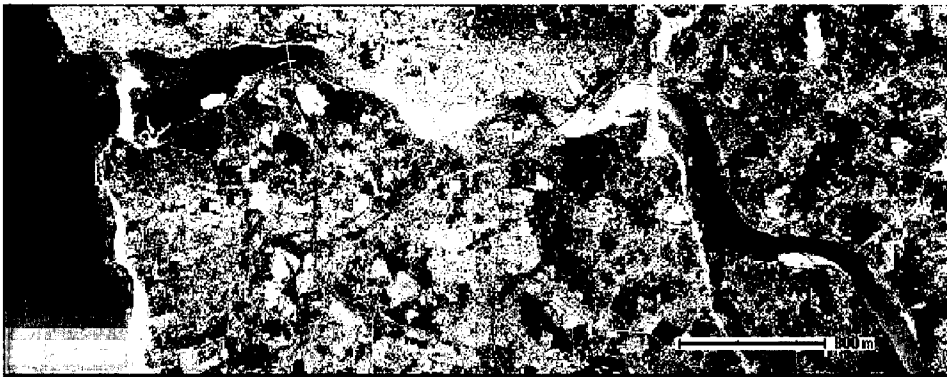


Figura 7 - Fotografia aérea do estuário do rio Douro. X - Ponto de Amostragem (adaptado de <http://ortos.cnig.pt/igeoe>)

O ponto de amostragem foi seleccionado atendendo ao facto de anteriormente já ter sido utilizado com sucesso para a captura de indivíduos com a arte de pesca utilizada no presente trabalho (Santos⁶, *com. pers.*)

A captura dos indivíduos foi efectuada com recurso a uma rede envolvente-arrastante *chinha*. Esta é constituída por um saco de 4 metros de comprimento e 2 de altura e por duas asas com 5 metros de comprimento e 2 de altura máxima. A malhagem da rede no vazio é de 2 cm e a do saco de 0,3 cm. A escolha desta arte deveu-se ao facto de apresentar os melhores resultados em substratos arenosos e baixa selectividade para indivíduos de pequenas dimensões (Rebelo, 1993).

Como não se pretendia uma análise populacional da fauna piscícola do estuário do Douro, mas sim uma quantificação do seu crescimento nas fases mais precoces, foram rejeitados todos os indivíduos capturados com um comprimento superior a 15 centímetros.

Foi capturado um total de 207 indivíduos (*Liza aurata* – 33 indivíduos; *L. ramada* – 36; *Chelon labrosus* – 102; *Atherina presbyter* – 32; *Diplodus sargus* - 4), os quais foram imediatamente colocados em formaldeído tamponado a

⁶ Professor Doutor Paulo Santos, Faculdade de Ciências da U. Porto.

10% para posterior análise laboratorial. Determinou-se o seu comprimento total ao milímetro mais próximo e o peso total em balança digital Sartorius (0,01 g), bem como se procedeu à extracção dos otólitos *sagitta* através de corte transversal da cabeça dos indivíduos ao nível da parte posterior do crânio passando pela parte posterior do osso pré-opercular.

A identificação dos indivíduos foi feita recorrendo a Ben-Tuvia (1986), Bauchot e Hureau (1986), Quignard e Pras (1986)

Dada a grande semelhança morfológica dos juvenis das diferentes espécies de Mugilídeos, para a sua identificação com mais segurança, houve a necessidade de recorrer à análise dos seus padrões de pigmentação (Reay e Cornell, 1988; Serventi *et al.*, 1996), bem como do número e disposição dos cecos pilóricos (Garcia e Moyano, 1990).

Os otólitos, depois de limpos, foram armazenados em pequenos tubos plásticos (Eppendorfs) com água destilada durante 48 horas. Posteriormente, procedeu-se à determinação do seu comprimento máximo ao micrómetro mais próximo, utilizando uma lupa binocular com câmara vídeo acoplada e o programa de análise e tratamento de imagem LEICA QWIN V 2.3. Optou-se por quantificar o diâmetro maior do otólito (Figura 8), entre o *rostrum* e o *postrostrum*, porque o crescimento do diâmetro maior do otólito está mais intimamente relacionado com o crescimento dos peixes do que o crescimento do diâmetro menor (Cruz e Rebelo, 2000)

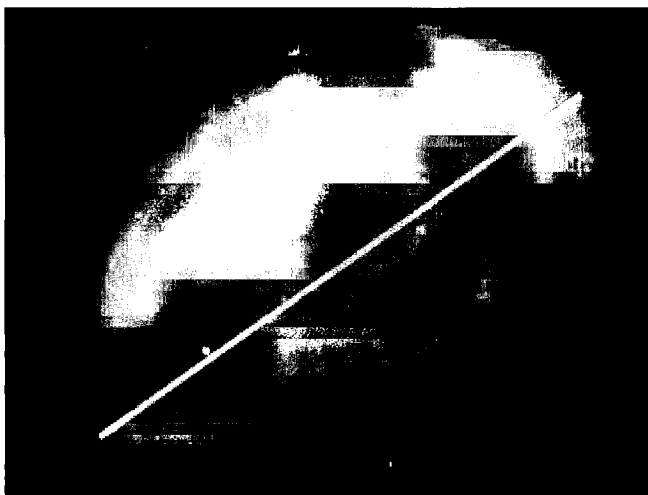


Figura 8 - Fotografia de otólito *sagitta* de *Liza aurata*, com indicação do eixo de medição do comprimento máximo. Comprimento do eixo igual a 2309 μm .

Os otólitos foram posteriormente armazenados a seco em pequenos tubos plásticos (Eppendorfs). Após secagem em estufa, durante uma hora, a 50°C e arrefecimento em excicador, determinou-se o seu peso em microbalança electrónica Precisa 205A SCS (0,1 mg). Como o peso de uma fracção não negligenciável dos otólitos era de 0,1 mg, considerou-se que a balança em questão não oferecia uma margem de erro suficiente para permitir uma quantificação segura do conjunto das peças obtidas. Assim, optou-se por não utilizar o peso dos otólitos em qualquer cálculo.

Para o estudo da microestrutura dos otólitos foram preparadas 248 peças (Figura 9) . Procedeu-se à montagem dos *sagittae* em blocos de resina epoxy (Struers Specifix – 20 ou ATM Kem-91). Cada bloco foi desgastado na face interna do plano sagital do otólito até se atingir o seu núcleo. Para o desgaste dos blocos utilizou-se uma lixadeira/polideira de um disco (Struers LABOPOL-5) e discos abrasivos de granularidade decrescente (Struers Waterprof Silicon Carbide Paper 1000 e 4000). Posteriormente procedeu-se ao polimento das peças com alumina (Struers AP-Fin com grão 0,3 micrómetros) em disco de flanela molhado (Struers OP-FELT), com observação frequente à lupa binocular para controle do polimento.

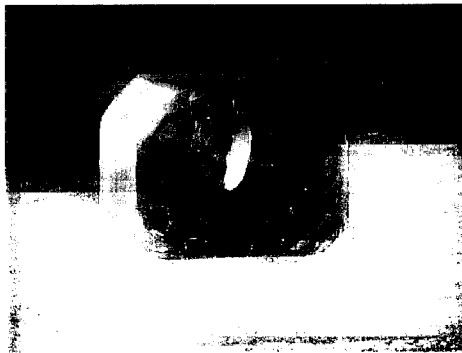


Figura 9 – Imagem de bloco de resina epoxy contendo otólito.

Os blocos depois de polidos e lavados foram novamente observados em lupa binocular, tendo sido escolhidos 138 para continuação da preparação. Os restantes blocos foram rejeitados porque o desgaste/polimento não tinha permitido a obtenção de um plano ao nível do núcleo do otólito.

Os blocos seleccionados foram lavados com água destilada em tina de ultra-sons (Bandelin Sonorex RK 31) durante 30 minutos. Seguidamente procedeu-se ao *etching* dos otólitos com HCl (0,1%) ou EDTA (5%) durante diferentes intervalos de tempo (desde 20 segundos a 2 minutos). Após lavagem com água destilada, os blocos foram colocados sobre um cilindro de alumínio e revestidos com ouro numa câmara de pulverização catódica. Procedeu-se à sua observação no microscópio electrónico de varrimento, JEOL JSM-6301-F, instalado no Centro de Materiais da Universidade do Porto.

De todos os otólitos observados, seleccionaram-se para contagem e medição dos microincrementos, os que apresentavam o núcleo visível, permitiam a medição do diâmetro do otólito e possuíam microincrementos observáveis em extensão apreciável. Para tal procedeu-se à digitalização das respectivas imagens obtidas no microscópio electrónico de varrimento e tratou-se informaticamente as mesmas com o programa ADOBE PHOTOSHOP 7.0 seguindo as principais indicações referidas por Troadec e Benzinou (2002)

As peças seleccionadas foram: 16 de *Liza aurata*, 18 de *Liza ramada*, 20 de *Chelon labrosus* e 13 de *Atherina presbyter*.

Nos indivíduos onde não era possível a contagem de todos os microincrementos, desde o núcleo até à fronteira do otólito, optou-se por contabilizar todos os incrementos visíveis e extrapolar para a totalidade do eixo de contagem, assumindo proporcionalidade entre o comprimento do eixo do otólito e a quantidade de incrementos. Foi tomada em consideração a existência de zonas do otólito com diferente largura média dos microincrementos, como tal, subdividiu-se o eixo em secções em número adaptado a cada otólito. A contagem dos microincrementos realizou-se do núcleo em direcção à periferia do otólito.

A metodologia adoptada no sentido de se determinar a idade de entrada dos indivíduos no estuário do Rio Douro, baseou-se na alteração do padrão de deposição dos microincrementos nos otólitos. Contaram-se todos os incrementos desde a marca de nascimento até à marca profunda que limita o tipo de crescimento em ambiente marinho como referem, entre outros autores,

Neilson *et al.* (1985), altura em que o padrão de deposição dos microincrementos se altera (Jones, 1992).

Foram efectuados Testes *t* para duas amostras emparelhadas para verificar as possíveis diferenças de comprimento entre os otólitos direito e esquerdo de um mesmo indivíduo (Zar, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as duas colheitas realizadas, recolheu-se um total de 207 indivíduos, registando-se a presença de 5 *taxa* pertencentes a 3 famílias de Teleósteos.

Da família MUGILIDAE estiveram presentes *Liza aurata*, *L. ramada* e *Chelon labrosus*, os quais no seu conjunto representaram 82,6% do número total de capturas.

Conjuntamente com os mugilídeos também foram capturados espécimes de *Diplodus sargus* (SPARIDAE), uma espécie marinha, conhecida por ser dependente de sistemas estuarinos, principalmente nas primeiras fases de vida e *Atherina presbyter* (ATHERINIDAE), espécie usualmente associada aos ambientes estuarinos. Na tabela 1 reúne-se a informação sobre a quantidade e as dimensões dos peixes capturados. Os espécimes de *D. sargus* apresentam um comprimento médio de 7,98 cm e um peso médio de 15,53 g. Os indivíduos de *A. presbyter* capturados caracterizam-se por possuir um comprimento médio de 5,58 cm e um peso médio de 1,31 g.

Tabela 1 - Número de indivíduos capturados, comprimento (cm) e peso (g) mínimos e máximos.

Espécie	Nº de Indivíduos	Comprimento(cm)		Peso(g)	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
<i>L. aurata</i>	33	3,1	8,1	0,30	4,77
<i>L. ramada</i>	36	2,0	8,2	0,09	5,91
<i>C. labrosus</i>	102	2,5	8,1	0,17	4,74
<i>A. presbyter</i>	32	2,7	7,0	0,13	2,48
<i>D. sargus</i>	4	5,8	13,5	3,01	50,16

O comprimento e peso médio dos indivíduos de *L. aurata* capturados foi respectivamente 6,4 cm e 2,79 g, para *L. ramada* os valores médios obtidos para os dois parâmetros em questão foram 3,63 cm e 0,72 g. Por seu lado, *C. labrosus* apresenta um comprimento médio de 4,16 cm e um peso médio de 0,96 g. Estes valores de comprimento e peso dos indivíduos não são

representativos das populações em questão visto a sua amostragem ter sido selectiva (Conforme o já referido no capítulo 2).

Para os juvenis das quatro espécies mais abundantes determinou-se a relação entre o comprimento total e o peso total dos indivíduos. Utilizaram-se os dados da totalidade de juvenis de cada espécie recolhidos. Para *D. sargus*, considerou-se que, dado o escasso número de indivíduos capturados, era estatisticamente inviável qualquer tratamento dos dados obtidos.

As relações peso-comprimento ($W_t = a * L_t^b$) cujas expressões estimadas são apresentadas na Tabela 2 apresentam relações estatisticamente significativas.

Tabela 2 - Relações peso – comprimento ($W_t = a * L_t^b$) dos indivíduos capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto 2002. As espécies com efectivos inferiores a 5 indivíduos não foram incluídas. r^2 = coeficiente de determinação; N= número de indivíduos; p= nível de significância.

Espécie	Equação	r^2	N	p
<i>L. aurata</i>	$W_t = 0,0091 * L_t^{3,0086}$	0,995	33	< 0,05
<i>L. ramada</i>	$W_t = 0,0092 * L_t^{3,0385}$	0,972	36	< 0,05
<i>C. labrosus</i>	$W_t = 0,00128 * L_t^{2,8607}$	0,991	102	< 0,05
<i>A. presbyter</i>	$W_t = 0,0058 * L_t^{3,0848}$	0,991	32	< 0,05

Na Figura 10 estão representados os valores observados e as curvas ajustadas de acordo com os parâmetros da Tabela 2 para os juvenis de cada espécie analisada. Em todos os casos apresentados, a variação do peso é explicada em mais de 95% pela variação do comprimento dos indivíduos.

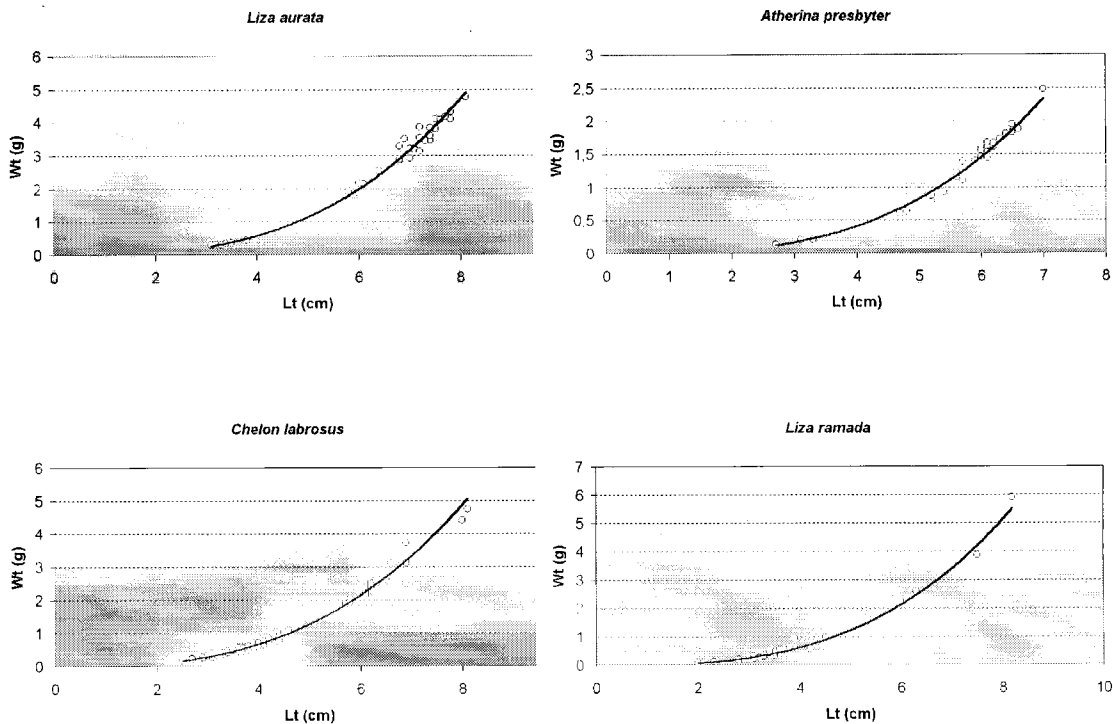


Figura 10 - Relações peso – comprimento ($W_t = a \cdot L_t^b$), das espécies de juvenis de Teleóstéo capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto 2002. As espécies com efectivos inferiores a 5 indivíduos não foram incluídas (W_t = peso; L_t = Comprimento total).

As espécies apresentaram, durante o período em estudo, um padrão de crescimento em comprimento e peso aproximadamente isométrico, com valores de b muito próximos de 3 (Tabela 2). Em todas as espécies, com excepção de *C. labrosus*, na qual se constata um ligeiro desvio, verificou-se uma isometria entre o peso e o comprimento.

Comparando os valores obtidos neste trabalho em *L. aurata*, *L. ramada* e *A. presbyter* com os obtidos por Cruz e Rebelo (2000) para as mesmas espécies na Ria de Aveiro (Tabela 3), pode-se constatar que existe uma grande similaridade de resultados no que concerne ao carácter isométrico da relação entre o incremento do peso e do comprimento nestas espécies. Mesmo tendo em atenção que Cruz e Rebelo (2000) estudaram indivíduos com um comprimento superior (Comprimento máximos: *L. aurata* – 24,2 cm; *L. ramada* – 19,1 cm; *A. presbyter* – 12,6 cm) aos analisados neste trabalho.

Monteiro (1989) e Sobral (1999) também relacionaram o comprimento e o peso de MUGILIDAE na Ria Formosa e no Estuário do Mondego, respectivamente (Tabela 3), tendo também obtido valores de relação isométricos. No entanto, os indivíduos estudados são de um comprimento/peso muito superiores aos do presente trabalho (e.g. *L. aurata* – 40 cm; *L. ramada* – 33 cm), pelo que as comparações dos parâmetros obtidos com os do presente trabalho deverão ter esse aspecto em consideração.

Moura e Gordo (2000) relacionaram o peso e o comprimento de *L. aurata*, *L. ramada* e *C. labrosus* na Lagoa de Óbidos (Tabela 3). À semelhança de Monteiro (1989) e Sobral (1999) os indivíduos estudados atingiam comprimentos muito superiores (*L. ramada* – 43 cm; *L. aurata* – 27 cm; *C. labrosus* – 33 cm) aos do presente trabalho. Os resultados obtidos apontam para a existência de crescimento isométrico, mas a diferença de tamanhos com os do presente estudos inviabilizam uma comparação mais profunda dos resultados.

Tabela 3 - Parâmetros da relação comprimento/peso ($W_t = a \cdot L_t^b$) para as espécies estudadas no Estuário do Douro, na Ria de Aveiro, Ria Formosa e Estuário do Mondego. (N.E.= Espécie não estudada)

Espécie	Estuário do Douro ⁷		Ria de Aveiro ¹		Ria Formosa ⁹		Estuário do Mondego ¹⁰		Lagoa de Óbidos ¹¹	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	B
<i>L. aurata</i>	0,0091	3,0086	0,013	2,84	0,0060	2,996	0,015	2,867	0,007	3,03
<i>L. ramada</i>	0,0092	3,0385	0,009	2,99	N.E.	N.E.	0,003	3,331	0,010	2,89
<i>A. presbyter</i>	0,0058	3,0848	0,008	2,90	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
<i>C. labrosus</i>	0,0013	2,8607	N.E.	N.E.	0,0074	3,068	0,011	3,010	0,009	3,05

⁷ Presente Trabalho.
⁸ Cruz e Rebelo (2000)
⁹ Monteiro (1989)
¹⁰ Sobral (1999)
¹¹ Moura e Gordo (2000)

3.1. Relação entre o crescimento dos otólitos e dos peixes

Em nenhuma das espécies estudadas existe diferença significativa entre o comprimento dos otólitos direito e esquerdo (Teste *t* bicaudal, *p* > 0,05) (Tabela 4) pelo que se considerará, nos cálculos subsequentes a média das duas medidas.

Tabela 4 - Resultados dos Testes de *t* bicaudais efectuados aos comprimentos máximos dos otólitos direitos e esquerdos das espécies indicadas

Espécie	Graus de liberdade	Estatística de <i>t</i>
<i>L. aurata</i>	29	0,271321
<i>L. ramada</i>	28	0,160898
<i>C. labrosus</i>	84	-0,60332
<i>A. presbyter</i>	26	-0,20551

As relações estabelecidas entre a biometria dos peixes (peso e comprimento) e o comprimento máximo dos otólitos são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 - Equações das relações entre o peso em gramas (*W*) e comprimentos, em centímetros, dos peixes (*L*) e o comprimento máximo, em micrómetros, dos otólitos (*O_L*). É também indicado o coeficiente de determinação (*r*²) de cada uma das equações e o respectivo nível de significância (*p*).

Espécie	Equação	<i>r</i> ²	<i>P</i>
<i>L. aurata</i>	$W = 2 \cdot 10^{-10} O_L^{2,9702}$	<i>r</i> ² = 0,9739	< 0,05
<i>L. aurata</i>	$L = 0,0027 O_L + 0,1137$	<i>r</i> ² = 0,9439	< 0,05
<i>L. ramada</i>	$W = 2 \cdot 10^{-8} O_L^{2,4104}$	<i>r</i> ² = 0,9336	< 0,05
<i>L. ramada</i>	$L = 0,0024 O_L + 0,5719$	<i>r</i> ² = 0,9549	< 0,05
<i>C. labrosus</i>	$W = 10^{-8} O_L^{2,4734}$	<i>r</i> ² = 0,9751	< 0,05
<i>C. labrosus</i>	$L = 0,0025 O_L + 0,5462$	<i>r</i> ² = 0,9806	< 0,05
<i>A. presbyter</i>	$W = 10^{-10} O_L^{3,0186}$	<i>r</i> ² = 0,9168	< 0,05
<i>A. presbyter</i>	$L = 0,0029 O_L - 0,0015$	<i>r</i> ² = 0,9276	< 0,05

Na Figura 11 estão representados os valores observados e as curvas ajustadas da Tabela 5 para os indivíduos de cada espécie analisada. Em todos os casos apresentados, a variação do comprimento máximo do otólito é explicada em mais de 90% pela variação do comprimento ou do peso dos indivíduos. Os resultados mostram que as relações são bem descritas por rectas, quando relacionam o comprimento do peixe e o comprimento do otólito, e por curvas, quando uma das variáveis é o peso do peixe e a outra o comprimento do otólito, do mesmo modo que foi verificado anteriormente para outras espécies (e.g. Harkonen, 1986; Santos, 1995; Morales-Nin *et al.*, 1998; Neuman *et al.*, 2001)

Para a fase de desenvolvimento estudada constata-se a existência de uma relação directamente proporcional entre o crescimento em comprimento dos indivíduos e dos seus otólitos. A relação entre o peso dos indivíduos e o comprimento máximo dos seus otólitos é descrita por uma relação de potência de expoente que se aproxima bastante a 3 em *L. aurata* e *A. presbyter*. Em *C. labrosus*, a relação peso do indivíduo/comprimento do otólito apresenta um desvio relativamente a uma relação de potência de expoente três, o qual poderá decorrer do próprio desvio da isometria que existe na relação peso/comprimento do indivíduo (Tabela 2). *L. ramada* também apresenta uma relação entre o peso do indivíduo/comprimento do otólito de expoente diferente de três. Tal facto não é passível de explicação através da inexistência de isometria entre o crescimento em peso e comprimento dos indivíduos. A única explicação que se poderá avançar para esse facto reside na própria forma de crescimento do otólito *sagitta* desta espécie, para comprovar esta explicação seria uma análise mais profunda da biometria do otólito, a qual não é objectivo do presente trabalho.

Cruz e Rebelo (2000) também relacionaram os dados biométricos de algumas espécies consideradas no presente trabalho (*L. aurata*, *L. ramada*, *A. presbyter*) com o comprimento máximo dos respectivos otólitos. Para *A. presbyter* estes investigadores obtêm uma relação do tipo linear ($L=2,513 \text{ OL}+0,541$), para *L. aurata* e *L. ramada* a relação é do tipo de potência.

No entanto, os resultados obtidos por esses investigadores não são directamente comparáveis com os do presente trabalho, pois os indivíduos por eles estudados abrangem classes de comprimento diferentes das aqui

consideradas. Como tal, as taxas de crescimento somático tenderão a ser naturalmente diferentes.

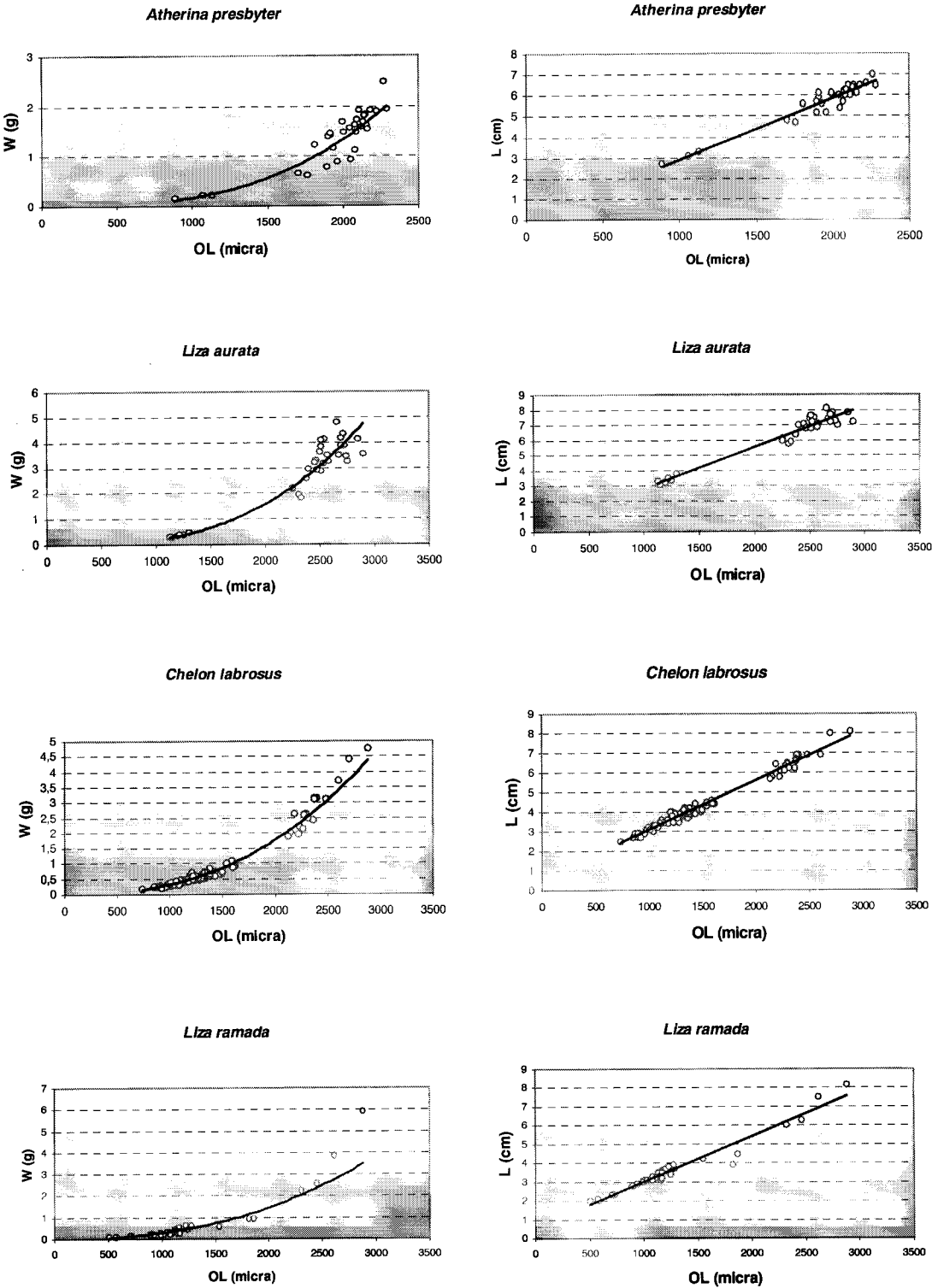


Figura 11 - Relação Peso dos Indivíduos/Comprimento máximo dos otólitos (Coluna da esquerda); Relação Comprimento dos Indivíduos/Comprimento Máximo dos otólitos (Coluna da direita). W = Peso indivíduo; L = Comprimento Indivíduo; OL = Comprimento Máximo dos otólitos.

3.2. Microestrutura dos Otólitos

Problemas de carga ao nível do microscópio electrónico de varrimento, bem como um desgaste e/ou *etching* deficiente das peças criaram obstáculos a uma leitura clara dos microincrementos.

De um total de 138 otólitos preparados para observar em microscopia electrónica de varrimento só 67 ficaram registados em película fotográfica. Os remanescentes não foram considerados devido à sua menor qualidade.

3.2.1. Determinação da relação idade/comprimento

Liza aurata

O exame da microestrutura dos otólitos de *L. aurata* (Figura 12) após contagem dos microincrementos, permitiu determinar a idade em dias e, conseqüentemente, a relação entre o comprimento dos peixes desta espécie e a sua idade, ou seja, a função que descreve o crescimento destes indivíduos.

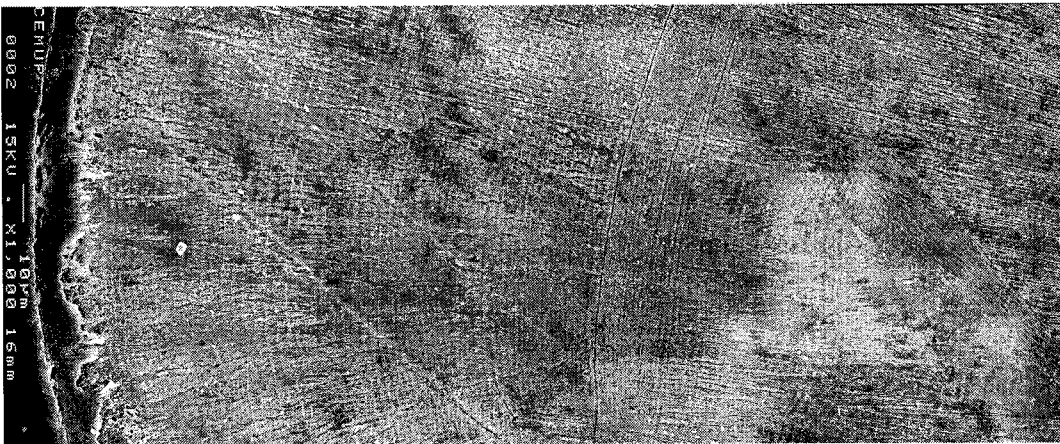


Figura 12 - Imagem parcial de *sagitta* de *L. aurata* visto ao microscópio electrónico de varrimento (barra=10 micrómetros).

Este é melhor descrito através de uma relação linear (Figura 13), para o período de tempo em apreço, o que coincide com o referido na introdução deste trabalho relativamente aos peixes juvenis.

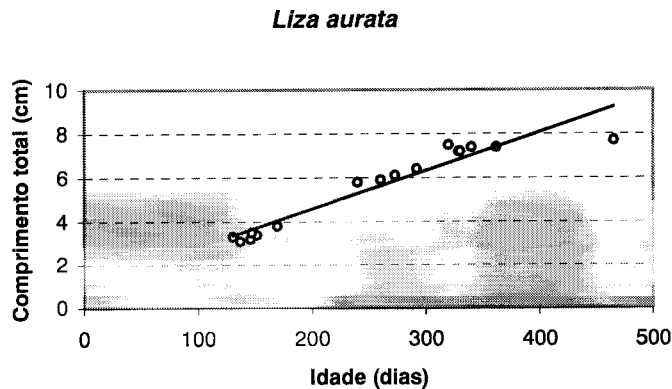


Figura 13 - Relação comprimento-idade, dos juvenis de *Liza aurata* capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.

Os resultados obtidos para esta espécie mostram que o crescimento dos juvenis entre 3,1 e 7,7 cm de comprimento total, pode ser representado pela função:

$$(1) L_t = 0,0175 t + 1,0931 ; (r^2 = 0,9133; p < 0,05)$$

onde L_t é o comprimento total dos peixes, em centímetros, e t é a sua idade em dias.

Estes valores não podem ser directamente comparados com os de outros autores (Monteiro, 1989; Sobral, 1999 e Moura e Gordo, 2000) que efectuaram estudos para esta espécie, pois as gamas de tamanho dos indivíduos estudadas não coincidem. No entanto, uma comparação pode ser efectuada para os indivíduos de um ano de idade. Para estes indivíduos, os nossos resultados estão em consonância com os obtidos por Monteiro (1989) e Sobral (1999).

Apesar de estes autores terem recorrido a análise da distribuição modal das classes de comprimento para peixes de maiores dimensões e não aos dados de incrementos diários em juvenis, como no presente trabalho, esses autores obtiveram, para os indivíduos com 1 ano de idade, os comprimentos (em centímetros) indicados na Tabela 6. Aplicando a função (1), obtida no

presente trabalho, a um animal com 365 dias de idade, obtemos um comprimento médio de 7,48 cm, valor que não é muito diferente dos obtidos por Monteiro (1989) e Sobral (1999).

Tabela 6 - Comprimento médio (cm) de *L. aurata* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos

Estuário Douro ¹²	Ria Formosa ¹³	Estuário Mondego ¹⁴	Lagoa de Óbidos ¹⁵
7,48	9,73	9,46	13,59

Os resultados obtidos na Lagoa de Óbidos por Moura e Gordo (2000) revelam-se substancialmente diferentes dos restantes. Tal facto poderá ficar a dever-se a enviesamentos provocados pela amostragem e por eventuais diferenças ao nível das condições ecológicas.

Monteiro (1989) e Sobral (1999) referem que o recrutamento ao estuário desta espécie ocorre com um comprimento médio de, respectivamente, 2,0 cm e 2,9 cm. Estes valores estão de acordo com os obtidos no presente trabalho. Dado que os indivíduos de menor porte capturados tinham 3,1 cm de comprimento é lícito inferir que estes tinham sido recentemente incorporados ao *stock* da população estuarina.

Liza ramada

O exame da microestrutura dos otólitos de *L. ramada* (Figura 15), após contagem dos microincrementos, permitiu determinar a relação entre o comprimento dos peixes desta espécie e a sua idade em dias. Esta é melhor descrita através de uma relação linear (Figura 14), para o período de tempo em apreço.

¹² Presente trabalho
¹³ Monteiro (1989)
¹⁴ Sobral (1999)
¹⁵ Moura e Gordo (2000)

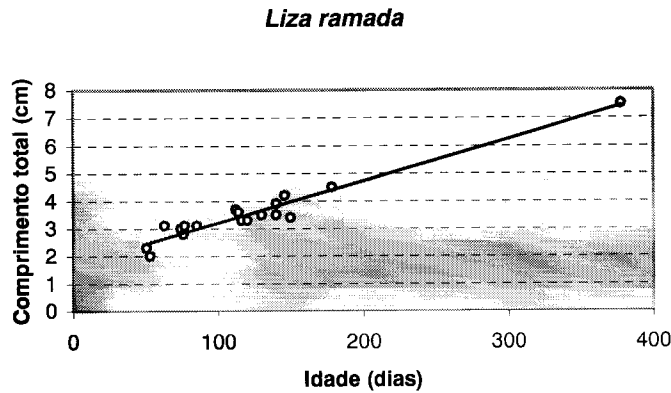


Figura 14 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de *Liza ramada* capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.

Os resultados obtidos para esta espécie mostram que o crescimento dos juvenis entre 2,0 e 7,5 cm de comprimento total, pode ser representado pela função:

$$L_t = 0,0152 t + 1,682 ; (r^2 = 0,9409; p < 0,05)$$

onde L_t é o comprimento total dos peixes, em centímetros, e t é a sua idade em dias.

Os resultados obtidos, a partir da análise dos microincrementos, neste trabalho apresentam algumas diferenças relativamente aos obtidos por Sobral (1999) e por Moura e Gordo (2000). A metodologia adoptada para a comparação dos resultados foi idêntica à utilizada relativamente a *L. aurata*.

Estes autores, usando chaves idade-comprimento (com base na análise dos *annuli*), obtiveram comprimentos médios para indivíduos com um ano de idade superiores aos determinados neste trabalho (Tabela 7). Tal poderá dever-se às diferentes metodologias utilizadas, sendo que as adoptadas, quer por Sobral (1999), quer por Moura e Gordo (2000) têm um menor poder preditivo e uma margem de erro muito superior à análise dos microincrementos. Importa também sublinhar que na presente análise dos resultados não se levou em linha de conta diferenças existentes entre os diferentes ecossistemas em estudo, as quais contribuirão também para explicar as diferenças registadas entre os diferentes trabalhos.

Tabela 7 - Comprimento médio (cm) de *L. ramada* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos

Estuário Douro ¹⁶	Estuário Mondego ¹⁷	Lagoa de Óbidos ¹⁸
7,23	10,98	12,68



Figura 15 - Imagem parcial de *sagitta* de *L. ramada* visto ao microscópio electrónico de varrimento (barra = 10 micrómetros)

¹⁶ Presente trabalho
¹⁷ Sobral (1999)
¹⁸ Moura e Gordo (2000)

Chelon labrosus

O exame da microestrutura dos otólitos de *C. labrosus* (Figura 17), permitiu determinar a relação entre o comprimento dos peixes desta espécie e a sua idade em dias. Esta é melhor descrita através de uma relação linear (Figura 16), para o período de tempo em apreço.

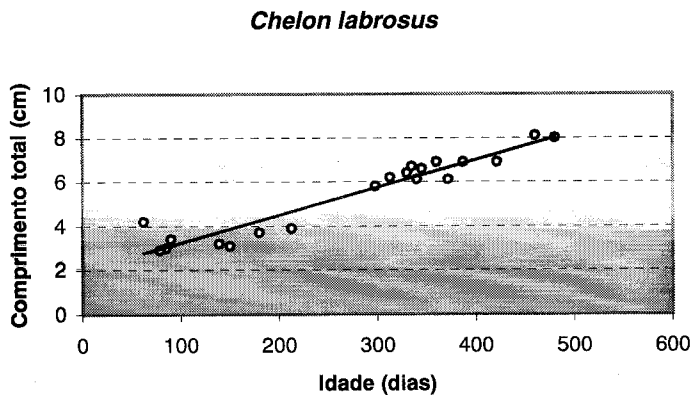


Figura 16 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de *Chelon labrosus* capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.

Os resultados obtidos para esta espécie mostram que o crescimento dos juvenis entre 2,9 e 8,0 cm de comprimento total, pode ser representado pela função:

$$L_t = 0,0125 t + 1,9947 ; (r^2=0,9138; P<0,05)$$

onde L_t é o comprimento total dos peixes, em centímetros, e t é a sua idade em dias.

A metodologia adoptada para a comparação dos resultados foi idêntica à utilizada em *L. aurata* e *L. ramada*. Os resultados obtidos para esta população revelam algumas discrepâncias relativamente aos obtidos por Monteiro (1989), Sobral (1999) e por Moura e Gordo (2000) (Tabela 8).

Tal poderá ficar a dever-se, à semelhança do que sucedeu com *L. ramada*, às diferentes técnicas de análise utilizadas, as quais possuem sensibilidades diferentes, bem como às diferenças entre os diferentes locais estudados.

Tabela 8 - Comprimento médio (cm) de *C. labrosus* com 365 dias de idade, determinado a partir dos resultados obtidos em diferentes trabalhos

Estuário Douro ¹⁹	Ria Formosa ²⁰	Estuário Mondego ²¹	Lagoa de Óbidos ²²
6,56	10,73	11,69	15,96

Os resultados obtidos por Monteiro (1989), Sobral (1999) e Moura e Gordo (2000) não são conciliáveis com os obtidos no presente trabalho. A menor fiabilidade dos resultados, inerente à utilização de *annuli*, o facto de terem analisado indivíduos de maior porte e as eventuais diferenças ao nível das características ambientais dos meios, poderão ser as explicações para a tão grande discrepância de resultados



Figura 17 - Imagem parcial de *sagitta* de *C. labrosus* visto ao microscópio electrónico de varrimento (barra=10 micrómetros).

¹⁹ Presente trabalho
²⁰ Monteiro (1989)
²¹ Sobral (1999)
²² Moura e Gordo (2000)

Atherina presbyter

O exame da microestrutura dos otólitos de *A. presbyter* (Figura 18) após contagem dos microincrementos, permitiu determinar a relação entre o comprimento dos peixes desta espécie e a sua idade em dias

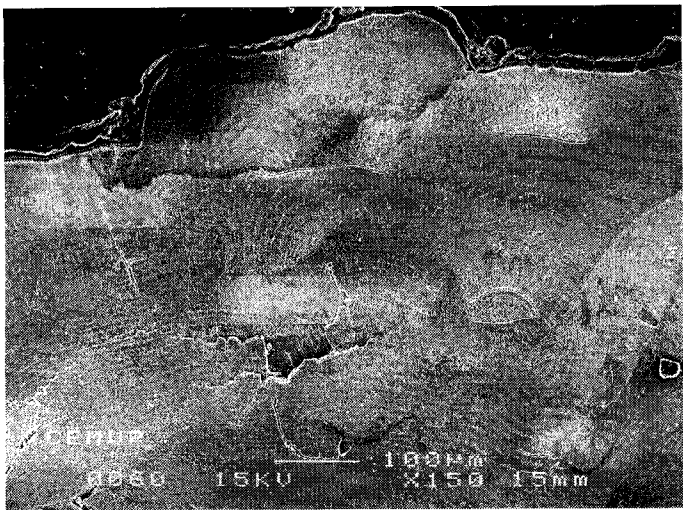


Figura 18 - Imagem parcial de *sagitta* de *A. presbyter* visto ao microscópio electrónico de varrimento (barra = 100 micrómetros).

Esta é melhor descrita através de uma relação linear (Figura 19), para o período de tempo em apreço

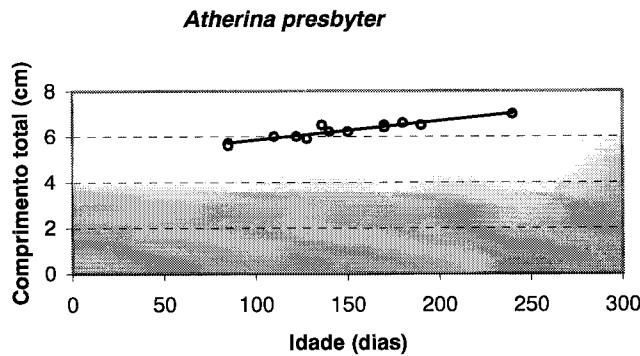


Figura 19 - Relações comprimento – idade, dos juvenis de *Atherina presbyter* capturados no estuário do rio Douro, em Fevereiro e Agosto de 2002.

Os resultados obtidos para esta espécie mostram que o crescimento dos juvenis entre 5,6 e 7,0 cm de comprimento total, pode ser representado pela função:

$$L_t = 0,0085 t + 4,987 ; (r^2 = 0,8911; P < 0,05)$$

onde **L_t** é o comprimento total dos peixes, em centímetros, e **t** é a sua idade em dias.

Ao contrário do que sucedeu com os Mugilídeos, não existem quaisquer resultados publicados relativos ao crescimento de *A. presbyter* em Portugal. No entanto, como se considerou pertinente obter um termo de comparação com o presente trabalho, optou-se por utilizar os resultados obtidos por Pajuelo e Lorenzo (2000) e Moreno e Morales-Nin (2003) nas Ilhas Canárias (Espanha). Pajuelo e Lorenzo estimaram a idade e os parâmetros de crescimento a partir da análise dos *annuli* dos otólitos de *A. presbyter*, enquanto Moreno e Morales-Nin (2003) determinaram a idade e os parâmetros de crescimento de *A. presbyter* a partir da leitura e interpretação dos incrementos diários dos otólitos.

Atendendo a que a idade máxima dos indivíduos capturados no presente trabalho foi de 240 dias, não é correcto fazer qualquer extrapolação para idades superiores a essa. Como tal, optou-se por comparar os comprimentos médios para indivíduos com meio ano de vida (182 dias) obtidos no presente trabalho e por Pajuelo e Lorenzo (2000) e Moreno e Morales-Nin (2003).

No estuário do Douro, *A. presbyter* apresentava um comprimento médio de 6,53 cm com 182 dias de vida, nas Ilhas Canárias o comprimento médio era de 5,23 cm (Pajuelo e Lorenzo, 2000) e 6,39 cm (Moreno e Morales-Nin, 2003) para meio ano de vida. Qualquer comparação imediata entre estes resultados deve ser vista com alguma reserva. As diferenças entre os Ecossistemas em estudo são um factor que deve ser tido em linha de conta e que no presente trabalho é impossível despistar. No entanto, importa sublinhar a proximidade dos valores obtidos por Pajuelo e Lorenzo (2000) e Moreno e Morales-Nin (2003) com os do presente trabalho.

Um aspecto que assume especial relevo é o facto de Moreno e Morales-Nin (2003) terem efectuado uma validação das idades obtidas. O que, com as devidas reservas inerentes ao facto de estarmos a extrapolar de um ecossistema nas ilhas Canárias para o estuário do Douro, poderá contribuir para validar as leituras de idades obtidas no presente trabalho.

3.2.2. Determinação das taxas de crescimento médio das espécies estudadas.

As taxas de crescimento das espécies estudadas no Estuário do Douro revelam um ritmo médio de crescimento em *A. presbyter* muito superior ao dos Mugilídeos (Tabela 9). Tal poderá ficar a dever-se ao facto de a idade máxima dos indivíduos *A. presbyter* capturados ser de 240 dias enquanto o leque de idades dos indivíduos das restantes espécies é muito mais largo (*L. aurata* – 465 dias; *L. ramada* – 377 dias; *C. labrosus* – 480 dias). Sendo constituída por indivíduos mais jovens, a amostra de *A. presbyter* naturalmente apresentará uma taxa de crescimento média mais elevada do que a de indivíduos mais velhos. Aliás, Pajuelo e Lorenzo (2000) referem que *A. presbyter* atinge 60% do seu comprimento no primeiro ano de vida, diminuindo a partir daí o seu ritmo de crescimento. Esta interpretação dos resultados obtidos não leva em linha de conta diferenças metabólicas e fisiológicas que existem entre as diferentes espécies e que, naturalmente, irão influenciar as suas Taxas de Crescimento, mas cuja análise ultrapassada os objectivos do presente trabalho.

Tabela 9 – Taxas de Crescimento Somático diário médio (mm/dia) das diferentes espécies estudadas no presente trabalho.

Espécie	Taxa de crescimento média (mm/dia)	Intervalo de Confiança (95%)
<i>L. aurata</i>	0,222	[0,213; 0,231]
<i>L. ramada</i>	0,324	[0,287; 0,361]
<i>C. labrosus</i>	0,240	[0,187; 0,293]
<i>A. presbyter</i>	0,456	[0,394; 0,518]

Optou-se por não comparar os resultados obtidos no presente trabalho com os obtidos por outros autores (Monteiro, 1989; Sobral, 1999; Moura e Gordo, 2000) atendendo às dificuldades metodológicas inerentes a tal análise. A saber: a dificuldade em delimitar, nos resultados desses investigadores,

classes etárias directamente comparáveis com as do presente trabalho; dificuldade de a partir de tabelas de distribuição de frequência de comprimentos, obter taxas de crescimento médio diário; a subjectividade inerente à comparação de taxas de crescimento diárias determinadas a partir de relações entre idade e comprimento obtidas a partir de metodologias diferentes; o erro inerente à transposição de resultados obtidos ao nível anual para o nível diário.

3.2.3. Determinação da idade média de entrada dos indivíduos no Estuário do Douro

Para os indivíduos dos quais foi possível obter uma imagem perceptível da microestrutura da região central do otólito (Figura 20), determinou-se que a entrada no ambiente estuarino terá ocorrido com as seguintes idades médias, para um intervalo de confiança de 95% (Anexo 5):

Liza aurata – 18 dias $\pm$ 1,71 dias ($n = 6$ indivíduos)

Chelon labrosus – 20 dias $\pm$ 1,69 dias ($n = 5$ indivíduos)

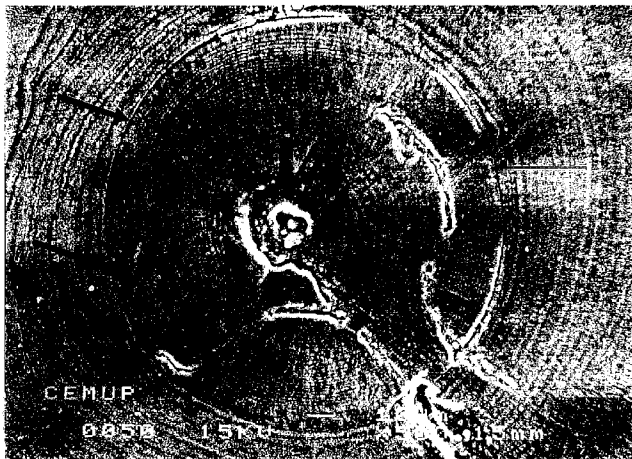


Figura 20 - Imagem parcial de *sagitta* de *C. labrosus* visto ao microscópio electrónico de varrimento, setas indicam a marca de entrada no estuário (barra = 10 micrómetros).

Dado o reduzido número de imagens perceptíveis do núcleo dos otólitos, a fiabilidade estatística destes resultados não é a que consideramos adequada. No entanto, estes deverão ser entendidos como uma primeira abordagem ao

assunto, tanto mais não havendo qualquer investigação publicada que permita efectuar a comparação com os nossos resultados

Pode-se, desde já sublinhar, que a entrada de indivíduos de *L. aurata* e *C. labrosus* no sistema estuarino em estudo se realiza numa fase inicial dos seus ciclos de vida. Embora os resultados do presente trabalho não o possam verificar cientificamente, esta deslocação parece revelar uma estratégia de aproveitamento dos recursos do ambiente estuarino, por parte destas espécies, no sentido de majorar o seu crescimento.

É também importante levar em linha de conta alguns constrangimentos (já referidos na Introdução deste trabalho) que se colocam à identificação de mudanças de habitats unicamente baseadas no aparecimento de marcas nos otólitos (Campana e Neilson, 1985), o que acarreta a necessidade de completar esses resultados com outros estudos, nomeadamente no âmbito da microanálise química dos otólitos (Friedland *et al.*, 1998; Bath *et al.*, 2000; Secor e Rooker, 2000),

3.2.4. Determinação de datas de eclosão

A análise da distribuição das datas de eclosão das espécies capturadas no Estuário do Douro e cuja microestrutura dos otólitos foi analisada (Figura 21), deve ser feita com bastante precaução.

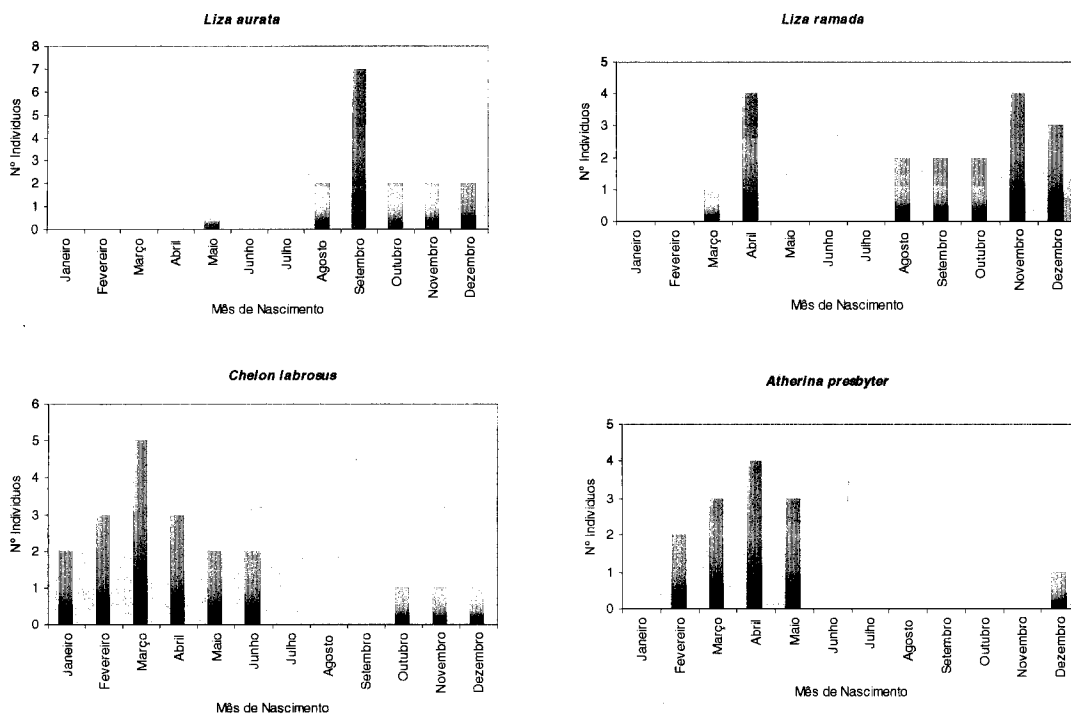


Figura 21 – Distribuição das datas de eclosão das espécies capturadas no Estuário do Douro e cuja microestrutura dos otólitos foi analisada

Deve ser levado em atenção o facto de unicamente a análise dos microincrementos dos otólitos de *C. labrosus* ter englobado indivíduos nascidos durante um período de tempo igual ou superior a um ano (Anexo 6). Nas restantes espécies (*L. aurata*, *L. ramada* e *A. presbyter*) tal não foi possível, pelo que nestes casos as conclusões sobre a distribuição temporal dos nascimentos devem ser especialmente reservadas, dado existir períodos de tempo não cobertos pelos resultados obtidos.

Relativamente a *L. aurata* pode-se constatar um predomínio dos nascimentos entre Agosto e Dezembro. Como a idade média de entrada dos indivíduos no estuário obtida no presente trabalho é de 18 dias (Capítulo 3.2.3.), pode-se indicar o período de Outono-Inverno como o momento de recrutamento desta espécie ao estuário.

Sobral (1999) indica os meses de Setembro e Outubro como o momento de início do recrutamento desta espécie no Estuário do Mondego. Por seu lado Moura e Gordo (2000) referem os meses entre Maio e Agosto para o mesmo fenómeno, pelo que os resultados obtidos no presente trabalho parecem estar em consonância com os obtidos por Sobral (1999).

No que diz respeito a *L. ramada* podemos verificar um claro predomínio dos nascimentos entre Agosto e Dezembro. No entanto, como não foi possível determinar a idade média de entrada dos indivíduos no estuário (Capítulo 3.2.3.) fica inviabilizada a determinação do período de recrutamento ao estuário.

No que diz respeito a *C. labrosus* pode-se constatar um período mais intenso de nascimentos em Março. Sobral (1999) refere que no estuário do Mondego o recrutamento desta espécie ocorre em Abril. Embora no presente trabalho não existam dados suficientes para o afirmar cabalmente, os resultados aqui obtidos vão ao encontro dos de Sobral (1999), pois havendo um maior número de nascimentos em Março e sendo a sua idade média de entrada no estuário de 20 dias é expectável que o recrutamento para o estuário se inicie a partir deste último mês.

Relativamente a *A. presbyter*, não se consegue obter nenhum padrão relativamente às datas de eclosão, tanto mais que o período estudado no presente trabalho só se estende por pouco mais de 6 meses. Como tal não é possível tirar qualquer ilação sobre a distribuição das datas de eclosão desta espécie.

Quignard e Pras (1986) referem que o período de reprodução de *A. presbyter* ocorre durante os meses de Verão, o que não coincide com os resultados obtidos neste trabalho.

Ben-Tuvia (1986) refere que o período de reprodução de *L. ramada* ocorre entre os meses de Outubro e Dezembro, o que coincide com um dos picos do número de eclosões obtidos no presente trabalho (Figura 21). O

mesmo autor refere que o período de reprodução de *L. aurata* ocorre entre os meses de Julho e Novembro e o de *C. labrosus* durante os meses de Inverno, o que é compatível com os resultados obtidos no presente trabalho.

É de sublinhar que na bibliografia consultada não existe qualquer referência à determinação de datas de eclosão das espécies estudadas no presente trabalho através da análise da estrutura dos otólitos, o que impede uma análise mais profunda dos resultados obtidos e deixa claras as dificuldades metodológicas que este tipo de análise acarreta.

3.3. Análise comparativa dos resultados obtidos com a montagem dos otólitos em diferentes tipos de resinas.

No decurso do procedimento experimental foram utilizados dois tipos de resinas (Struers Specifix-20 e ATM KEM-91). Pode-se constatar que a utilização da resina Struers Specifix-20 permitiu a obtenção de melhores resultados (Tabela 10), pois a percentagem de blocos cujo núcleo do otólito era bem visível quando observado através de lupa binocular era claramente superior à obtida com a resina ATM KEM-91.

Tabela 10 - Percentagem de blocos de resina com um desgaste/polimento adequado, para os diferentes tipos de resinas utilizados. Entende-se por um bloco bem polido aquele em que seja bem visível o núcleo do otólito quando observado em lupa binocular.

Resina	Total de blocos	Blocos obtidos com bom polimento	Percentagem de sucesso
Struers Specifix-20	120	96	80,0%
ATM KEM-91	128	42	32,8%

A resina ATM KEM-91 era mais rija do que a Struers Specifix-20, o que dificultou o desgaste/polimento das peças, surgindo muitos mais riscos na resina, os quais se revelavam extraordinariamente difíceis de retirar e dificultavam ou impossibilitavam a interpretação. É lícito atribuir a essa característica da resina um maior número de peças perdidas, pelo que em futuros trabalhos que acarretem a necessidade de desgaste/polimento de blocos de resina deverá ser evitada a utilização da resina ATM KEM-91.

3.4. Análise comparativa dos resultados obtidos com diferentes períodos e agentes de *etching*

No decurso do procedimento experimental foram utilizados dois agentes de *etching* – HCl (0,1%) e EDTA (5%) – durante diferentes intervalos de tempo (de 20 segundos a 2 minutos).

A partir de uma análise qualitativa dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os resultados mais adequados se obtêm através do uso de EDTA (5%) durante 50 segundos (Tabela 11 e Anexo 7), sendo que todos os otólitos sujeitos a esse tratamento permitiram a obtenção de imagens adequadas à contagem e medição de microincrementos. Neste caso, os microincrementos são muito mais visíveis, sendo possível distinguir com grande facilidade a zona incremental da zona descontínua (Figura 22).

Em indivíduos de maior porte, os quais não foram alvo de qualquer captura durante o presente trabalho, é expectável que os tempos de *etching* tenham que ser superiores.

Tabela 11 – Resultados obtidos com diferentes períodos e agentes de *etching*. As percentagens expressam a relação entre o número de otólitos sujeitos a cada combinação agente-período de *etching* e o número de otólitos seleccionados para contagem e medição dos microincrementos, a partir de cada um desses conjuntos iniciais.

Período de <i>etching</i>	HCl (0,1%)	EDTA (5%)
20 seg.	60%	30%
30 seg.	50%	50%
50 seg.	50%	100%
1 min.	62,5%	75%
1 min. 15 seg.	50%	62,5%
1 min. 30 seg.	25%	37,5%
1 min. 45 seg.	25%	42,8%
2 min.	14,3%	25%

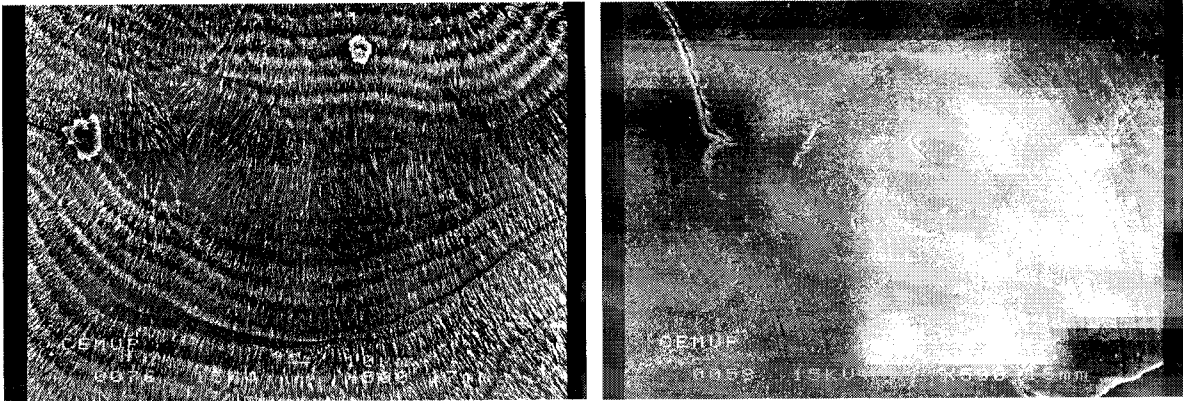


Figura 22 – Imagens parciais de *sagittae* vistos ao microscópio electrónico de varrimento (barra=10 micrómetros). Imagem da esquerda – *C. labrosus* com *etching* com EDTA (5%) durante 50 segundo; Imagem da direita – *A. presbyter* com *etching* com HCl (0,1%) durante 30 segundos.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos é possível parametrizar a relação peso total - comprimento total ($W_t = a \cdot L_t^b$) das diferentes espécies estudadas. Sendo que as equações obtidas são as seguintes: *L. aurata* - $W_t = 0,0091 \cdot L_t^{3,0086}$; *L. ramada* - $W_t = 0,0092 \cdot L_t^{3,0385}$; *C. Labrosus* - $W_t = 0,00128 \cdot L_t^{2,8607}$; *A. presbyter* - $W_t = 0,0058 \cdot L_t^{3,0848}$.

No que diz respeito às relações entre o crescimento dos otólitos e o crescimento dos indivíduos pode-se concluir que as relações entre o peso (W) e o comprimento (L) dos indivíduos e o comprimento máximo dos seus otólitos (OL) são para *L. aurata* - $W = 2E-10 \cdot OL^{2,9702}$ e $L = 0,0027 \cdot OL + 0,1137$; para *L. ramada* - $W = 2E-08 \cdot OL^{2,4104}$ e $L = 0,0024 \cdot OL + 0,5719$; para *C. labrosus* - $W = 1E-08 \cdot OL^{2,4734}$ e $L = 0,0025 \cdot OL + 0,5462$; e para *A. presbyter* - $W = 1E-10 \cdot OL^{3,0186}$ e $L = 0,0029 \cdot OL - 0,0015$.

Foi também possível estimar, a partir da contagem e medição dos microincrementos, as equações de crescimento para as diferentes espécies estudadas. Todas elas espelham uma relação linear entre o comprimento dos indivíduos e a sua idade em dias, sendo que para *L. aurata* a equação que melhor se adequa aos dados é $L_t = 0,0175 \cdot t + 1,0931$; para *L. ramada* é $L_t = 0,0152 \cdot t + 1,682$; para *C. labrosus* é $L_t = 0,0125 \cdot t + 1,9947$ e para *A. presbyter* é $L_t = 0,0085 \cdot t + 4,987$.

Estimou-se as taxas de crescimento médio para as diversas espécies, sendo que para *L. aurata* esta foi de 0,222 mm/dia, para *L. ramada* foi de 0,324 mm/dia, para *C. labrosus* foi de 0,240 mm/dia e para *A. presbyter* foi de 0,456 mm/dia.

Não foi possível determinar as idades de entrada no estuário para todas as espécies estudadas. Os dados disponíveis só permitiram esse cálculo para *L. aurata* (18 dias) e *C. labrosus* (20 dias).

No que diz respeito ao cálculo das datas de eclosão, os resultados parecem apontar para uma predominância dos nascimentos de *L. aurata* e *L. ramada* entre os meses de Agosto e Dezembro, quanto a *C. labrosus* pode-se concluir que o mês de Março é aquele em que a natalidade é mais elevada.

Quando se compara os resultados obtidos com a montagem dos otólitos em diferentes tipos de resinas e alvo de diferentes períodos e agentes de *etching*, pode-se concluir que a resina mais adequada é a Struers Specifix-20 e o desgaste provocado pela exposição a EDTA (5%) durante 50 segundos é o que permite melhores imagens dos microincrementos em microscopia electrónica de varrimento

A componente juvenil da Ictiofauna da zona terminal do estuário do Rio Douro apresentou-se como pouco diversa e composta essencialmente por espécies que utilizam o sistema estuarino durante algumas fases da sua vida.

Os Mugilídeos dominaram claramente as amostragens efectuadas no presente estudo. Estes entraram no estuário como juvenis, visto a sua reprodução ocorrer no mar.

O estudo da funcionalidade dos estuários como locais de viveiro revela-se de elevada importância, uma vez que permitem avaliar o papel que os referidos sistemas desempenham na preservação e exploração sustentável das espécies. Desse modo torna-se imperativo desenvolver estudos que visem a determinação dos vários componentes do ecossistema, assim como a compreensão das inter-relações que nele se estabelecem. Com o nível de conhecimento obtido neste trabalho apenas foi possível uma avaliação genérica e algo superficial destes tipos de fenómenos. Para tal seria necessária uma abordagem mais prolongada temporalmente e alargada espacialmente.

Ainda que sumários, os resultados obtidos permitem a obtenção de dados de base essenciais para a continuação de uma investigação mais detalhada da estrutura dos otólitos e do crescimento das espécies estudadas no estuário do rio Douro.

A escassez de dados disponíveis na bibliografia relativamente ao crescimento de juvenis das espécies estudadas impediu uma análise mais profunda dos resultados obtidos neste trabalho, nomeadamente no que concerne à comparação com dados relativos ao crescimento de juvenis obtidos a partir da análise de microincrementos de otólitos. Os únicos resultados publicados em Portugal diziam respeito à determinação de parâmetros biológicos a partir da análise de *annuli*, o que acarreta, à partida, uma menor fiabilidade. Por isso, não é de estranhar o facto de existirem algumas discrepâncias entre os resultados obtidos no presente trabalho e os que diversos autores obtiverem (Monteiro, 1989; Sobral, 1999; Moura e Gordo, 2000).

Por outro lado, essa escassez de resultados, vem valorizar os que se obtiveram no presente trabalho, pois vem conferir-lhes um carácter mais inovador.

A determinação do tempo ideal para o *etching* dos otólitos, bem como do tipo de resina mais indicado para a montagem; a obtenção de relações entre o peso e o comprimento dos indivíduos com o comprimento dos seus otólitos; a determinação de equações de crescimento a partir da contagem dos microincrementos dos otólitos, bem como a obtenção de taxas de crescimento e a determinação das datas de nascimento dos indivíduos foram resultados obtidos neste trabalho. Dessa forma pode-se afirmar que os objectivos inicialmente propostos foram atingidos.

Embora se deva salientar que os parâmetros das curvas só são válidos para os intervalos de comprimento, idades ou peso para os quais as estas foram estimadas, é de sublinhar os bons ajustamentos dos dados às equações de crescimento bem como às relações biométricas estabelecidas. Facto que é evidenciado pelos elevados coeficientes de determinação.

A não validação da natureza diária dos microincrementos estudados neste trabalho é uma critica pertinente que se pode colocar aos resultados aqui obtidos. No entanto, deve-se sublinhar que tal decisão foi cuidadosamente ponderado ao longo do trabalho realizado. Atendendo às dificuldades logísticas

e experimentais que se levantavam, considerou-se que não existiam condições efectivas para a realização da validação. Pelo que se assumiu a decisão duma forma consciente.

Sendo a dissertação de mestrado encarada como uma etapa num percurso e não um fim em si própria, considera-se que os resultados aqui obtidos podem ser uma valiosa mais valia para estudos futuros, mormente, numa área de investigação em clara expansão e envolvendo espécies tão pouco estudadas no nosso país.

Da experiência adquirida através do presente trabalho pode-se retirar que investigações posteriores deverão ter em atenção os seguintes aspectos: maior frequência de amostragens e durante um período mais longo; capturas em diferentes pontos do estuário e recorrendo a diferentes artes de pesca; utilização de uma balança com capacidade para pesar os otólitos duma forma fiável; utilização de uma resina e de um agente de *etching* adequados.

5. BIBLIOGRAFIA

- AL-HOSSAINI, M., AL-AYOUB, S. e DASHTI, J. (2001). Age validation of nagroor, *Pomadasys kaakan* (Cuvier, 1830) (Family: Haemulidae) in Kuwaiti waters. *Fisheries Research* **53**(1): 71-81.
- AL-HOSSAINI, M., LIU, Q. e PITCHER, T. J. (1989). Otolith microstructure indicating growth and mortality among plaice, *Pleuronectes platessa* L., post-larval sub-cohorts. *Journal of Fish Biology* **35**(Supplement A): 81-90.
- ANDREWS, A. H., CAILLIET, G. M. e COALE, K. H. (1999). Age and growth of the Pacific grenadier (*Coryphaenoides acrolepis*) with age estimate validation using an improved radiometric ageing technique. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 1339-1350.
- ANTUNES, M. M., DA CUNHA, P. L., DUARTE, A. P. e MENDONÇA, E. P. (1988). Ria de Alvor as a spawning place and a nursery ground. *Journal of Fish Biology* **33** (Supplement A): 185-190.
- BARBER, M. C. e JENKINS, G. P. (2001). Differential effects of food and temperature lead to decoupling of short-term otolith and somatic growth rates in juvenile King George whiting. *Journal of Fish Biology* **58**: 1320-1330.
- BATH, G. E., THORROLD, S. R., JONES, C., CAMPANA, S. E., MACLAREN, J. W. e LAM, J. W. H. (2000). Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica acta* **64**(10): 1705-1714.
- BAUCHOT, M.-L. e HUREAU, J.-C. (1986). Sparidae. In *Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean*. (P. J. P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN & E. TORTONESE, eds.), pp 883-907, Paris, UNESCO
- BEAMISH, R. J. e MCFARLANE, G. A. (1995). A discussion of the importance of aging errors, and the application to Walleye Pollock: the world's largest fishery. In *Recent Developments in Fish Otoliths Research*. (D. H. SECOR, J. M. DEAN & S. E. CAMPANA, eds.), pp 545-565, University of South Carolina Press
- BECKMAN, D. W. e WILSON, C. A. (1995). Seasonal timing of opaque zone formation in fish otoliths. In *Recent Developments in Fish Otoliths Research*. (D. H. SECOR, J. M. DEAN & S. E. CAMPANA, eds.), pp 27-43, University of South Carolina Press
- BEGG, G. A., OVERHOLTZ, W. J. e MUNROE, N. J. (2001). The use of internal otolith morphometrics for identification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks on Georges Bank. *Fishery Bulletin, U. S.* **99**: 1-14.
- BEN-TUVIA, A. (1986). Mugilidae. In *Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean*. (P. J. P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN & E. TORTONESE, eds.), pp 1197-1203, Paris, UNESCO
- BOWEN, C. A., II, BRONTE, C. R., ARGYLE, R. L., ADAMS, J. V. e JOHNSON, J. E. (1999). Vateritic sagitta in wild and stocked Lake Trout: Applicability to stock origin. *Transactions of the American Fisheries Society* **128**: 928-938.

- BROTHERS, E. B. (1981). What can otolith microstructure tell us about daily and subdaily events in the early life history of fish? *Rapports et Procès Verbeaux des Réunions du Conseil International pour l'Exploration de Mer*(178): 393-394.
- CAMPANA, S. (1983). Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Canadian Journal of Zoology* **61**: 1591-1597.
- CAMPANA, S. E. (1990). How reliable are growth back-calculations based on otoliths? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**: 2219-2227.
- CAMPANA, S. E. (1992). Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 59-71, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117
- CAMPANA, S. E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series* **188**: 263-297.
- CAMPANA, S. E. (2001). Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology* **59**: 197-242.
- CAMPANA, S. E., CHOUINARD, G. A., HANSON, J. M., FRÉCHET, A. e BRATTEY, J. (2000). Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research* **46**: 343-357.
- CAMPANA, S. E., FOWLER, A. J. e JONES, C. M. (1994). Otolith elemental fingerprinting for stock identification of atlantic cod (*Gadus morhua*) using ablation ICPMS. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **51**: 1942-1950.
- CAMPANA, S. E., GAGNÉ, J. A. e MUNRO, J. (1987). Otolith microstructure of larval Herring (*Clupea harengus*): image or reality? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**: 1922-1929.
- CAMPANA, S. E. e HURLEY, P. C. F. (1989). An age- and temperature-mediated growth model for Cod (*Gadus morhua*) and Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae in the Gulf of Maine. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**: 603-613.
- CAMPANA, S. E. e JONES, C. (1992). Analysis of otolith microstructure data. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 73-100, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117
- CAMPANA, S. E. e NEILSON, J. D. (1982). Daily growth increments in otoliths of Starry Flounder (*Platichthys stellatus*) and the influence of some environmental variables in their production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**: 937-942.
- CAMPANA, S. E. e NEILSON, J. D. (1985). Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**: 1014-1032.
- CAMPANA, S. E. e THORROLD, S. R. (2001). Otoliths, increments, and elements: key to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 30-38.

- CAMPANA, S. E., ZWANENBURG, K. C. e SMITH, J. N. (1990). ^{210}Pb / ^{226}Ra determination of longevity in redfish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**: 163-165.
- CASAS, M. C. (1998). Increment formation in otoliths of slow-growing winter flounder (*Pleuronectes americanus*) larvae in cold water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 162-169.
- CIERI, M. D. e MCCLEAVE, J. D. (2000). Discrepancies between otoliths of larvae and juveniles of the American eel: is something fishy happening at metamorphosis? *Journal of Fish Biology* **57**: 1189-1198.
- CRUZ, R. e REBELO, J. (2000). Dados de crescimento em peixes da Ria de Aveiro. *Revista de Biologia* **18**: 41-47.
- CUNHA, P. G. (1994). *Estrutura e Dinâmica da Ictiofauna do estuário do Sado*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da U. Lisboa, para a obtenção do grau de Doutor. Policopiado. 396 p
- D'AMOURS, D., LANDRY, J. G. e LAMBERT, T. C. (1990). Growth of juvenile (0-group) Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) in the gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**: 2212-2218.
- DEGENS, E. T., DEUSER, W. G. e HAEDRICH, R. L. (1969). Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology* **2**: 105-113.
- DEVRIES, D. A., GRIMES, C. B. e PRAGER, M. H. (2002). Using otolith shape analysis to distinguish eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean stocks of king mackerel. *Fisheries Research* **57**: 51-62.
- EKAU, W. e BLAY, J. (2000). Validation of daily increment deposition and early development in the otoliths of *Sarotherodon melanotheron*. *Journal of Fish Biology* **57**: 1539-1549.
- FEY, D. P. (2001). Differences in temperature conditions and somatic growth rate of larval and early spring-spawned herring from the Vistula Lagoon, Baltic Sea manifested in the otolith to fish size relationship. *Journal of Fish Biology* **58**: 1257-1273.
- FISCHER, P. (1999). Otolith microstructure during the pelagic, settlement and benthic phases in Burbot. *Journal of Fish Biology* **54**: 1231-1243.
- FITCH, J. E. e BROWNELL, R. L., JR. (1968). Fish otoliths in Cetacean stomachs and their importance in interpreting feeding habits. *Journal Fisheries Research Board of Canada* **25**(12): 2561-2574.
- FOLKVORD, A., BLOM, G., JOHANNESSEN, A. e MOKSNESS, E. (2000). Growth-dependent age estimation in herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Fisheries Research* **46**: 91-103.
- FOWLER, A. J. (1995). Annulus formation in otoliths of coral reef fish - A review. In *Recent Developments in Fish Otoliths Research*. (D. H. SECOR, J. M. DEAN & S. E. CAMPANA, eds.), pp 45-63, University of South Carolina Press
- FRANCIS, R. I. C. C. (1990). Back-calculation of fish length: a critical review. *Journal of Fish Biology* **36**: 883-902.
- FRANCIS, R. I. C. C. (1995). The analysis of otolith data - A mathematician's perspective. In *Recent developments in fish otolith research*. (D. H. Secor, J. M. Dean & S. E. Campana, eds.), pp 81-96, University of South Carolina Press

- FRIEDLAND, K. D., REDDIN, D. G., SHIMIZU, N., HAAS, R. E. e YOUNGSON, A. F. (1998). Strontium:calcium ratios in Atlantic salmon (*Salmo salar*) otoliths and observation on growth and maturation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 1158-1168.
- GAO, Y. W. e BEAMISH, R. J. (1999). Isotopic composition of otoliths as a chemical tracer in population identification of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 2062-2068.
- GARCIA, A. M. A. e MOYANO, P. D. (1990). *Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la bahía de Cadiz*. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. CSIC. Cadiz
- GARLAND, D. E. (1987). Recopilación de antecedentes sobre estudios de edad y crecimiento en peces basados en la microestructura de sus otolitos. In *Manejo y desarrollo pesquero*. (P. ARANA, eds.), pp 151-166, Escuela de Ciencias del Mar, Universidad Católica de Valparaíso
- GAULDIE, R. W. (1990). Phase differences between check ring locations in the orange roughy otolith (*Hoplostethus atlanticus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **47**: 760-765.
- GAULDIE, R. W. e NELSON, D. G. A. (1990). Otolith growth in fishes. *Compared Biochemical Physiology* **97A**(2): 119-135.
- GEFFEN, A. J. (1992). Validation of increment deposition rate. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 101-113, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117
- HAMRIN, S. F., ARNERI, E., DOERING-ARJES, P., MOSEGARD, H., PATWARDHANS, A., SASOV, A., SCHATZ, M., VAN DICK, D., WICKSTROM, H. e VAN HEEL, M. (1999). A new method for three-dimensional otolith analysis. *Journal of Fish Biology* **54**: 223-225.
- HÄRKÖNEN, T. (1986). *Guide to the otoliths of the bony fishes of the Northeast Atlantic*. Danbiu ApS. Hellerup. 256 p.
- JEARLD, A., JR., SASS, S. L. e DAVIS, M. F. (1993). Early growth, behaviour, and otolith development of the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *Fishery Bulletin, U. S.* **91**: 65-75.
- JONES, C. (1986). Determining age of larval fish with the otolith increment technique. *Fishery Bulletin, U. S.* **84**(1): 91-103.
- JONES, C. (1992). Development and application of the otolith increment technique. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 1-11, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117
- JONES, C. e BROTHERS, E. B. (1987). Validation of the otolith increment aging technique for Striped Bass, *Morone saxatilis*, larvae reared under suboptimal feeding conditions. *Fishery Bulletin, U.S.* **85**(2): 171-178.
- JOYEUX, J.-C., ALIAUME, C. e ZERBI, A. (2001). An alternative to validation of otolith microincrement. *Journal of Fish Biology* **58**: 873-879.
- KALISH, J. M., BEAMISH, R. J., BROTHERS, E. B., CASSELMAN, J. M., FRANCIS, C., MOSEGARD, H., PANFILI, J., PRINCE, E. D., THRESHER, R. E., WILSON, C. A. e WHRIGHT, P. J. (1995). Glossary. In *Recent Developments in Fish Otoliths Research*. (D. H. SECOR, J. M. DEAN & S. E. CAMPANA, eds.), pp 723-729, University of South Carolina Press

- KARLOU-RIGA, C. (2000). Otolith morphology and age and growth of *Trachurus mediterraneus* (Steindachner) in the Eastern Mediterranean. *Fisheries Research* **46**: 69-82.
- MARSHALL, S. L. e PARKER, S. S. (1982). Pattern identification in the microstructure of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **39**: 542-547.
- MASSUTI, E., MORALES-NIN, B. e MORANTA, J. (1999). Otolith microstructure, age, and growth patterns of dolphin, *Coryphaena hippurus*, in the western Mediterranean. *Fishery Bulletin, U. S.* **97**: 891-899.
- MASUDA, Y., OZAWA, T., ONOUE, O. e HAMADA, T. (2000). Age and growth of the flathead, *Platycephalus indicus*, from the coastal waters of west Kyushu, Japan. *Fisheries Research* **46**: 113-121.
- MCCURDY, W. J., PANFILI, J., MEUNIER, F. J., GEFFEN, A. J. e PONTUAL, H. (2002) Preparation of calcified structures. In *Manual of fish sclerochronology*. (J. PANFILI, H. PONTUAL, H. TROADEC & P. J. WRIGHT, eds.), pp. 331-357 Brest, France, Ifremer-IRD coedition.
- MONTEIRO, C. C. (1989). *La Faune Ichtyologique de la Lagune Ria Formosa (sud Portugal). Répartition et organisation spatio-temporelle des communautés: application à l'aménagement des ressources*. Thèse présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc pour obtenir le diplôme de Doctorat. Montpellier. 218 p
- MORALES-NIN, B. (1985). Características de los otolitos cristalinos de *Genypterus capensis* (Smith, 1847) (Pisces: Ophidiidae). *Investigacion Pesquera* **49**(3): 379-386.
- MORALES-NIN, B. (1988). Age determination in a tropical fish, *Lethrinus nebulosus* (Forsk., 1775) (Teleostei: Lethrinidae) by means of otolith interpretation. *Investigacion Pesquera* **52**(2): 237-244.
- MORALES-NIN, B. (1992). Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. *FAO Fisheries Technical Paper*. Rome, FAO. **322**: 51 p.
- MORALES-NIN, B. (2000). Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research* **46**: 53-67.
- MORALES-NIN, B. e RALSTON, S. (1990). Age and growth of *Lutjanus kasmira* (Forsk.) in Hawaiian waters. *Journal of Fish Biology* **36**: 191-203.
- MORALES-NIN, B., TORRES, G. J., LOMBARTE, A. e RECASENS, L. (1998). Otolith growth and age determination in the European Hake. *Journal of Fish Biology* **53**: 1155-1168.
- MORENO, T. e MORALES-NIN, B. (2003) Age determination and validation on otoliths of sand-smelt *Atherina presbyter* (Cuvier, 1829) (Pisces: Atherinidae) from the central-east Atlantic. *Fisheries Research* **62**: 77-87.
- MORITA, K. e MATSUSHI, T. (2001). A new model of growth back-calculation incorporating age effect based on otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 1805-1811.
- MOSEGARD, H. e MORALES-NIN, B. (2000). Editorial - Section 1: Otolith physiology and morphology. *Fisheries Research* **46**: 3-4.
- MOURA, I. M. e GORDO, L. S. (2000). Abundance, age growth and reproduction of grey mullets in Óbidos Lagoon, Portugal. *Bulletin of Marine Science* **67**(2): 677-686.

- MUGIYA, Y. (1987). Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fishery Bulletin, U.S.* **85**(3): 395-401.
- MUG-VILLANUEVA, M., GALLUCCI, V. F. e LAI, H.-L. (1994). Age determination of Corvina Reina (*Cynoscion albus*) in the Gulf of Nicoya, based on examination and analysis of hyaline zones, morphology and microstructure of otoliths. *Journal of Fish Biology* **45**: 177-191.
- MUUS, B. J., NIELSEN, J. G., DAHLSTROM, P. e NYSTROM, B. O. (1998). *Guía de Identificación de Peces de Mar del Atlántico y del Mediterráneo*. Ediciones Omega. Barcelona. 337 p.
- NARIMATSU, Y. e MUNEHARA, H. (1999). Spawn date dependent survival and growth in the early life stages of *Hypoptychus dybowskii* (Gasterosteiformes). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **56**: 1849-1855.
- NEILSON, J. D. (1992). Sources of error in otolith microstructure examination. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 115-125, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117
- NEILSON, J. D. e GEEN, G. H. (1985). Effects of feeding regimes and diel temperature cycles on otolith increment formation in juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fishery Bulletin, U.S.* **83**(1): 91-101.
- NEILSON, J. D., GEEN, G. H. e BOTTOM, D. (1985). Estuarine growth of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) as inferred from otolith microstructure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **42**: 899-908.
- NEILSON, J. D., GEEN, G. H. e CHAN, B. (1985). Variability in dimensions of salmonid otolith nuclei: implications for stock identification and microstructure interpretation. *Fishery Bulletin, U.S.* **83**(1): 81-89.
- NEUMAN, M. J., WITTING, D. A. e ABLE, K. W. (2001). Relationships between otolith microstructure, otolith growth, somatic growth and ontogenetic transitions in two cohorts of windowpane. *Journal of Fish Biology* **58**: 967-984.
- PAJUELO, J. G. e LORENZO, J. M. (2000). Biology of the sand smelt, *Atherina presbyter* (Teleostei: Atherinidae), of the Canary Islands (central-east Atlantic). *Environmental Biology of Fishes* **59**: 91-97.
- PAWSON, M. G. (1990). Using otolith weight to age fish. *Journal of Fish Biology* **36**: 521-531.
- PERTIERRA, J. P. e MORALES-NIN, B. (1989). Sardine growth in the Catalan Sea (NW Mediterranean) determined by means of otolith interpretation and length frequency data. *Scientia Marina* **53**(4): 821-826.
- POPPER, A. N. e LU, Z. (2000). Structure-function relationship in fish otolith organs. *Fisheries Research* **46**: 15-25.
- QUIGNARD, J.-P. e PRAS, A. (1986). Atherinidae. In *Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean*. (P. J. P. WHITEHEAD, M.-L. BAUCHOT, J.-C. HUREAU, J. NIELSEN & E. TORTONESE, eds.), pp 1207-1210 Paris, UNESCO
- QUIÑONEZ-VELÁZQUEZ, C. (1999). Age validation and growth of larval and juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, and pollock, *Pollachius virens*, on the Scotian Shelf. *Fishery Bulletin, U.S.* **97**: 306-319.

- RALSTON, S. e WILLIAMS, H. A. (1988). Numerical integration of daily growth increments: an efficient means of ageing tropical fishes for stock assessment. *Fishery Bulletin, U.S.* **87**: 1-16.
- RÉ, P. (1993). Anéis diários de crescimento nos otólitos dos estados larvares dos peixes: perspectivas em biologia pesqueira. *O Biólogo* **23**: 7-12.
- RÉ, P. (1999). *Ictioplâncton Estuarino da Península Ibérica - Guia de identificação dos ovos e estados larvares planctónicos*. Câmara Municipal de Cascais. 163 p.
- RÉ, P., ROSA, H. C. e DINIS, M. T. (1985). Diel rhythms in *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) larvae under controlled conditions: swim bladder inflation, feeding and otolith growth. *Investigacion Pesquera* **49**(3): 411-418.
- RÉ, P., ROSA, H. C. e DINIS, M. T. (1986). Daily microgrowth increments in the sagittae of *Dicentrarchus labrax* (L.) larvae under controlled conditions. *Investigacion Pesquera* **50**(3): 397-402.
- REAY, P. J. e CORNELL, V. (1988). Identification of grey mullet (Teleostei: Mugilidae) juveniles from British waters. *Journal of Fish Biology* **32**: 95-99.
- REBELO, J. E. (1993). *A Ictiofauna da Ria de Aveiro e o período lagunar do ciclo de vida do Robalo (Dicentrarchus labrax Linnaeus, 1758)*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor pela Universidade de Aveiro. 180 p.
- REZNICK, D., LINDBECK, E. e BRYGA, H. (1989). Slower growth results in larger otoliths: An experimental test with Guppies (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**: 108-112.
- SALDANHA, L. (1997). *Fauna Submarina Atlântica*. Publicações Europa-América. Lisboa. 364 p.
- SANTOS, P. J. T. (1987). *Fundamentos e modelos interpretativos de dinâmica de populações piscícolas*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 69 p.
- SANTOS, P. J. T. (1995). *Biologia e pesca do Areeiro-de-quatro-manchas, Lepidorhombus boschii Risso, na costa portuguesa*. Dissertação de Doutoramento em Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Policopiado. 232 p.
- SANTOS, P. J. T. (1997). *Ecologia Marinha e Pescas - Textos de Apoio*. Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências do Porto. Policopiado. 117 p.
- SCHWARCZ, H. P., GAO, Y., CAMPANA, S. E., BROWNE, D., KNYF, M. e BRAND, U. (1998). Stable carbon isotope variations in otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 1798-1806.
- SECOR, D. H. e DEAN, J. M. (1989). Somatic growth effects on the otolith - fish size relationship in young pond-reared Striped Bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**: 113-121.
- SECOR, D. H., DEAN, J. M. e LABAN, E. H. (1992). Otolith removal and preparation for microstructure examination. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (D. K. Stevenson & S. E. Campana, eds.), pp 19-57, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 117.

- SECOR, D. H. e ROOKER, J. R. (2000). Is otolith strontium a useful scalar of life cycles in estuarine fishes? *Fisheries Research* **46**: 369-371.
- SERVENTI, M., HARRISON, I. J., TORRICELLI, P. e GANDOLFI, G. (1996). The use of pigmentation and morphological characters to identify Italian mullet fry. *Journal of Fish Biology* **49**: 1163-1173.
- SHIAO, J. C., TZENG, C. S., LEU, C. L. e CHEN, F. C. (1999). Enhancing the contrast and visibility of daily growth increments in fish otoliths etched by proteinase K buffer. *Journal of Fish Biology* **54**: 302-309.
- SIROIS, P., LECOMTE, F. e DODSON, J. J. (1998). An otolith-based back-calculation method to account for time-varying growth rate in rainbow smelt (*Osmerus mordax*) larvae. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 2662-2671.
- SOBRAL, I. (1999). *A Fauna Ictiológica do Estuário do Mondego. Contribuição para o conhecimento da biologia e ecologia das populações*. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar. Lisboa. 228 p
- SOGARD, S. M. (1991). Interpretation of otolith microstructure in juvenile Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Ontogenetic development, daily increment validation, and somatic growth relationships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**: 1862-1871.
- STRONG, M. B., NEILSON, J. D. e HUNT, J. J. (1986). Aberrant crystallization of Pollock (*Pollachius virens*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **43**: 1457-1463.
- TAUBERT, B. D. e COBLE, D. W. (1977). Daily rings in otoliths of three species of *Lepomis* and *Tilapia mossambica*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **34**: 332-340.
- THORROLD, S. R. e WILLIAMS, D. M. (1989). Analysis of otolith microstructure to determine growth histories in larval cohorts of a Tropical Herring (*Herklotsichthys castelnaui*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**: 1615-1624.
- TROADEC, H. e BENZINOU, A. (2002) Computer-assisted age determination. In *Manual of fish sclerochronology*. (J. PANFILI, H. PONTUAL, H. TROADEC & P. J. WRIGHT, eds.), pp. 199-241 Brest, France, Ifremer-IRD coedition.
- VIGLIOLA, L., HARMELIN-VIVIEN, M. e MEEKAN, M. G. (2000). Comparison of techniques of back-calculation of growth and settlement marks from the otoliths of three species of *Diplodus* from the Mediterranean Sea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **57**: 1291-1299.
- WALDRON, M. E. e GERNEKE, D. A. (1997). Comparison of two scanning electron microscope techniques for examining daily growth increments of fish otoliths. *Journal of Fish Biology* **50**: 450-454.
- WALDRON, M. E. e KERSTAN, M. (2001). Age validation in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) otoliths. *Journal of Marine Science* **58**(4): 806-813.
- WANG, Y. T. e TZENG, W.-N. (1999). Differences in growth rates among cohorts of *Encrasicholina punctifer* and *Engraulis japonicus* in the coastal waters off Tanshui River Estuary, Taiwan, as indicated by otolith microstructure analysis. *Journal of Fish Biology* **54**: 1002-1016.
- WRIGHT, P. J., METCALF, N. B. e THORPE, J. E. (1990). Otolith and somatic growth rates in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L: evidence against coupling. *Journal of Fish Biology* **36**: 241-249.

- WRIGHT, P. J., PANFILI, J., MORALES-NIN, B. e GEFFEN, A. J. (2002). Types of calcified structures - Otoliths. In *Manual of fish sclerochronology*. (J. PANFILI, H. PONTUAL, H. TROADEC & P. J. WRIGHT, eds.), pp. 31-57 Brest, France, Ifremer-IRD coedition.
- ZAR, J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*, 4th edition. Prentice Hall. 663 p.

6. ANEXOS

ANEXO 1 – Dados dos Peixes capturados em 11/02/02 -Estuário do Douro

Atherina presbyter -

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
1	1,11	5,7	2055	2093
2	0,88	5,2	1973	1945
3	0,93	5,4	2097	1997
4	0,78	5,2	1871	1918
5	0,61	4,7	1733	1791
6	0,64	4,8	1709	1699

Liza aurata -

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T9	0,46	3,8	1290	1298
T12	0,36	3,4	1292	1206
T15	0,3	3,1	1173	1119
T16	0,32	3,2	1214	1176
T25	0,37	3,5	1202	1230
T28	0,3	3,3	1127	1128

Chelon labrosus

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T1	4,4	8	2665	2731
T2	3,16	6,9	2414	2382
T3	2,61	6,5	2308	2269
T4	4,74	8,1	2851	2912
T5	3,1	6,9	2365	2390
T6	2,02	5,8	2183	2111
T7	3,11	6,9	2468	2495
T8	2,62	6,4	2293	2299
T31	3,15	6,7	partido	2374
T32	2,22	6,1	partido	2233
T33	3,12	6,6	2355	2394
T34	1,88	5,7	2120	2135
T35	3,72	6,9	2570	2633
T36	2,59	6,3	2271	2272
T37	2,62	6,4	2180	2185
T38	2,4	6,2	2410	2320
T39	1,95	5,8	2223	2220
T41	2,13	6,1	2259	2265
T42	2,5	6,2	2303	2323

Liza ramada

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T13	0,95	4,5	1850	1874
T14	0,57	4,2	1539	1549
T17	0,34	3,5	1160	1173
T18	0,3	3,3	1078	1073
T19	0,31	3,3	1169	1122
T20	0,21	2,8	917	890
T21	0,09	2	506	partido
T22	0,28	3,1	997	partido
T23	0,31	3,1	1042	1047
T24	0,31	3,1	1193	1120
T26	0,13	2,3	727	partido
T27	0,09	2	555	615
T29	0,1	2,1	586	557
T30	0,12	2,3	655	757
T40	2,25	6	2302	2324
T43	0,92	3,9	1811	1828
T44	2,58	6,3	2437	2473
T45	0,23	3,1	1012,5	1032,1
T46	0,18	2,9	985	883
T47	0,35	3,3	1134,6	partido
T48	0,26	3,2	1154,9	partido
T49	0,28	3,2	1082,7	1123,2
T50	0,26	3,2	1170	partido
T51	0,2	3	991,5	partido
T52	0,18	2,8	888,4	902,6
T53	0,24	3,1	1072,1	1086,3

ANEXO 2 – Dados dos Peixes capturados em 20/08/02 -Estuário do Douro

Atherina presbyter

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
200	1,47	6	2053	2116
201	1,61	6,1	2156	2151
202	1,61	6,2	2081	2077
203	1,91	6,5	2177	2185
204	1,67	6,2	2145	2113
205	1,83	6,5	2098	2186
206	1,46	6	1997	2012
207	1,4	5,9	1951	1878
208	1,91	6,5	2117	2097
209	1,53	6,1	partido	2161
210	1,38	5,7	1925	1875
211	1,58	6	2118	partido
212	1,16	5,6	1932	1930
213	1,94	6,5	2259	2317
214	2,48	7	2310	2220
215	1,88	6,6	2192	2250
216	1,8	6,4	2135	partido
217	1,56	6	2036	2048
218	1,68	6,1	1992	1995
219	1,22	5,6	1823	1796
220	1,73	6,3	2100	2085
221	1,44	6,1	1917	1903
222	0,2	3,1	1058	1068
223	0,21	3,3	1094	1157
224	0,14	2,7	884	partido
225	0,13	2,7	partido	partido

Liza ramada

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T26	5,91	8,2	2879	2883
T27	3,87	7,5	2646	2582
T31	0,48	3,7	1240	1180
T34	0,57	3,7	1276	1287
T35	0,55	3,6	1154	1176
T50	0,43	3,5	1141	1116
T51	0,47	3,4	1241	1256
T52	0,62	3,9	1288	1264
T60	0,52	3,7	1185	1223
T110	0,63	3,8	1253	1204

Liza aurata

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T1	2,92	7	2389	2407
T2	3,47	7,4	2665	2684
T3	4,11	7,5	2525	2559
T4	3,84	7,4	2717	2719
T5	4,32	7,8	2696	2728
T6	3,8	7,5	2507	partido
T7	2,15	6,1	2252	2252
T9	3,6	7,4	2429	2574
T10	4,09	7,6	2570	2452
T11	3,21	7	partido	2752
T12	4,77	8,1	2662	2647
T13	3,28	6,8	2481	2450
T14	4,11	7,8	2826	2873
T15	2,54	6,4	2381	2375
T16	3,22	7,1	2579	partido
T17	4,17	7,7	2692	2684
T18	3,18	7,1	2454	2445
T19	1,92	5,8	2308	2309
T20	2,17	6	2253	2256
T21	2,85	6,8	2515	2507
T22	3,45	7,3	2710	2763
T23	3,13	7,2	2541	2510
T24	3,5	6,9	2588	2550
T25	1,81	5,9	2335	2315
T28	3,54	7,2	2903	2886
T29	3,86	7,2	2701	2675
T30	2,89	6,8	2446	2491

Chelon labrosus

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T32	0,51	3,8	1320	1330
T33	0,45	3,5	1163	1145
T36	0,83	4,2	1362	1387
T37	0,59	3,6	partido	1190
T38	0,75	4,2	1331	partido
T39	0,63	4	1248	1193
T40	0,69	3,9	1336	1360
T41	0,53	3,8	1226	1262
T42	0,53	3,6	1190	1202
T43	0,61	3,9	1396	1369
T44	0,66	4	1320	1345
T45	0,49	3,7	1197	1212
T46	0,58	3,8	partido	1376
T48	0,58	3,8	1387	1281

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T49	0,46	3,6	1134	1109
T53	0,64	4	1320	1290
T54	0,37	3,3	1051	1063
T55	0,29	3,1	partido	1011
T56	0,37	3,3	1048	1036
T57	0,56	3,7	partido	1214
T58	0,65	3,9	1324	1332
T59	0,4	3,4	1112	partido
T61	0,71	4,1	1317	1340
T62	0,56	3,7	1226	1187
T63	0,26	2,9	861	894
T64	0,43	3,5	1155	1174
T65	0,42	3,5	1150	1157
T66	0,32	3,1	partido	978
T67	0,25	2,9	844	889
T68	0,45	3,5	1206	1256
T69	0,35	3,1	1012	1034
T70	0,4	3,2	1018	1041
T71	0,52	3,7	1297	1284
T72	0,32	3	1055	1023
T73	0,26	2,9	921	912
T74	0,47	3,4	1082	1114
T75	0,28	2,9	898	911
T76	0,23	2,7	843	852
T77	0,25	2,7	920	920
T78	0,24	2,7	912	898
T79	0,25	2,9	967	951
T80	0,26	2,9	912	879
T81	0,17	2,5	739	730
T82	0,97	4,3	1514	1564
T83	0,68	4	partido	1483
T84	0,52	3,6	1210	partido
T85	0,46	3,7	1226	1222
T86	0,56	3,9	1251	1255
T87	0,6	3,9	1367	1378
T88	0,63	4	1428	partido
T89	0,55	3,7	partido	1199
T90	0,37	3,3	1098	1057
T91	0,66	4,1	1445	1498
T92	0,75	4,4	1414	1442
T93	0,61	3,9	1429	partido
T94	0,45	3,5	1154	1135
T95	0,59	3,7	1360	partido
T96	0,49	3,5	1270	1283
T97	0,55	3,6	partido	1210
T98	0,54	3,9	1291	1294
T99	0,33	3,2	1082	1086
T100	0,55	3,7	1220	1207
T101	0,5	3,6	1175	1165
T102	0,34	3,2	992	partido

Peixe	Peso indivíduo (g)	Comprimento total (cm)	Comprimento máximo do otólito direito (micra)	Comprimento máximo do otólito esquerdo (micra)
T103	0,42	3,4	1164	1199
T104	0,54	3,7	1243	1294
T105	0,48	3,5	1237	1213
T106	0,38	3,1	1026	991
T107	0,22	2,7	920	924
T108	0,91	4,4	1607	1615
T109	1,09	4,6	1590	1580
T111	0,65	3,9	1352	1351
T112	0,6	3,9	1205	1278
T113	1,03	4,5	1543	1530
T114	0,75	4,1	1480	1512
T115	0,69	3,9	1381	1333
T116	0,49	3,8	1211	1221
T117	0,71	4	1213	1193
T118	0,87	4,4	1599	1591
T119	0,61	3,8	1226	1212
T120	0,58	3,9	1385	1372
T121	0,68	4	1398	1346
T122	0,42	3,3	1045	1073

ANEXO 3 - Medições dos microincrementos**Liza ramada - Medições dos microincrementos capturas de Fevereiro**

Indivíduo	T13
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,65
2	2,16
3	1,82
4	2,08
5	1,65
6	1,78
7	2,12
8	3,35
9	2,80
10	1,74
11	4,15
12	1,86
13	1,36
14	2,12
15	5,08
16	4,11
17	4,96
18	4,49
19	5,89
20	3,77
21	4,49
22	3,94
23	3,77
24	6,27
25	5,34

2	1,22
3	1,04
4	1,09
5	1,20
6	1,04
7	1,26
8	1,64
9	1,48
10	1,58
11	1,48
12	3,06
13	2,68
14	1,12
15	3,12
16	2,23
17	2,33
18	2,33
19	2,33
20	2,79
21	2,33
22	3,23
23	3,24
24	3,24
25	1,23
26	1,32
27	1,12
28	2,22
29	2,33
30	2,24

Indivíduo	T14
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,41
2	2,12
3	2,50
4	2,73
5	2,73
6	2,65
7	2,35
8	2,65
9	2,42
10	2,58
11	2,65
12	3,03
13	2,88
14	2,58
15	2,88
16	3,33
17	3,56
18	3,45
19	3,56
20	3,67
21	3,79
22	3,90
23	3,03
24	4,22
25	4,13
26	3,23
27	3,32
28	3,33

Indivíduo	T18
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,98
2	2,10
3	1,60
4	1,32
5	1,98
6	2,02
7	2,30
8	2,12
9	2,32
10	2,19
11	2,79
12	2,32
13	3,02
14	2,32
15	3,00
16	3,32
17	1,19
18	1,99
19	1,32

Indivíduo	T17
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,32

Indivíduo	T19
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,42
2	3,11
3	3,32
4	2,32
5	2,19
6	2,32
7	3,21
8	4,12
9	1,19

10	3,19
11	3,19
12	3,11
13	2,24
14	2,34
15	2,85
16	2,10
17	2,01
18	3,21
19	4,11
20	4,05
21	1,01
22	1,01
23	1,22
24	3,20
25	2,06
26	3,10
27	2,06
28	2,90
29	1,90
30	1,66
31	1,56
32	2,42
33	1,52

Indivíduo T20

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,08
2	1,97
3	2,74
4	1,97
5	2,14
6	2,39
7	1,45
8	1,79
9	1,79
10	1,79
11	1,62
12	1,97
13	1,45
14	1,11
15	1,37
16	1,59
17	1,18
18	1,10
19	1,02
20	0,93
21	2,96
22	2,01
23	1,30
24	1,95
25	1,57
26	2,05

Indivíduo T21

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,41
2	1,11
3	1,43
4	1,23
5	0,95
6	1,01
7	1,09
8	1,37
9	0,87
10	0,98
11	0,94
12	0,90
13	0,86
14	0,82
15	0,79
16	0,75

17	1,06
18	1,06
19	1,85
20	1,30
21	2,00
22	2,06
23	2,10
24	2,33
25	2,30
26	2,89
27	1,29
28	2,00
29	1,90
30	3,09
31	3,89
32	2,98
33	2,89
34	1,09
35	0,93
36	2,90
37	1,90
38	1,32
39	0,90
40	0,90
41	0,75
42	0,99
43	0,90
44	1,51

Indivíduo T22

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,66
2	1,66
3	1,81
4	1,52
5	2,18
6	2,03
7	1,89
8	1,90
9	2,08
10	2,99
11	3,03
12	1,05
13	1,95
14	3,20
15	6,78
16	3,90
17	2,99
18	2,90
19	3,52
20	3,45
21	3,56
22	3,56
23	3,55
24	3,55
25	3,54
26	3,54
27	3,53
28	3,53
29	2,89
30	8,79
31	3,09

Indivíduo T23

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	4,18
2	3,35
3	2,88
4	2,18
5	2,18
6	3,18
7	2,41

8	7,65
9	10,76
10	5,12
11	5,71
12	5,00
13	3,47
14	5,60
15	5,64
16	5,68
17	5,73
18	5,77
19	5,81
20	6,19
21	5,16
22	6,15
23	4,15
24	7,05
25	9,15
26	3,81
27	7,89
28	6,90
29	3,02
30	2,06
31	2,95
32	1,85

Indivíduo	T26
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	4,57
2	4,47
3	2,91
4	7,03
5	4,72
6	2,34
7	3,22
8	3,88
9	1,05
10	0,89
11	0,79
12	0,78
13	0,96
14	0,79
15	1,09
16	1,17
17	1,29
18	1,19
19	1,23
20	1,37
21	1,49
22	2,33

23	1,88
24	1,79
25	1,18

Indivíduo	T51
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	5,88
2	6,59
3	6,06
4	3,12
5	4,18
6	4,71
7	5,65
8	5,71
9	4,65
10	7,24
11	4,88
12	6,59
13	6,88
14	4,47
15	7,59
16	7,94
17	6,35
18	6,65
19	3,53

Indivíduo	T53
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,80
2	1,42
3	1,66
4	2,06
5	2,16
6	1,60
7	1,36
8	1,41
9	1,80
10	2,49
11	1,49
12	2,13
13	1,46
14	1,93
15	1,69
16	2,42
17	3,00
18	1,13
19	1,56

Liza ramada - Medições dos microincrementos capturas de Agosto

Indivíduo	T27
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	4,55
2	4,15
3	3,25
4	4,63
5	3,17
6	3,98
7	3,82
8	3,50
9	2,60
10	3,01
11	5,20
12	4,31
13	3,74
14	3,33
15	4,55

16	5,37
17	4,23
18	5,69
19	3,82
20	4,47
21	4,31
22	5,45
23	3,41
24	3,50
25	3,25
26	4,15
27	3,17
28	5,28
29	4,39
30	5,37

Individuo	T31
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,22
2	3,32
3	1,21
4	3,23
5	4,66
6	3,01
7	1,32
8	3,12
9	2,90
10	3,78
11	4,90
12	3,89
13	4,57
14	2,69
15	6,96
16	6,89
17	6,96
18	6,32
19	4,85
20	6,95
21	5,97
22	4,85
23	3,51
24	0,83
25	0,90
26	0,89

Individuo	T35
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,86
2	1,56
3	1,85
4	2,96
5	2,86
6	4,52
7	3,35
8	2,85
9	2,67
10	1,32
11	2,96
12	3,23
13	3,06
14	3,05
15	2,10
16	2,99
17	2,96
18	2,98
19	2,96
20	1,52
21	1,02
22	1,09
23	0,92
24	0,99
25	0,97
26	0,98
27	1,05
28	1,12
29	1,35
30	1,39
31	1,29
32	1,69
33	1,99
34	2,02
35	2,96
36	3,41
37	2,09
38	1,95

Individuo	T50
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,66
2	2,41
3	2,24
4	1,92
5	2,30
6	2,31
7	1,51
8	1,48
9	1,54
10	1,62
11	1,84
12	1,28
13	1,55
14	1,91
15	1,98
16	1,49
17	1,45
18	1,40
19	2,00
20	1,94
21	1,97
22	1,74
23	1,97
24	2,10
25	2,96
26	1,85
27	1,80
28	1,64
29	1,02
30	1,35
31	1,30
32	1,26
33	1,21
34	1,16
35	1,11
36	1,07
37	1,02
38	0,97

Individuo	T51
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,90
2	2,51
3	2,96
4	3,05
5	3,74
6	3,06
7	2,68
8	3,28
9	2,19
10	2,13
11	1,48
12	1,97
13	2,46
14	2,35
15	1,80
16	2,08
17	2,13
18	3,55
19	2,70
20	2,79
21	2,88
22	2,97
23	3,06
24	3,15
25	3,24
26	1,37
27	1,75
28	2,68
29	3,83
30	3,72

31	2,24	3	2,96
32	2,46	4	2,98
33	3,42	5	2,95
34	3,65	6	1,75
35	2,98	7	1,97
36	2,96	8	1,58
37	2,01	9	1,80
38	1,97	10	3,01
39	1,99	11	1,64
40	1,44	12	1,91
41	3,85	13	1,95
42	1,95	14	2,85
43	3,85	15	0,85
44	2,99	16	0,96
45	2,99	17	0,79
46	2,73	18	0,96
47	1,86	19	1,97
48	1,97	20	1,87
49	1,86	21	1,32
50	2,08	22	2,99
51	2,30	23	2,85
52	2,74	24	1,95
53	2,65	25	0,97
		26	0,89
		27	0,78
		28	0,97
		29	0,87
		30	1,85
		31	2,29

Indivíduo	T52
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,85
2	1,85

Liza aurata - Medições dos microincrementos das capturas de Fevereiro

Indivíduo	T9
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,31
2	2,06
3	2,59
4	2,83
5	2,96
6	3,44
7	3,93
8	4,37
9	2,35
10	2,31
11	2,06
12	3,24
13	3,00
14	2,51
15	2,79
16	2,91

Indivíduo	T12
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,55
2	2,47
3	2,19
4	1,86
5	1,46
6	1,86
7	2,15
8	2,31
9	2,15
10	3,24
11	2,06
12	2,71
13	2,31
14	1,78
15	2,55
16	2,63
17	1,74
18	2,35
19	2,91
20	2,02
21	1,74
22	1,58
23	2,43

Indivíduo	T15
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,75
2	1,75
3	1,04
4	1,09
5	1,20
6	1,04
7	1,26
8	1,64
9	1,48
10	1,58
11	1,48
12	3,06
13	2,68
14	3,28

15	2,19
16	2,13
17	1,48
18	1,97
19	2,46
20	2,35
21	1,80
22	2,08
23	2,13

Indivíduo	T16
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,55
2	1,75
3	1,97
4	1,58
5	1,80
6	3,01
7	1,64
8	1,91
9	1,37
10	1,75
11	2,68
12	3,83
13	3,72
14	2,24
15	2,46
16	2,73
17	1,86
18	1,97
19	1,86
20	2,08
21	2,30
22	2,57
23	2,35
24	2,54
25	3,01

Indivíduo	T25
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,39
2	2,96
3	2,39
4	2,26
5	1,98
6	2,10
7	1,60
8	1,32
9	1,98
10	2,02
11	2,30
12	2,30
13	2,26
14	1,81
15	1,81
16	4,28
17	3,33
18	2,26
19	2,92

Indivíduo	T28		
Microincrementos	Largura (micrómetros)	16	4,70
1	2,91	17	1,71
2	1,97	18	3,08
3	3,50	19	1,97
4	2,39	20	2,74
5	4,53	21	1,97
6	2,99	22	2,14
7	1,79	23	2,39
8	1,71	24	1,45
9	2,82	25	1,79
10	2,39	26	1,79
11	3,16	27	1,79
12	3,33	28	1,62
13	2,05	29	1,97
14	3,08	30	1,45
15	4,53	31	1,11
		32	1,37
		33	1,59

Liza aurata - Medições dos microincrementos das capturas de Agosto

Indivíduo	T2		
Microincrementos	Largura (micrómetros)	8	1,28
1	3,11	9	1,74
2	2,61	10	2,79
3	3,09	11	2,56
4	2,21	12	3,37
5	2,13	13	2,33
6	1,60	14	2,21
7	1,76	15	2,44
8	2,42	16	2,79
9	2,05	17	3,60
10	1,33	18	3,14
11	1,62	19	2,79
12	1,94	20	3,02
13	1,76	21	3,95
		22	3,60
		23	3,84
		24	3,49
		25	3,26
		26	4,19

Indivíduo	T3		
Microincrementos	Largura (micrómetros)	27	2,91
1	2,47	28	3,02
2	1,62	29	4,42
3	2,18	30	2,79
4	2,61	31	3,14
5	2,31	32	2,44
6	2,02	33	2,44
7	2,34	34	2,33
8	1,78	35	3,49
9	2,15	36	3,72
10	1,97	37	3,02
11	1,76	38	3,84
12	2,21	39	2,09
13	2,42	40	2,33
14	2,71	41	1,98
15	2,34	42	2,21
16	2,85	43	2,44
17	3,48		
18	2,05		
19	1,65		

Indivíduo	T4	Indivíduo	T7
Microincrementos	Largura (micrómetros)	Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,09	1	1,97
2	2,44	2	1,37
3	2,91	3	1,79
4	1,74	4	1,97
5	1,86	5	1,71
6	1,40	6	2,74
7	1,63	7	3,42
		8	2,91
		9	1,97
		10	3,50
		11	2,39
		12	4,53

13	2,99
14	1,79
15	1,71
16	2,82
17	2,39
18	3,16
19	3,33
20	2,05
21	3,08
22	4,53
23	4,70
24	1,71
25	3,08
26	1,97
27	2,74
28	1,97
29	2,14
30	2,39
31	1,45
32	1,79
33	1,79
34	1,79
35	1,62
36	1,97
37	1,45
38	1,11
39	1,37
40	2,14
41	2,05
42	2,39
43	1,97
44	1,97
45	2,65
46	2,14
47	1,62
48	1,71
49	2,31
50	2,99
51	2,14
52	2,74
53	2,39
54	1,71
55	1,54
56	2,05
57	3,25
58	2,82
59	1,28
60	1,54
61	1,28
62	1,20
63	1,20
64	1,03
65	1,71
66	1,20
67	1,20
68	1,71
69	2,48
70	1,71
71	2,56
72	3,33
73	2,65
74	3,85
75	1,97
76	2,05
77	4,02
78	2,14
79	2,74
80	2,39
81	2,14
82	1,37
83	2,48
84	2,05
85	1,54
86	1,62
87	1,45
88	1,88

Indivíduo	T15
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,13
2	2,72
3	3,41
4	2,76
5	2,68
6	3,37
7	2,48
8	2,68
9	2,89
10	2,85
11	2,52
12	2,24
13	2,52
14	2,40
15	2,85
16	2,36
17	2,80
18	2,60
19	3,21
20	3,66
21	4,02
22	2,52
23	2,68
24	2,36
25	2,60
26	2,97
27	2,48
28	1,79
29	2,48
30	2,68
31	3,82
32	2,85
33	3,62
34	2,11
35	2,80
36	2,76
37	2,68
38	2,72
39	2,28
40	4,76

Indivíduo	T17
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	4,36
2	2,50
3	1,93
4	1,55
5	2,53
6	2,33
7	2,43
8	2,23
9	1,76
10	1,93
11	1,42
12	1,93
13	1,45
14	1,18
15	1,25
16	1,25
17	1,86
18	1,18
19	0,98
20	1,08
21	1,01
22	0,91
23	2,06
24	1,32
25	2,03
26	1,52

Indivíduo	T19
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,59
2	3,63
3	3,14
4	2,37
5	3,43
6	2,73
7	3,67
8	4,08
9	4,41
10	3,92
11	4,69
12	3,55
13	4,04

Indivíduo	T23
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,37
2	2,73
3	2,61
4	2,82
5	4,45
6	2,94
7	3,10
8	2,24
9	2,24
10	2,16
11	2,37
12	3,47
13	3,22
14	2,94
15	2,90
16	2,73
17	3,22
18	2,90
19	2,24
20	2,53
21	2,24
22	2,94
23	2,65
24	2,61
25	2,37
26	2,53
27	2,08
28	2,16
29	2,37
30	2,65
31	3,31
32	2,82
33	2,61
34	3,31

Indivíduo	T25
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,18
2	2,37
3	2,61
4	2,18
5	2,31
6	2,34
7	3,01
8	2,80
9	3,41
10	2,93
11	2,88
12	2,80
13	2,34
14	2,93
15	2,74
16	2,93
17	3,15

18	2,74
19	3,15
20	3,06
21	3,95
22	3,68
23	3,63
24	3,68
25	2,53
26	2,74
27	3,28
28	2,53
29	1,56
30	2,18
31	2,93
32	2,74
33	2,74
34	3,06
35	2,53
36	2,18
37	2,88
38	3,01
39	3,06
40	2,53
41	2,58
42	2,93

Indivíduo	T29
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,31
2	2,06
3	2,59
4	2,83
5	2,96
6	3,44
7	3,93
8	4,37
9	2,35
10	2,31
11	2,06
12	3,24
13	3,00
14	2,51
15	2,79
16	2,91
17	3,08
18	3,36
19	3,44
20	2,55
21	2,47
22	2,19
23	1,86
24	1,46
25	1,86
26	2,15
27	2,31
28	2,15
29	3,24
30	2,06
31	2,71
32	2,31
33	1,78
34	2,55
35	2,63
36	1,74
37	2,35
38	2,91
39	2,02
40	1,74
41	1,58
42	2,43
43	2,11
44	1,78
45	2,31

Chelon labrosus - Medições dos microincrementos capturas de Fevereiro

Indivíduo	T1
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,02
2	1,16
3	1,16
4	1,16
5	1,34
6	0,93
7	1,20
8	1,71
9	1,02
10	1,44
11	1,25
12	1,37
13	1,40
14	1,42

Indivíduo T2

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,53
2	1,16
3	1,06
4	1,30
5	1,16
6	1,02
7	1,16
8	1,16
9	1,16
10	1,34
11	0,93
12	1,20
13	1,71
14	1,02
15	1,44
16	1,25
17	1,06
18	1,06
19	0,97
20	1,16
21	1,11
22	0,88
23	1,06
24	1,25
25	1,67
26	1,71
27	1,99
28	1,90
29	1,85
30	2,27
31	2,96
32	2,45
33	1,34
34	1,99

Indivíduo

T4

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,96
2	2,45
3	1,34
4	1,99
5	1,18
6	0,78
7	1,11
8	0,88
9	1,06
10	1,25
11	1,67

12	1,71
13	1,99
14	1,90
15	2,04
16	2,16
17	2,29
18	2,41
19	2,53
20	2,66
21	2,78
22	2,91
23	3,03
24	3,16
25	3,28

Indivíduo

T5

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,60
2	1,94
3	3,24
4	3,09
5	3,60
6	3,31
7	3,31
8	2,01
9	1,87
10	2,45
11	2,45
12	2,23
13	1,80
14	2,23
15	2,01
16	2,01
17	1,87
18	2,09
19	2,01

Indivíduo

T6

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,78
2	1,72
3	1,37
4	2,17
5	1,13
6	1,78
7	2,09
8	0,84
9	1,27
10	1,74
11	1,28
12	1,25
13	1,54
14	1,72
15	1,42
16	2,09
17	1,53
18	1,53
19	1,52
20	1,52
21	1,51
22	1,51
23	1,50
24	1,50
25	1,49
26	1,49

Indivíduo	T7
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,32
2	3,51
3	3,51
4	3,70
5	2,53
6	3,51
7	2,61
8	2,87
9	3,32
10	3,51
11	3,14
12	3,06
13	3,51
14	2,98
15	3,43
16	3,24
17	3,16
18	2,61
19	2,79
20	2,90
21	3,43
22	3,24

Indivíduo	T8
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,78
2	2,55
3	2,63
4	1,74
5	2,35
6	2,91
7	2,02
8	1,74
9	1,58
10	2,43
11	2,11
12	1,78
13	2,31
14	2,02
15	2,00
16	1,98
17	1,96
18	1,94
19	1,92
20	1,90
21	1,88
22	1,87
23	1,85
24	1,83

Indivíduo	T31
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,62
2	3,62
3	2,92
4	2,55
5	2,76
6	2,47
7	3,21
8	5,88
9	5,51

10	6,22
11	2,91
12	1,58
13	2,43
14	2,11
15	2,02
16	2,30

Indivíduo	T33
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,39
2	2,96
3	2,39
4	2,26
5	1,98
6	2,10
7	1,60
8	1,32
9	1,98
10	2,02
11	2,30
12	2,30
13	2,26
14	1,81
15	1,81
16	4,28
17	3,33
18	2,26
19	2,92
20	3,91
21	3,05
22	3,03
23	3,09
24	3,14
25	3,20
26	3,25
27	3,30
28	3,36
29	3,41

Indivíduo	T41
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,97
2	1,69
3	1,62
4	1,54
5	1,26
6	1,76
7	1,33
8	1,62
9	1,41
10	1,97
11	1,97
12	1,69
13	1,76
14	2,53
15	2,12
16	1,48
17	1,69
18	1,90
19	2,33
20	1,82
21	1,45
22	1,57
23	1,88
24	1,86
25	1,77
26	1,77
27	1,68
28	1,98

29	2,20
30	1,58
31	1,97
32	1,92
33	2,48
34	1,65
35	2,06
36	2,42
37	2,27
Indivíduo	T41
Microincrementos	Largura (micrómetros)

1	1,95
2	2,09
3	2,61
4	1,15
5	1,66
6	1,66
7	1,81
8	1,52
9	2,18
10	2,03
11	1,60
12	1,09
13	1,01
14	1,31
15	2,18

Chelon labrosus - Medições dos microincrementos capturas de Agosto

Indivíduo	T38
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	11,08
2	9,12
3	6,76
4	5,49
5	9,12
6	13,24
7	9,61
8	12,94
9	12,25
10	11,08
11	11,08
12	10,98
13	4,61
14	8,63
15	9,12
16	10,59
17	8,33
18	8,63
19	6,27
20	5,78
21	6,27
22	7,94
23	10,29
24	5,49
25	7,65
26	9,31
27	6,18
28	8,63
29	8,63
30	10,49
31	6,96
32	7,35
33	8,33
34	5,29
35	5,78
36	6,47
37	5,29
38	8,43
39	9,31
40	11,96
41	12,75
42	12,16
43	9,12
44	9,61
45	11,47
46	9,12
47	6,96
48	6,67

Indivíduo	T39
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,81
2	2,23
3	2,59
4	3,02
5	2,37
6	2,37
7	3,24
8	2,30
9	1,94
10	2,16
11	2,52
12	1,51
13	1,94
14	2,59
15	1,87
16	1,80
17	2,01
18	1,80
19	2,45

Indivíduo	T69
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	8,63
2	9,12
3	10,59
4	8,33
5	8,63
6	6,27
7	5,78
8	6,27
9	7,94
10	10,29
11	5,49
12	7,65
13	9,31
14	7,29
15	7,18
16	7,08
17	6,97
18	6,87
19	6,76
20	6,66
21	6,55
22	6,45
23	6,34
24	6,24
25	6,13
26	6,03

Indivíduo	T70
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,64
2	1,48
3	1,58
4	1,48
5	3,06
6	2,68
7	3,28
8	2,19
9	2,13
10	1,48
11	1,97
12	2,46
13	2,35
14	1,80
15	2,08
16	2,13
17	3,55
18	1,75
19	1,97
20	1,58
21	1,80
22	3,01
23	1,64
24	1,91
25	1,37
26	1,75
27	2,68
28	3,83
29	2,94
30	3,09

Indivíduo	T71
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,45
2	1,18
3	2,52
4	1,48
5	1,97
6	2,46
7	2,35
8	1,80
9	2,08
10	2,13
11	3,05
12	2,65
13	2,96

Indivíduo	T72
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	1,97
2	1,97
3	2,65
4	2,14
5	1,62
6	1,71
7	2,31
8	2,99

9	2,14
10	2,74
11	2,39
12	1,71
13	1,54
14	2,05
15	3,25
16	2,82
17	1,28
18	1,54
19	1,28
20	1,20
21	1,20

Indivíduo	T73
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	2,65
2	2,35
3	2,65
4	2,42
5	2,58
6	2,97
7	3,01
8	3,05
9	2,58
10	2,88
11	2,89
12	2,93
13	2,65
14	3,03
15	2,88

Indivíduo	T74
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	3,86
2	2,65
3	3,11
4	4,62
5	4,85
6	4,92
7	3,56
8	3,48
9	3,79
10	2,73
11	2,12
12	2,88
13	3,41
14	1,97
15	3,86
16	2,50
17	2,05
18	2,05
19	2,35
20	2,73
21	2,80
22	2,80
23	3,03
24	4,17
25	2,50

Atherina presbyter - Medições dos microincrementos capturas de Agosto

Indivíduo	200
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	6,65
2	9,31
3	12,50
4	8,51
5	11,44
6	13,83
7	15,16
8	15,69
9	13,56
10	12,23
11	13,30
12	13,83
13	13,03
14	12,23
15	13,03
16	14,89
17	7,18
18	7,98
19	10,64
20	9,04
21	6,38
22	11,17

Indivíduo	202
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	9,57
2	9,04
3	10,64
4	7,71
5	11,70
6	12,50
7	12,50
8	13,56
9	9,84
10	9,04
11	9,57
12	8,78
13	11,44
14	9,04
15	8,78
16	8,78

Indivíduo	203
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	12,65
2	11,22
3	11,44
4	13,83
5	15,16
6	15,69
7	14,89
8	7,18
9	7,98
10	10,64
11	9,04
12	6,38
13	11,17
14	7,94
15	7,52
16	8,16
17	11,23

18	9,24
19	12,33
20	9,22
21	8,24
22	11,23
23	11,23
24	13,46
25	11,52
26	12,63
27	12,94
28	13,24
29	13,55
30	13,86
31	7,93
32	6,55
33	5,66
34	5,45
35	11,26
36	9,16
37	12,56
38	9,52
39	8,16
40	9,17
41	10,13
42	11,13
43	12,98
44	11,26
45	12,26

Indivíduo	204
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	7,10
2	6,69
3	6,27
4	5,85
5	5,43
6	5,02
7	4,60
8	6,52
9	7,25
10	9,56
11	11,22
12	12,26
13	11,51
14	9,52
15	9,56
16	8,63
17	8,82
18	9,49
19	10,16
20	11,16
21	10,16
22	10,49
23	9,16
24	7,52
25	7,21
26	6,38
27	5,90
28	8,58
29	5,85
30	5,43
31	5,02
32	4,60
33	9,52
34	4,89

Indivíduo	205
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	12,22
2	13,20
3	11,26
4	11,32
5	11,26
6	10,25
7	11,16
8	10,95
9	9,89
10	8,90
11	9,25
12	9,89
13	11,95
14	12,26
15	11,16
16	9,59
17	10,22
18	9,25
19	8,52
20	9,22
21	8,15
22	9,15
23	10,21
24	11,63
25	10,52
26	9,52
27	7,15
28	8,20
29	9,49
30	9,52
31	8,21
32	9,56
33	9,52
34	8,16
35	7,22
36	8,16
37	9,16
38	6,22
39	9,16
40	8,52
41	8,19
42	9,31
43	8,65
44	6,20
45	4,52
46	9,42
47	6,95
48	4,42
49	5,89
50	6,20
51	3,59

Indivíduo	207
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	6,56
2	7,20
3	5,84
4	6,24
5	8,16
6	4,40
7	3,84
8	2,24
9	4,56
10	3,84
11	6,32
12	3,36
13	7,92
14	10,24
15	3,76
16	4,72

17	10,96
18	6,64
19	7,44
20	6,48
21	6,48
22	11,52
23	5,36
24	6,16
25	8,08
26	7,36
27	9,04
28	6,64
29	8,64
30	6,32
31	2,40
32	6,16
33	1,68
34	6,08
35	2,96
36	6,16
37	6,32
38	6,32
39	3,60
40	6,40
41	5,12
42	8,32
43	4,56
44	6,80
45	5,12
46	5,36
47	5,36
48	5,36
49	5,36
50	6,64
51	7,20
52	5,76

Indivíduo	210
Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	4,40
2	3,84
3	2,24
4	4,56
5	3,84
6	6,32
7	3,36
8	7,92
9	10,24
10	3,76
11	4,72
12	10,96
13	6,64
14	7,44
15	6,48
16	6,48
17	11,52
18	5,36
19	6,16
20	8,08
21	7,36
22	8,59
23	8,81
24	9,02
25	9,23
26	9,44
27	9,65
28	9,86
29	10,07
30	10,28
31	10,49
32	10,71
33	10,92
34	11,13
35	11,34

36	11,55
37	11,76
38	11,97
39	12,18
40	12,40
41	12,61

Indivíduo 211

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	6,90
2	6,13
3	4,21
4	9,15
5	4,55
6	4,72
7	10,96
8	6,64
9	7,44
10	6,48
11	6,48
12	11,52
13	5,36

Indivíduo 212

Microincrementos	Largura (micrómetros)
1	6,23
2	9,16
3	8,21
4	9,23
5	8,16
6	7,16
7	9,22
8	8,22
9	8,52
10	9,52
11	7,16
12	8,16
13	9,52
14	5,54
15	9,26
16	5,22
17	9,23
18	9,12
19	5,16
20	3,22
21	3,26
22	5,27
23	6,26
24	2,32
25	2,22

ANEXO 4 – Determinação das taxas de crescimento

Liza aurata

Comprimento Indivíduo (cm)	Idade (Dias)	Taxa Crescimento (mm/dia)
7,4	362	0,20
6,1	273	0,22
6,4	292	0,22
7,7	465	0,17
7,2	329	0,22
3,4	152	0,22
3,8	169	0,22
3,1	137	0,23
3,2	146	0,22
3,5	147	0,24
3,3	130	0,25
7,4	340	0,22
7,5	320	0,23
5,8	240	0,24
5,9	260	0,23
7,2	330	0,22
Média		0,222231
Desv padrão		0,018942
Intervalo de confiança 95%		0,009281

Atherina presbyter

Comprimento Indivíduo (cm)	Idade (Dias)	Taxa Crescimento (mm/dia)
6	122	0,49
5,9	128	0,46
6,2	140	0,44
6,5	136	0,48
6,2	150	0,41
6,5	170	0,38
5,7	85	0,67
6	110	0,55
5,6	85	0,66
6,5	190	0,34
7	240	0,29
6,6	180	0,37
6,4	170	0,38
Média		0,45553
Desv padrão		0,114993
Intervalo confiança 95%		0,0625

Liza ramada

Comprimento Indivíduo (cm)	Idade (Dias)	Taxa Crescimento (mm/dia)
4,5	178	0,25
2,3	51	0,45
3	74	0,41
3,1	77	0,40
7,5	378	0,20
4,2	146	0,29
3,5	140	0,25
3,3	116	0,28
3,3	120	0,28
2,8	76	0,37
2	53	0,38
3,1	85	0,36
3,1	63	0,49
3,7	112	0,33
3,6	114	0,32
3,5	130	0,27
3,4	150	0,23
3,9	140	0,28
Média		0,324141
Desv padrão		0,080773
Intervalo de confiança 95%		0,037315

Chelon labrosus

Comprimento Indivíduo (cm)	Idade (Dias)	Taxa Crescimento (mm/dia)
----------------------------	--------------	---------------------------

4,2	62	0,67
3,9	213	0,18
6,9	421	0,16
5,8	298	0,19
6,1	372	0,16
6,2	313	0,20
8	480	0,17
8,1	460	0,18
6,9	387	0,18
6,9	360	0,19
6,4	330	0,19
6,7	335	0,20
6,1	340	0,18
6,6	345	0,19
3,1	150	0,21
3,2	139	0,23
3,7	180	0,21
3	85	0,35
2,9	79	0,37
3,4	90	0,38

Média	0,239759
-------	----------

Desv padrão	0,121878
-------------	----------

Intervalo de confiança 95%	0,053414
----------------------------	----------

ANEXO 5 – Determinação da idade de entrada no Estuário*L. aurata*

	Idade (dias)
T9	16
T15	18
T23	22
T24	17
T25	19
T30	17

Média	18,16667
Desv. Padrão	2,136976
Intv confiança 95%	1,709903

C. labrosus

Indivíduo	Idade (dias)
T33	19
T37	23
T43	18
T76	20
T78	21

Média	20,2
Desv. padrão	1,923538
Intv confiança 95%	1,686022

ANEXO 6 – Determinação da data de nascimento dos indivíduos*Liza aurata*

Data captura	Idade (Dias)	Data de nascimento
20-08-02	362	23-08-01
20-08-02	273	20-11-01
20-08-02	292	01-11-01
20-08-02	465	11-05-01
20-08-02	329	25-09-01
11-02-02	152	12-09-01
11-02-02	169	25-08-01
11-02-02	137	27-09-01
11-02-02	146	18-09-01
11-02-02	147	16-09-01
11-02-02	130	03-10-01
20-08-02	340	14-09-01
20-08-02	320	04-10-01
20-08-02	240	23-12-01
20-08-02	260	03-12-01
20-08-02	330	24-09-01

Atherina presbyter

Data Captura	Idade (Dias)	Data de nascimento
20-08-02	122	20-04-02
20-08-02	128	14-04-02
20-08-02	140	02-04-02
20-08-02	136	06-04-02
20-08-02	150	23-03-02
20-08-02	170	03-03-02
20-08-02	85	27-05-02
20-08-02	110	02-05-02
20-08-02	85	27-05-02
20-08-02	190	11-02-02
20-08-02	240	23-12-01
20-08-02	180	21-02-02
20-08-02	170	03-03-02

Liza ramada

Data Captura	Idade (Dias)	Data de nascimento
11-02-02	178	16-08-01
11-02-02	51	22-12-01
11-02-02	74	28-11-01
11-02-02	77	26-11-01
20-08-02	378	07-08-01
11-02-02	146	18-09-01
11-02-02	140	24-09-01
11-02-02	116	18-10-01
11-02-02	120	14-10-01
11-02-02	76	27-11-01
11-02-02	53	20-12-01
11-02-02	85	18-11-01
11-02-02	63	10-12-01
20-08-02	112	30-04-02
20-08-02	114	28-04-02
20-08-02	130	12-04-02
20-08-02	150	23-03-02
20-08-02	140	02-04-02

Chelon labrosus

Data Captura	Idade (Dias)	Data de nascimento
20-08-02	62	18-06-02
20-08-02	213	19-01-02
11-02-02	421	16-12-00
11-02-02	298	19-04-01
11-02-02	372	04-02-01
11-02-02	313	04-04-01
11-02-02	480	19-10-00
11-02-02	460	08-11-00
11-02-02	387	20-01-01
11-02-02	360	16-02-01
11-02-02	330	18-03-01
11-02-02	335	13-03-01
11-02-02	340	08-03-01
11-02-02	345	03-03-01
20-08-02	150	23-03-02
20-08-02	139	03-04-02
20-08-02	180	21-02-02
20-08-02	85	27-05-02
20-08-02	79	02-06-02
20-08-02	90	22-05-02

ANEXO 7- Determinação do etching adequado

Duração do <i>etching</i>	HCl (0,1%)	EDTA (5%)
	N.º de otólitos sujeitos a este processo de <i>etching</i>	N.º de otólitos sujeitos a este processo de <i>etching</i>
	N.º de otólitos seleccionados para contagem e medição dos microincrementos	N.º de otólitos seleccionados para contagem e medição dos microincrementos
20 seg.	10	10
	6	3
30 seg.	10	10
	5	5
50 seg.	10	10
	5	10
1 min.	8	8
	5	6
1 min. 15 seg.	8	8
	4	5
1 min. 30 seg.	8	8
	2	3
1 min. 45 seg.	8	7
	2	3
2 min.	7	8
	1	2