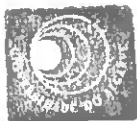


MARIA ALEXANDRA ANICA TEODÓSIO CHÍCHARO

**ASSISTENTE DA UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS
UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

**MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL
EM LARVAS DE *SARDINA PILCHARDUS* (WALBAUM, 1792)
APLICADOS AO ESTUDO DAS
CONDIÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA NO MEIO NATURAL**

**FARO
1996**



MARIA ALEXANDRA ANICA TEODÓSIO CHÍCHARO

ASSISTENTE DA UNIDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DOS RECURSOS AQUÁTICOS
UNIVERSIDADE DO ALGARVE

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL EM LARVAS DE
SARDINA PILCHARDUS (WALBAUM, 1792)
APLICADOS AO ESTUDO DAS
CONDIÇÕES DE SOBREVIVÊNCIA NO MEIO NATURAL

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve
para a obtenção do grau de Doutor

FARO
1996

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

512 98 | 22304

592
CBI - Mct

1

A très Marias

Aceptamos como buena la tendencia humana a buscar y descubrir regularidades en la aparente confusión de las observaciones y colocar luego las regularidades identificadas, dentro de un sistema intelectual de relaciones, al que damos valor explicativo y predictivo. (...) La teoría no ha de ser un sistema rígido, sino cierta actitud mental, cierto molde donde se pueden ir colocando más datos - cuyo valor inmediatamente se desvanece - y donde dichos datos adquieren, provisionalmente, significado, es decir, no atentan a nuestra fe de que la Naturaleza sigue siendo comprensible. (...) Es vana la pretensión de encerrar toda la Naturaleza en los sistemas de ecuaciones, puede ser también efectivo sentarse a ver discurrir las aguas de un río y a escuchar el susurro de las hojas de los árboles.

(Margalef, 1986)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Pedro Ré pela disponibilidade e empenho constante que sempre demonstrou na orientação dos vários trabalhos que desenvolvi, na área do ictioplâncton, incluindo esta tese. Por outro lado, o acesso que me proporcionou a amostras já recolhidas, na costa espanhola provenientes do projecto de investigação e cooperação europeu SARP (Sardine Anchovy Recruitment Project), enriqueceu notavelmente o presente trabalho.

À Professora Lucília Coelho pela orientação da presente tese e pela preparação do estágio realizado na Universidade de Aberdeen. Para além disso, a crítica construtiva a nível da definição do plano de trabalho e a atenção na fase de revisão do manuscrito, constituíram um inestimável auxílio.

Ao Professor Sadat Muzavor pelo apoio que concedeu à investigação nas fases preliminares desta tese, sobretudo através dos contactos estabelecidos com a Universidade de Kiel.

Ao Professor Bernt Zeisztchel e à Doutora Catriona Clemmesen da Universidade de Kiel (Institut fur Meerskunde), ao Professor Peter Boyle e ao Doutor Dominic Houlihan da Universidade de Aberdeen (Zoology Departament) pela possibilidade oferecida de integrar as suas equipas de investigação e assim aprender técnicas que foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

Aos colegas que, a bordo de navio de investigação alemão "Poseidon" durante Abril e Maio de 1992, colaboraram nas recolhas de larvas de sardinha na costa algarvia, nomeadamente o Professor Karim Erzini e os Drs. Jorge Pinto e Pedro Lino.

À Dra. Ana Miranda e ao Doutor Luís Valdez pelo acesso a dados complementares sobre os cruzeiros realizados em Espanha.

Ao Professor Pedro Andrade pela leitura crítica e atenta do manuscrito.

Aos colegas e amigos de longa data, Dra. Ana Barbosa, Dr. Luís Faísca e Dra. Teresa Modesto, pelo seu contributo em diferentes fases deste trabalho, respectivamente na amostragem, no tratamento estatístico e na edição.

Ao Sr. J. Magro pela participação e preciosa ajuda no trabalho de campo.

Ao Instituto Nacional de Investigação Científica (I.N.I.C.) por ter apoiado financeiramente o presente trabalho, através da atribuição de uma Bolsa de Doutoramento (nº 30156).

Ao programa ERAMUS, à Fundação Calouste Gulbenkian, à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (J.N.I.C.T.) e ao Serviço Alemão de Intercâmbio Académico (D.A.A.D.) por financiarem as deslocações e estadias decorrentes dos dois estágios realizados na Universidade de Kiel (Institut für Meerskunde) e do estágio que decorreu na Universidade de Aberdeen.

Aos meus amigos, Nani, Fernando, Célia, Helder, Guida e Miguel pelo incentivo e encorajamento manifestados.

Aos meus familiares, sobretudo à minha mãe e às minhas tias, pelo apoio incondicional fornecido desde sempre.

À minha filha Ana por me dar a vontade e a energia, que tanto contribuíram, para que este trabalho chegasse a bom termo e ao meu marido Luís pelo carinho, dedicação e ajuda indispensáveis para a sua concretização.

RESUMO

A presente dissertação teve por objectivo avaliar a utilidade da análise do estado nutricional, através diferentes índices, bem como a sua aplicação ao estudo das condições de sobrevivência das larvas de peixes, em particular de *Sardina pilchardus*, no meio natural. Esta espécie é um pequeno pelágico, alvo tradicional de uma pescaria importante na costa Atlântica da Península Ibérica, cujo recrutamento anual denota uma variabilidade elevada. É comumente aceite que a compreensão dessas flutuações necessita do estudo aprofundado dos factores que influenciam a mortalidade durante as fases iniciais do desenvolvimento dos peixes. No entanto, o conhecimento sobre esses factores é reduzido, especialmente para a espécie em causa. Com efeito, apesar de existirem indicações que as larvas de peixe em geral, e as de clupeídeos, em particular, são especialmente sujeitas à predação e à inanição no meio marinho, estes factores raramente têm sido estudados *in situ*.

Neste trabalho analisaram-se diferentes índices de condição, geralmente considerados com boas perspectivas de aplicação à investigação dos vários factores que afectam a sobrevivência das larvas, concretamente índices morfométricos e bioquímicos. Através de uma comparação preliminar entre estes índices, concluiu-se que os bioquímicos parecem ser mais apropriados em estudos desta natureza. De entre os índices testados, RNA/larva, DNA/larva, RNA/peso seco, DNA/peso seco, RNA/DNA, proteína insolúvel/larva, proteína insolúvel/peso seco, RNA/proteína insolúvel, proteína insolúvel/DNA, a razão RNA/DNA surgiu como a melhor opção porque, para além da independência da dimensão larvar e do menor coeficiente de variação em cada situação, demonstrou maior sensibilidade ao regime alimentar a que as larvas estiveram sujeitas.

Para a determinação dos ácidos nucleicos optou-se pela técnica fluorimétrica, depois da sua comparação com outra mais tradicional, a espectrofotométrica. A validação dos índices bioquímicos analisados foi realizada através de uma experiência *in situ*, onde se limitou a disponibilidade alimentar para as larvas de sardinha. Desta forma evitou-se os inconvenientes conhecidos da validação dos índices de condição em laboratórios, com ambientes artificiais, que dificilmente simulam a natureza. Desta experiência resultou a determinação do "nível crítico" da razão RNA/DNA (1.3), este será o limite abaixo do qual a sobrevivência das larvas, no seu meio natural, estará posta em causa.

A realização de colheitas de plâncton, em várias estações ao longo da costa Sul de Portugal (Algarve) e da costa Norte e Noroeste de Espanha, permitiram a recolha de 1015 larvas de sardinha que foram utilizadas para a análise individual da condição nutricional. Os resultados obtidos foram relacionados com diferentes parâmetros abióticos e bióticos, como a temperatura, a turbulência, a densidade de presas (microplâncton) e a densidade de predadores potenciais (mesoplâncton) das larvas de peixe.

Verificou-se que alguns dos parâmetros físicos e biológicos analisados diferiram entre locais, o que pareceu reflectir-se, de uma forma mais ou menos acentuada, na condição larvar. De facto, na costa algarvia foi o transecto de Albufeira que apresentou os valores médios mais elevados da razão RNA/DNA, a que estiveram associados a maior abundância de predadores e de presas, bem como o valor mais elevado de velocidade do vento. Por outro lado, na costa espanhola, as áreas a Noroeste registaram os valores mais elevados na condição larvar, o que se relacionou, especialmente, com a existência de afloramento nessa zona.

De acordo com o “nível crítico” determinado para a razão RNA/DNA, os resultados evidenciaram que os comprimentos mais sensíveis à inanição situaram-se no intervalo entre os 8 mm e os 16 mm, o que contraria a hipótese do “período crítico”, tradicionalmente aceite. De facto, o intervalo de comprimento inferior a 8 mm, no qual se incluíram as larvas no período de transição entre a alimentação endógena e exógena, apresentou percentagens de inanição mais reduzidas. Uma amostragem diferencial das várias classes de dimensão larvar, pelo aparelho de recolha, poderá constituir uma explicação.

A análise temporal e espacial da inanição mostrou que, em Dezembro de 1991 na costa algarvia e em Maio de 1991 na costa espanhola, a percentagem de larvas em inanição foi nula. Contudo, na Primavera de 1992 capturam-se algumas larvas em inanição, sendo a percentagem superior na costa algarvia (4.6%) relativamente à costa espanhola (1%). Apesar de, na maioria das estações os valores obtidos serem nulos, na costa algarvia nos transectos de Albufeira e Sagres, a percentagem de larvas em *stress* alimentar atingiu, por vezes, os 12%, revelando que a inanição em escalas espaciais restritas pode ser importante.

Quer na costa espanhola, quer na costa algarvia os valores da razão RNA/DNA foram, de uma forma geral, relativamente elevados e a inanição pareceu ser pouco frequente para as larvas de *S. pilchardus* recolhidas. Tal pode ser interpretado, tanto através de uma condição nutricional efectivamente boa da população larvar, como pela acção da predação que eliminou as larvas mais fracas. A menor percentagem de larvas em inanição na costa espanhola poderá indiciar uma predação mais intensa nessa zona. Isto provavelmente resultará da menor temperatura da água, a qual através da redução do metabolismo da larva, provocará uma desaceleração do crescimento, pelo que a duração da vida planctónica e a exposição aos predadores será maior. A relação entre a média e o desvio padrão da taxa de crescimento proteico, determinada através de medições individuais da razão RNA/DNA nas larvas e da temperatura da água, evidenciou uma menor dispersão dos valores na costa espanhola. Este facto, também se relacionará com uma maior acção da predação sobre as larvas de sardinha provenientes da costa espanhola relativamente à costa algarvia, a qual terá eliminado os indivíduos com taxas de crescimento mais reduzidas. Assim, verificou-se que a importância relativa da inanição e da predação sobre as larvas de sardinha não foi constante nem no espaço nem no tempo. Desta forma, as conclusões deste trabalho evidenciam que através da análise de índices de condição, como a razão RNA/DNA e complementarmente através da taxa de crescimento proteico, é possível avaliar a importância relativa dos factores, alimentação e predação, associados normalmente à sobrevivência larvar.

Propõe-se assim que, a determinação da razão RNA/DNA em larvas de peixe seja considerada um aspecto a privilegiar em estudos futuros integrados que visem esclarecer os processos associados à variabilidade do recrutamento de espécies como *S. pilchardus*. Para tal, no caso da Península Ibérica será necessário, entre outros aspectos, uma monitorização de longa duração e em toda a extensão da costa, da abundância total e da condição das mesmas larvas. Desta forma, evitar-se-à a inclusão de indivíduos em fraco estado nutricional, sem condições de sobrevivência durante a vida planctónica, em comparações entre a densidade larvar e o manancial de recrutas. Com efeito, a possibilidade de que o recrutamento possa ser influenciado por factores que actuam durante a fase planctónica sublinha a necessidade de, nesta área da investigação, se complementarem os estudos de abundância com dados sobre condição larvar.

Methods for the evaluation of the nutritional state of *Sardine pilchardus* (WALBAUM, 1792) larvae applied on the study of survival conditions in nature

ABSTRACT

The present dissertation has as its objective the assessment of the application of different indexes of nutritional state on the study of survival conditions of fish larvae in nature. The species which this study concentrated on, the Iberian sardine (*Sardine pilchardus*) is the traditional target of an important pelagic fishery on the Atlantic coast of the Iberian Peninsula, whose annual recruitment is subject to high variability. It is generally accepted that the understanding of these fluctuations requires an in - depth knowledge of the factors which influence mortality during the initial phases of the development of the fish. Yet, the knowledge in this area is sparse, especially in relation to the species in question. Although indications exist that larvae, in general, and those of clupeids, in particular, are especially subject to predation and to starvation in the sea, these factors have rarely been studied *in situ*.

This work analysed the morfometrics and biochemicals conditions indexes, which are actually regarded as potentially important instruments in evaluating the impact that various factors have on the survival of larvae. A preliminary comparison of the different indexes, revealed that biochemical seemed to be the more appropriate for studies of this nature. Among the indexes tested, RNA/larvae, DNA/larvae, RNA/dry weight, DNA/dry weight, RNA/DNA, insoluble protein /larvae, insoluble protein/ dry weight, RNA/ insoluble protein, insoluble protein/DNA, the RNA/DNA emerged as the best choice because it demonstrated the greatest responsiveness to larval feeding regimes, besides being independent of larval dimension and producing the lowest variation coefficient in each situation.

To determine the nucleic acids, flurimetric technique was chosen after it had been compared with the more traditional, spectrofometric technique. In order to avoid the difficulties acknowledged in the validation of the condition indexes under laboratory conditions, which hardly simulate nature, it was decided to proceed with validation *in situ*, restricting the feeding availability of sardine larvae. From this experiment, it was concluded that there is a limit below which the larvae's survival in its natural habitat will not occur, that is, its critical ratio, which for RNA/DNA ratio was calculated as 1.3.

The capturing of plankton in various stations along the coast of southern Portugal (Algarve) and the northern and northwest coast of Spain, resulted in the capture of 1015 sardine larvae which were subjected to individual nutritional condition analysis. The results obtained were related to different abiotic and biotic factors, such as temperature, turbulence, prey density (microplankton) and potential predators of fish larvae (mesoplankton).

Some of the physical and biological parameters analysed differed among locations and this seemed to be reflected in the condition of the larvae. In fact, in the coast of the Algarve, in the transect of Albufeira, the highest mean RNA/DNA values were recorded; it was also in this transect that the greatest concentration of predators and prey were detected, and in which wind velocity was highest. In the Spanish coast, the areas to the northwest recorded the highest values for the condition of larvae; these values were attributed, in particular, to the upwelling in that zone.

According to the critical level RNA/DNA ratio established, the results showed that the larval length interval more susceptible to starvation was between 8 mm and 16 mm, which fact contradicts the traditionally accepted "critical period" hypothesis. In fact, a larval length interval of less than 8 mm - which larval length applies also to larvae length undergoing transition between endogenous and exogenous feeding - recorded low percentages of starvation. A differential sample of the different classes of larvae with various dimensions caught by the net might offer an explanation.

The temporal and spatial analysis of starvation revealed that in December 1991, in the Algarve coast, and in May of 1991 on the Spanish coast, the percentage of starving larvae was nil. However, in the Spring of 1992 some starving larvae were caught, the percentage in the Algarve coast (4.6%) being higher in comparison to the Spanish coast (1%). Notwithstanding that in the majority of stations the values were nil, there were other stations in the Algarve coast, namely in the Albufeira and Sagres transects, where the percentage of larvae suffering feeding stress was 12%, suggesting that starvation in certain limited areas might be significant.

The RNA/DNA ratio were, in general, relatively high whether in the Spanish or the Algarve coast. According to the critical level established, starvation of *S. pilchardus* caught off the Iberian Peninsula, appears to occur with little frequency. The lower percentage of starving larvae found on the Spanish coast could be attributed to more intense predation effects. This could result from lower water temperatures, which by reducing the level of metabolism in the larva retards its growth, thereby prolonging its planktonic life stage leading to greater exposure to its predators. In addition, the relation between the average and standard deviation of the proteic growth, established by RNA/DNA and water temperature, showed greater predation effects over sardine larvae from Spanish coast relative to the coast of the Algarve. This action of predation would have eliminated the larvae in weak condition. Thus it was verified that the significance relative to starvation and predation of sardine larvae was not constant as to space nor time.

It follows that conclusions reached in this work reveal that through analysis of condition indexes, such as the RNA/DNA ratio, it is possible to make inferences as to relative significance of each of the factors, feeding and predation, which are normally associated with larval survival in the sea.

Thus the determination of RNA/DNA ratios in fish larvae ought to occupy an important place in integrated future studies which aim to clarify the processes associated with the recruitment variability of species, such as *S. pilchardus*. In future studies it will be necessary, among other aspects, to monitor for a long period of time, and to cover the whole Iberian Peninsula coast, the abundance and the condition of sardine larvae. Only then will larvae, in a weak nutritional state who will not survive the planktonic stage, be prevented from being included in larval density comparisons with recruits. Indeed, the possibility that the recruitment process of larvae might be influenced by factors which play a role in initial phases of its life cycle, underlines the necessity of complementing the results obtained for larval abundance, with data relating to larval condition.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS EM LARVAS DE PEIXE	
1 - Introdução.....	13
2 - Material e Métodos.....	14
2.1 - Técnica espectrofotométrica.....	14
2.2 - Técnica fluorimétrica.....	18
2.3 - Comparação das técnicas.....	20
2.4 - Técnicas de homogeneização.....	21
2.5 - Grau de purificação dos ácidos nucleicos.....	22
2.6 - Percentagem de recuperação dos ácidos nucleicos.....	23
2.7 - Determinação de proteínas insolúveis.....	23
2.8 - Reagentes.....	25
2.9 - Tratamento dos dados.....	25
3- Resultados.....	26
3.1 - Comparação das técnicas espectrofotométrica e fluorimétrica.....	26
3.2 - Comparação das técnicas de homogeneização.....	27
3.3 - Purificação dos ácidos nucleicos extraídos.....	28
3.4 - Limite de detecção, coeficiente de variabilidade e percentagem de recuperação dos ácidos nucleicos.....	28
4 - Discussão.....	29
5 - Conclusões.....	34
CAPÍTULO III - VALIDAÇÃO DOS INDICES BIOQUÍMICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DO ESTADO NUTRICIONAL DE LARVAS DE <i>SARDINA PILCHARDUS</i>	
1 - Introdução	37
2 - Material e Métodos.....	40
2.1 - Experiência no meio natural.....	40
2.2 - Análise bioquímica.....	43
2.3 - Tratamento dos dados.....	44
3 - Resultados.....	45
3.1 - Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	46
3.2 - Ácido ribonucleico (RNA).....	48
3.3 - Proteína insolúvel (Pins).....	49
3.4 - RNA/Pins.....	51
3.5 - Pins/DNA	51
3.6 - RNA/DNA.....	52

4 - Discussão.....	53
4.1 - Ácido desoxirribonucleico (DNA).....	53
4.2 - Ácido ribonucleico (RNA).....	55
4.3 - Proteína insolúvel (Pins).....	57
4.4 - RNA/Pins.....	57
4.5 - Pins/DNA.....	58
4.6 - RNA/DNA.....	59
5 - Conclusões.....	65

CAPÍTULO IV - ESTADO NUTRICIONAL EM LARVAS DE *SARDINA*

PILCHARDUS NA COSTA SUL DE PORTUGAL E NO NORTE DE ESPANHA

1 - Introdução.....	67
2 - Material e métodos.....	72
2.1 - Costa portuguesa.....	72
2.2 - Costa espanhola.....	80
2.3 - Estimativa da taxa instantânea de crescimento proteico.....	86
2.4 - Tratamento dos dados.....	87
3- Resultados.....	93
3.1- Costa portuguesa.....	93
3.1.1- Parâmetros abióticos.....	93
3.1.2 - Parâmetros bióticos.....	102
3.1.3 - Conteúdo do tubo digestivo.....	107
3.1.4 - Morfometria.....	109
3.1.5 - Índices bioquímicos.....	128
3.1.6 - Percentagem de larvas em inanição.....	148
3.1.7 - Taxa de crescimento proteico.....	153
3.1.8 - Padrão geral de variação das concentrações dos ácidos nucleicos e das proteínas insolúveis com o comprimento..	155
3.2- Costa espanhola.....	158
3.2.1 - Parâmetros abióticos.....	158
3.2.2 - Distribuição das larvas.....	160
3.2.3 - Conteúdo do tubo digestivo.....	160
3.2.4 - Comprimento das larvas e índices bioquímicos.....	161
3.2.5 - Percentagem de larvas em inanição.....	184
3.2.6 - Taxa de crescimento proteico.....	186
3.2.7 - Padrão geral de variação das concentrações dos ácidos nucleicos e das proteínas insolúveis com o comprimento....	188
3.3 - Comparação entre anos e zonas de estudo.....	191

4 - Discussão.....	194
4.1-Índices sobre o estado nutricional e sua relação com parâmetros ambientais.....	194
4.1.1 - Temperatura	204
4.1.2 - Vento e turbulência.....	209
4.1.3 - Predação.....	213
4.1.4 - Alimentação.....	219
4.2 - Percentagem de inanição.....	231
4.3 - Crescimento larvar.....	235
5 - Conclusões.....	243
CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	249
REFERÊNCIAS.....	253
ANEXOS	
Anexo I - Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos aos índices bioquímicos obtidos nas larvas provenientes da experiência de validação.....	291
Anexo II - Coordenadas das estações amostradas na costa algarvia e espanhola	295
Anexo III - Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos ao comprimento e aos índices bioquímicos obtidos para as larvas de sardinha recolhidas na costa algarvia e parâmetros ambientais acompanhantes	299
Anexo IV - Correlações entre os parâmetros analisados na costa algarvia.....	305
Anexo V - Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos ao comprimento e aos índices bioquímicos obtidos para as larvas de sardinha recolhidas na costa espanhola	307
ÍNDICE DAS TABELAS E DAS FIGURAS	311

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Desde o início do século que se reconhece a importância da disponibilidade de presas, no meio marinho, na condição das larvas de peixe (LEBOUR, 1918, 1919). Foi esta autora que, baseando-se na observação directa dos conteúdos estomacais de larvas de várias espécies de peixe, pôs termo à tendência que defendia que a nutrição das fases iniciais do desenvolvimento se baseava na absorção directa de matéria orgânica existente na água (PUTTER, 1909). No entanto, a necessidade de capturar presas, de forma a assegurar a sobrevivência, só se coloca a partir de certa fase, até à qual a larva subsiste à custa das reservas vitelinas (CUSHING, 1975; HUNTER, 1981).

Segundo BALON (1984), esta transição da alimentação endógena para a alimentação exógena é mais crítica que a própria eclosão, sendo decisiva na sobrevivência futura do indivíduo. Com efeito, após a exaustão do vitelo ocorre uma fase, por isso, geralmente denominada de "período crítico" (HJORT, 1914; MARR, 1956; MAY, 1974; WIBORG, 1976).

A inexistência de presas, nas concentrações e dos tipos adequados, pode conduzir a larva ao "ponto de não retorno" (PNR) (BLAXTER & HEMPEL, 1963), a partir do qual ocorre um processo irreversível de inanição, mesmo que as presas se tornem posteriormente disponíveis. Esta situação pode ocorrer no fim da fase de larva com saco vitelino, ou posteriormente após um período de alimentação. As larvas neste estado apresentam uma debilidade que as impossibilita de ingerir presas, digeri-las, absorver os nutrientes e mesmo de reparar tecidos muito deteriorados, o que se traduz numa incapacidade para sobreviver (STRUSSMANN & TAKASHIMA, 1992). Assim, a condição geral de uma larva de peixe, num determinado momento, é condicionada sobretudo pelo tipo e abundância de alimento de que dispôs no período anterior (BUCKLEY & LOUGH, 1987; ROBINSON & WARE, 1988; BAILEY *et al.*, 1995; CANINO & CALDARONE, 1995; CLEMMESSEN, 1987a,b, 1988, 1990, 1993, 1994; FOLKVORD & MOKSNESS, 1995).

Ao longo do tempo têm sido desenvolvidos vários procedimentos que visam determinar a condição nutricional das larvas capturadas no meio marinho. As primeiras referências a métodos concretos de determinação do estado nutricional das fases iniciais da vida dos peixes, basearam-se nas alterações morfológicas que os indivíduos sofrem quando o alimento escasseia, nomeadamente na avaliação da robustez física (SHELBOURNE, 1957). Porém, nesta área a relação entre o peso e o comprimento, ou seja o factor de condição, teve uma maior aceitação (HEMPEL & BLAXTER, 1963; VILELA & ZIJSTRA, 1971; SAMEOTO, 1972; WESTERNHAGEN & ROSENTHAL, 1981). No entanto, verificou-se que, para além das alterações morfológicas, existem também um conjunto de modificações a nível histológico (EHRlich *et al.*, 1976; O'CONNELL, 1976) e químico (MARSHALL *et al.*, 1937; PARKER & VANSTONE, 1966; BALBONTIN *et al.*, 1973; EHRlich, 1974; STIRLING, 1976) associadas ao estado nutricional dos indivíduos.

Durante o período de escassez de plâncton as alterações nas larvas revelam-se primeiro a nível químico, através de um decréscimo da quantidade de lípidos (SETZLER-HAMILTON *et al.*, 1987) e de proteínas, bem como de um aumento da quantidade de água (EHRlich, 1974). Seguidamente, a nível histológico, a estrutura e a integridade das células começam a degradar-se, diminuindo de dimensões, o que conduz a um aumento do espaço intercelular e ao colapso dos tecidos moles (THEILACKER, 1978; STRUSSMANN & TAKASHIMA, 1990). Só por fim, as alterações morfológicas se tornam evidentes, apresentando-se o corpo da larva curvado e fino, tendo uma cabeça desproporcionadamente grande (THEILACKER, 1980a). De facto, na ausência de alimento, as alterações na morfologia do organismo podem demorar sete ou mais dias a serem perceptíveis, enquanto que a nível dos tecidos a sua detecção é mais precoce, entre dois a cinco dias (SUTHERS *et al.*, 1992). Ainda mais rápidas são as alterações no conteúdo celular, uma vez que podem ocorrer logo após algumas horas de ausência de alimento e até passados cinco dias, dependendo do composto em causa (UEBERSCHAR & CLEMMESSEN, 1992).

Desta forma, existem um série de métodos morfométricos, histológicos e químicos que proporcionam informação com diferente grau de precocidade sobre o estado nutricional das larvas (SIEG *et al.*, 1989; SUTHERS *et al.*, 1992)

A nível da morfologia, as características morfométricas têm sido preferidas na determinação do estado nutricional das larvas de peixe, uma vez que são quantificáveis. Através de medições, como a altura do corpo ou a altura da cabeça, consegue-se separar larvas em bom estado nutricional, de larvas em condições de inanição, sobretudo quando se trata de estados de desenvolvimento relativamente avançados (BLAXTER, 1971; EHRLICH *et al.*, 1976).

A histologia das larvas de peixe tem também apresentado boas possibilidades para o desenvolvimento de critérios de determinação do estado nutricional (OOZEKI *et al.*, 1989; STRUSSMANN & TAKASHIMA, 1990). As alterações, que ocorrem nas células e nos tecidos num período de escassez de alimento, têm a vantagem de serem independentes da idade. Para além disso, os tecidos não são influenciados pelas modificações das dimensões reais da larva no processo de recolha e fixação e que afectam os índices morfométricos (O'CONNELL, 1976, 1980). O diâmetro das células do intestino médio das larvas é, dos vários critérios histológicos, aquele que recebe uma atenção crescente (THEILACKER & WATANABLE, 1989).

Por último, a análise de componentes químicos para a determinação do estado nutricional das fases larvares dos peixes é relativamente recente, embora a investigação neste campo em adultos seja já considerável (LOVE, 1970). Os trabalhos desenvolvidos em larvas dedicaram-se, inicialmente, apenas a alguns dos constituintes do organismo, como a água, as substâncias inorgânicas, os carboidratos, as proteínas e os lípidos totais (MARSHALL *et al.*, 1937; EHRLICH, 1974). Mais recentemente têm sido utilizados compostos mais específicos como as enzimas (ALLIOT *et al.*, 1977; HAKANSON, 1988; UEBERSCHAR, 1987, 1988; LAUF & HOFFER, 1984) e os ácidos nucleicos (BAILEY *et al.*, 1995; CANINO & CALDARONE, 1995). Estes últimos envolvem métodos químicos mais modernos e são preferidos por muitos autores, pois tornam-se

relativamente mais rápidos que os histológicos, uma vez que envolvem técnicas menos laboriosas. Para além disso oferecem, também, como se referiu, uma maior precocidade na detecção dos sintomas da inanição.

A selecção dos índices bioquímicos mais adequados, ao estudo da condição larvar, necessita também de uma análise preliminar sobre o "comportamento" que os compostos químicos utilizados apresentam durante a privação de alimento. De facto, os vários compostos têm respostas características em condições de ausência de alimento (Tabela I.1).

As enzimas digestivas, nomeadamente a tripsina, apresentam uma diminuição marcada, poucas horas após a ausência de alimento mas que se acentua passados três dias (DABROWSKI, 1982; HJELMELAND *et al.*, 1984; PEDERSEN *et al.*, 1987; PEDERSEN & HJELMELAND, 1988; UEBERSCHAR, 1993). Comportamento semelhante é apresentado pelos carboidratos (EHRlich, 1976) e pelos lípidos neutros, enquanto os lípidos estruturais têm uma resposta mais lenta (MARTIN *et al.*, 1984; HAKANSON, 1984, 1988; St. JONH & LUND, 1996).

Os ácidos nucleicos, através do ácido ribonucleico (RNA), parecem apresentar o tipo de resposta mais adequada às condições de inanição. Por um lado, a alteração na concentração de RNA não é muito rápida, evitando-se, neste caso, que a informação obtida não expresse o verdadeiro estado do organismo, uma vez que podem existir reservas energéticas suficientes para assegurar as funções vitais normais, num período curto de ausência de alimento (horas). Por outro lado, este tipo de macromoléculas também, não tem uma resposta muito lenta, permitindo prever as alterações a médio prazo, como a diminuição da actividade do indivíduo ou carências de determinados nutrientes, e que podem ser suficientes para conduzir a um processo irreversível de morte (quer por inanição quer por predação).

Tabela I.1- Comparação dos principais métodos de determinação do estado nutricional em larvas de peixe.

MÉTODOS MORFOMÉTRICOS	Resposta à falta de alimento	Tempo de processamento	Influência do conteúdo tubo digestivo	Informação adicional	Referências
Robustez física	muito lenta	reduzido	nula	---	SHELBOURNE (1957)
Comprimento/ peso	lenta	reduzido	nula	---	HEMPEL & BLAXTER (1963)
Índices morfológicos	lenta	reduzido	nula	---	MCGURK (1985)
Espessura anéis otólitos	rápida	médio	nula	crescimento	RÉ <i>et al.</i> (1988) MCGURK (1984)
MÉTODOS HISTOLÓGICOS	Resposta à falta de alimento	Tempo de processamento	Influência do conteúdo tubo digestivo	Informação adicional	Referência
	média	elevado	nula	---	O'CONNELL (1976)
MÉTODOS QUÍMICOS	Resposta à falta de alimento	Tempo de processamento	Influência do conteúdo tubo digestivo	Informação adicional	Referências
Água	lenta	reduzido	nula	---	EHRlich (1974)
Proteínas	lenta	médio	reduzida	crescimento	HOULIHAN <i>et al.</i> (1986)
Lípidos	média	médio	reduzida	---	HAKANSON (1988)
Hidratos carbono	rápida	médio	reduzida	---	STIRLING (1976)
Enzimas	rápida	médio	elevada	nível alimento	UEBERSCHAR (1988)
Ácidos nucleicos	média	médio	reduzida	crescimento	CLEMMESSEN (1994)

Desta forma, os ácidos nucleicos, *per si*, ou através de relações entre eles e as proteínas, parecem constituir uma das formas mais apropriadas para se determinar a condição larvar. A detecção correcta de uma larva em fraca condição nutricional é essencial em estudos que pretendam contribuir para uma melhor compreensão dos factores responsáveis pela mortalidade larvar no meio natural.

As causas de mortalidade nas fases larvares de peixes no meio natural são várias. Por um lado, podem ser causas episódicas provocando decréscimos acentuados de abundância em períodos restritos, como o transporte em massa para locais não favoráveis, doenças epidémicas, temperaturas letais e poluição aguda (BARRON & ADELMAN, 1984, 1985; HOUDE, 1989b.; STEINHART & ECKMANN, 1992; MCGURK *et al.*, 1992). Por outro lado, podem actuar de forma subtil removendo gradualmente uma determinada percentagem de indivíduos, dependendo por exemplo da acção subletal de poluentes (WESTERNHAGEN, 1988) e de parasitas (MENESES & RÉ, 1991), mas associam-se sobretudo ao aumento ou declínio das taxas de predação e inanição (LEGGETT & DEBLOIS, 1994). Por este motivo, a condição nutricional das larvas é especialmente relevante neste processo (HUNTER, 1981; LASKER, 1987; BAILEY & HOUDE, 1989).

Contudo, é necessário considerar que existem acontecimentos episódicos que afectam a condição larvar e que não são directamente dependentes do seu estado nutricional inicial (HOUDE, 1989b), pelo que a condição larvar não expressa apenas a condição nutricional. Porém, a falta de alimento provoca também maior susceptibilidade a produtos tóxicos, alterações de pH, variações no oxigénio dissolvido, infecções e mesmo à predação, o que levou a que inanição fosse considerada como factor, quer directo quer indirecto, de mortalidade (MAY, 1974).

Com efeito, as larvas em má condição nutricional crescem mais devagar, estão sujeitas aos efeitos cumulativos da inanição, da predação e dos factores físicos desfavoráveis. Por outro lado, as larvas em bom estado nutricional têm maior capacidade de capturar presas e estão menos susceptíveis à predação (RICE *et al.*, 1987; HAKANSON, 1988; PETERMAN *et al.*, 1988). Nesta perspectiva justifica-se que os índices sobre o estado nutricional sejam considerados um instrumento privilegiado para avaliar as condições de sobrevivência potencial das larvas de peixe no meio natural (ROBINSON & WARE, 1989; SUTHERS, 1992).

Existem, normalmente, vários problemas associados aos estudos das condições de sobrevivência larvar na natureza. As estimativas da mortalidade larvar são muitas vezes imprecisas e não comparáveis entre autores (LO *et al.*, 1989), o mesmo ocorrendo, com as abundâncias de alimento e de predadores (BAILEY & HOUDE, 1989). Assim, é difícil identificar os factores que influenciam a sobrevivência, a não ser que a predação e a alimentação afectem características mensuráveis nos sobreviventes, o que acontece com o estado nutricional e com a taxa de crescimento (PEPIN, 1989a). Com efeito, segundo este autor, a importância relativa da predação, da inanição e dos factores hidrológicos desfavoráveis expressa-se na condição fisiológica das larvas.

As relações entre a disponibilidade de presas, a densidade de predadores e determinados factores físicos desfavoráveis e a sobrevivência larvar são, obviamente, mais intuitivas e simples de descrever em experiências laboratoriais, mas até há pouco eram difíceis de demonstrar em larvas capturadas no meio marinho. Uma alteração acentuada nesta situação poderá ocorrer com a introdução dos índices de condição que permitem a análise do estado nutricional das larvas de peixe na natureza (SUTHERS, 1992).

A utilização dos índices de condição nutricional poderá, assim, contribuir para o esclarecimento de uma problemática que surgiu no início do século (MURRAY & HJORT, 1912; HJORT, 1914; WALDORF, 1938), e que continua por resolver. Deste essa altura que se discute qual a principal causa de mortalidade das larvas de peixe e se tenta relacionar tal factor com a dimensão da futura classe anual. Por um lado, ainda não se sabe de forma inequívoca quais são, de entre as variáveis possíveis, alimentação, predação ou factores hidroclimáticos, aquela ou aquelas que têm o papel preponderante na sobrevivência larvar. Por outro lado, não existem evidências conclusivas de que as variações na taxa de mortalidade larvar determinem o recrutamento. Contudo, e apesar da ligação entre a sobrevivência das fases pré-juvenis e o recrutamento não estar ainda suficientemente consolidada (MYERS & CADIGAN, 1993; CUSHING, 1995; BROWMAN, 1995), existem estudos que evidenciaram uma forte relação entre a sobrevivência durante as fases embrionária e larvar e a fase juvenil

(METHOD, 1983; CRECCO & SAVOY, 1984, 1987; BERGMAN *et al.*, 1988; BRADFORD, 1992; MYERS & CADIGAN, 1993).

Actualmente, uma das questões mais prementes que se coloca aos estudos de dinâmica dos recursos haliêuticos é a explicação da variabilidade do recrutamento das espécies. As flutuações no recrutamento de espécies com interesse como recurso pesqueiro assumem particular importância, uma vez que podem originar grandes variações na biomassa disponível para a pesca, especialmente no caso dos clupeídeos (TROADEC, 1978). A pesca é uma actividade de grande importância económica e social caracterizada por variações, mais ou menos acentuadas, nas capturas. Assim, o conhecimento dos factores responsáveis por essas flutuações é fundamental, como suporte a medidas de controlo dos mananciais, tanto a nível da conservação dos recursos (perspectiva ecológica) como da regulação da exploração (perspectiva socio-económica).

Tradicionalmente, uma das causas mais indicada como responsável pelas flutuações da abundância dos recursos pesqueiros é a mortalidade por pesca, estando o colapso de algumas populações associada à sobrepesca (MYERS, 1996). Esta, no entanto, não parece ser a responsável exclusiva por essas flutuações (CUSHING, 1975). HJORT (1914) foi um dos primeiros investigadores a sugerir a importância do recrutamento nas variações das capturas. Para este autor a dimensão das classes anuais seria determinada numa fase muito inicial da vida dos peixes, pressupostamente durante a fase embrionária ou larvar. Nesta perspectiva, o estudo das fases não exploradas dos recursos piscícolas reveste-se de grande importância.

A controvérsia e a falta de conhecimento que existe, ainda no seio da comunidade científica, no que se refere a alguns aspectos da fase planctónica dos peixes, pode contribuir para a ausência da relação entre a abundância larvar e o recrutamento (HEMPEL, 1974; MOSER & ALHSTROM, 1976; ALHSTROM & MOSER, 1979; ALDERDICE, 1985; LASKER, 1987).

Com efeito, e apesar dos vários trabalhos sobre a ecologia do ictioplâncton marinho de Portugal e Espanha (Tabela I.2), esta área apresenta ainda algumas lacunas. Na Península Ibérica, os estudos relativos ao ictioplâncton incidiram, numa primeira fase, na inventariação das espécies capturadas em águas costeiras, passando-se em seguida a analisar aspectos ecológicos, nomeadamente as distribuições horizontais e verticais dos ictioplanctontes, bem como a localização das épocas e áreas de postura. Contudo, o estudo relativo a aspectos particulares, como o estado nutricional das larvas não tem sido especialmente privilegiado.

Tabela I.2 - Estudos de ecologia do ictioplâncton na costa portuguesa e espanhola.

Local	Data das recolhas	Referências
Costa ocidental portuguesa	1979-1982	RÉ (1984)
Costa ocidental portuguesa	1983	BOUCHER <i>et al.</i> (1983)
Costa Norte de Portugal	1987	ANDRES <i>et al.</i> (1992)
Costa Sul de Portugal	1981-1983	AFONSO (1991)
Costa algarvia	1977	RÉ (1978)
Estuário do Mondego	1988-1989	RIBEIRO (1991)
Estuário do Tejo	1977-1981	RÉ (1978, 1984, 1990)
Lagoa de Albufeira	1984-1985	DUARTE (1986)
Estuário do Sado	1986-1988	RÉ (1978) DUARTE (1991)
Estuário do Mira	1984-1989	RÉ (1987, 1990, 1991, 1995)
Ria de Alvor	1985-1986	ANTUNES <i>et al.</i> (1988)
Ria Formosa	1988	CHICHARO & TEODÓSIO (1991c)
Estuário do Guadiana	1988	CHICHARO & TEODÓSIO (1991a,b)
Costa Norte de Espanha	1984 e 1987-1988	FRANCO & SOLÁ (1988)
Costa Norte de Espanha	1987-1989	SOLÁ <i>et al.</i> (1990)
Ria de Arosa	1974-1975	LOPEZ-JAMAR (1977)
Ria de Vigo	1979-1980	FERREIRA & LABARTA (1984)

A falta de alimento durante a fase larvar no meio natural acarreta consequências importantes para a sobrevivência, que assumem uma importância redobrada para as

espécies de clupeídeos, mais sensíveis à inanição (HOUDE, 1987,1989a). O estudo da influência desse factor justifica, assim, uma atenção particular em *S. pilchardus*, um pequeno pelágico, alvo tradicional de uma importante pescaria da costa Atlântica da Península Ibérica, com um considerável interesse económico. As capturas de sardinha em Portugal chegam a atingir 50% em peso do total de pescado desembarcado anualmente (PESTANA, 1989). O recrutamento anual dos mananciais de espécies como a sardinha está sujeito a uma elevada variabilidade, pelo que o conhecimento dos aspectos que influenciam a sobrevivência larvar, como o estado nutricional, poderá auxiliar a compreensão das causas de flutuações.

A presente dissertação teve por objectivo avaliar a aplicação de diferentes índices sobre o estado nutricional de larvas de peixe ao estudo das condições de sobrevivência larvar de *S. pilchardus*, no meio natural. Para tal, estabeleceram-se três objectivos principais. O primeiro consistiu na escolha da técnica mais adequada à determinação do estado nutricional. O segundo objectivo visou a validação *in situ* dos índices de condição em larvas de sardinha, de forma a poderem ser aplicados a indivíduos recolhidos no meio natural. O terceiro objectivo pretendeu averiguar, numa abordagem preliminar, alguns aspectos da variabilidade espacial e temporal do estado nutricional das larvas de sardinha na costa da Península Ibérica, bem como avaliar a existência de condições de inanição nos locais em estudo, e inferir especialmente sobre a importância relativa da predação e da falta de alimento na natureza para a espécie em questão.

Nesta perspectiva, na primeira parte do trabalho analisaram-se e compararam-se as técnicas de determinação dos principais compostos utilizados nos índices bioquímicos de condição nutricional, nomeadamente o conteúdo em RNA, em DNA e em proteínas de larvas de peixe, de forma a seleccionar a mais adequada (Capítulo II).

Seguidamente, descreveu-se uma experiência de validação, *in situ*, dos índices bioquímicos, para o que as larvas de sardinha foram mantidas em condições controladas, na ausência e na presença de alimento. Desta forma, determinou-se o

valor da razão RNA/DNA em larvas de sardinha, correspondentes a situações de inanição. Tal, foi imprescindível para a identificação das larvas em *stress* nutricional provenientes de recolhas no meio marinho (Capítulo III).

A terminar, aplicaram-se índices de condição, morfométricos e bioquímicos a um conjunto de larvas de sardinha, capturadas em duas zonas da costa Atlântica da Península Ibérica, Norte de Espanha e Sul de Portugal (Algarve). Desta forma pretendeu-se determinar o estado nutricional das larvas no meio natural e relacionar os resultados obtidos com factores ambientais, como a temperatura da água, a velocidade do vento, a turbulência, a disponibilidade de presas e a densidade de potenciais predadores (Capítulo IV).

CAPÍTULO II

TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E PROTEÍNAS EM LARVAS DE PEIXE

1 - Introdução

A utilização dos ácidos nucleicos e proteínas em índices bioquímicos sobre a condição nutricional das larvas de peixe levou a que as técnicas de determinação destas macromoléculas fossem alvo de uma atenção particular (BUCKLEY, 1979; CLEMMESSEN, 1990).

Um dos processos mais antigos usados para determinar a concentração de ácidos nucleicos nos tecidos é a técnica de SCHMIDT-THANNHAUSER (1945), desenvolvida por MUNRO & FLECK (1966) e adaptada para larvas de peixe por BUCKLEY (1979), que permite também a determinação das proteínas. Este procedimento apresenta a desvantagem de requerer um mínimo de 800 µg de peso seco por amostra, o que corresponde aproximadamente a uma larva de *Clupea harengus* com 28 dias de idade (CLEMMESSEN, 1990). Tal facto implica que não pode ser utilizado para medir as concentrações de ácidos nucleicos de forma individual em larvas de peixe, sobretudo nas fases mais iniciais, onde se atingem pesos secos da ordem das 25 µg. Nestes casos, a única estimativa possível de obter é o conteúdo em ácidos nucleicos de um conjunto de larvas, perdendo-se a informação sobre a variabilidade individual.

Para se ultrapassar esta limitação, bem como se alcançar a determinação individual da concentração de ácidos nucleicos em larvas de peixe, tem-se utilizado mais recentemente a técnica fluorimétrica (BERGERON *et al.*, 1991; HOVENKAMP & WITTE, 1991; CHÍCHARO, 1993; MATHERS *et al.*, 1993; 1994; CANINO & CALDARONE, 1995), que se baseia na utilização de corantes fluorescentes específicos para os ácidos nucleicos (LE PECQ & PAOLETTI, 1966; LE PECQ, 1972). Numa comparação recente, realizada por MCGURK & KUSSER (1992), entre as três técnicas fluorimétricas mais utilizadas (KARSTEN & WOLLENBERGER, 1972, 1977; BENTLE *et al.*, 1981; CLEMMESSEN, 1988, 1990) concluiu-se que a técnica de CLEMMESSEN (1988, 1990) era a mais apropriada. Tal facto resulta de, contrariamente às outras técnicas, existir um processo de purificação dos ácidos nucleicos, que elimina o problema da fluorescência de outros compostos, que não os ácidos nucleicos, e evita a inibição da RNase por outras substâncias.

Por outro lado, uma alteração na técnica espectrofotométrica realizada por HOULIHAN *et al.* (1993), baseada em ASHFORD & PAIN (1886), permitiu também a análise individual das larvas, mesmo nas fases mais iniciais do desenvolvimento. Para tal, recorre-se à leitura da absorvância com comprimento de onda duplo, o que permite corrigir o efeito da contaminação de proteínas hidrolisadas. Este método possibilita, tal como o inicial (MUNRO & FLECK, 1966), a determinação das proteínas totais num passo intermédio do procedimento de extracção e purificação dos ácidos nucleicos, o que não acontece na técnica fluorimétrica.

No presente capítulo descreveram-se as pesquisas iniciais deste estudo, tendo em vista a escolha das técnicas mais apropriadas, de entre as disponíveis, para a determinação dos ácidos nucleicos em larvas de peixe. O objectivo central, nesta fase, foi a comparação entre as duas técnicas principais de determinação de ácidos nucleicos em larvas de peixe de forma individual, a espectrofotométrica e a fluorimétrica, para se seleccionar a mais adequada. Existiram ainda objectivos secundários, nomeadamente a comparação entre diferentes tipos de homogeneizadores para larvas de peixe, a determinação do grau de purificação, a percentagem de recuperação, o limite de detecção e o coeficiente de variação dos ácidos nucleicos obtidos pela técnica escolhida. Pretendeu-se, também, através duma pequena modificação na técnica de CLEMMESSEN (1988, 1990), obter, paralelamente, à determinação de DNA e RNA em cada larva, o seu conteúdo em proteínas.

2- Material e Métodos

2.1- Técnica espectrofotométrica

Este é o procedimento mais tradicional de determinação dos ácidos nucleicos, introduzido por SCHMIDT-THANNHAUSER (1945) e desenvolvido por MUNRO & FLECK (1966). Recentemente foram sugeridas alterações por ASHFORD & PAIN (1986) e HOULIHAN *et al.* (1993) que visaram a redução do limite de detecção da técnica. As

etapas desta técnica espectrofotométrica, resumidas na Figura 2.1 descrevem-se como se segue:

- Homogeneização

A larva congelada foi colocada num tubo com 400 μ l de ácido perclórico (PCA) (0.2M) e homogeneizada com um homogeneizador Polytron modelo 10-25 equipado com uma sonda de 7.5 mm de diâmetro. O processo de homogeneização foi efectuado durante períodos de quinze segundos, repetidos três vezes com intervalos de quinze segundos entre eles, para permitir o arrefecimento da sonda. Em todos os casos, o tubo foi mantido em gelo durante o processo.

- Extracção e purificação de ácidos nucleicos

Depois da homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm durante dez minutos e o precipitado lavado duas vezes com 200 μ l de PCA (0.2 M). O último precipitado obtido foi ressuspensão em 450 μ l de água destilada ao que se adicionou 50 μ l de hidróxido de sódio (NaOH) (3 M). Esta mistura foi incubada durante uma hora a 37°C, após o que foi extraída uma alíquota de 110 μ l que foi congelada para posterior determinação das proteínas. O procedimento continuou com a adição de 0.0867 ml de PCA (20%) e posterior centrifugação da amostra durante 10 minutos. O sobrenadante resultante continha, então, a fracção de RNA. O precipitado foi lavado em 200 μ l de PCA (0.2 M), eliminou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 μ l de PCA (0.6 M) e incubou-se durante trinta minutos a 70 °C. Em seguida, as amostras foram arrefecidas em gelo e centrifugadas a 6000 rpm durante dez minutos. Terminado este procedimento o DNA ficou dissolvido no sobrenadante

- Determinação da absorvância

A densidade óptica das amostras foi lida directamente a 260 nm e a 232 nm, usando um espectrofotómetro de duplo raio (Perking Lambda 2UV/VIS) e o branco apropriado.

- Determinação da concentração

As concentrações de RNA e DNA das amostras foram determinadas através das seguintes equações, adaptadas de WILDER & STANLEY (1983), ASHFORD & PAIN (1986)

e BUCKELY & BULOW (1987), onde OD significa a absorvância no comprimento de onda indicado a seguir:

$$\text{RNA ou DNA } (\mu\text{g/ml}) = 10.53 * [(OD_{260} * 3.17) - (OD_{232} * 0.75)]$$

$$\text{RNA } (\mu\text{g/amostra ou larva}) = 0.48 * \text{RNA}(\mu\text{g/ml}) * 0.50 / 0.39$$

$$\text{DNA } (\mu\text{g/amostra ou larva}) = 0.50 * \text{DNA}(\mu\text{g/ml}) * 0.50 / 0.39$$

2.2 - Técnica fluorimétrica

A técnica que a seguir se descreve é adaptada de LE PECQ & PAOLETTI (1966) e baseada em CLEMMESSEN (1989,1990), tendo sido esta última autora que primeiro permitiu a determinação dos ácidos nucleicos nas larvas de peixe, de forma individual. Esta técnica dividiu-se nas seguintes etapas (Figura 2.2):

- Homogeneização

Colocou-se cada uma das larvas congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ num tubo contendo $400\ \mu\text{l}$ de solução tampão gelada de TRIS-HCL, tendo-se procedido à homogeneização da mesma forma que na técnica espectrofotométrica.

- Extracção e purificação dos ácidos nucleicos

Durante todo o processo as amostras foram mantidas em gelo picado. Adicionou-se ao homogeneizado anterior $20\ \mu\text{l}$ de sulfato de laurilo e sódio (SDS) a 20 % (concentração final 1.0%). A amostra foi agitada durante quinze minutos e depois centrifugada (6000 rpm) durante o mesmo período. O precipitado foi congelado para posterior análise proteica, o sobrenadante transferido para um novo tubo. Adicionou-se posteriormente $300\ \mu\text{l}$ de fenol saturado (80 %) e $300\ \mu\text{l}$ de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Depois de agitado durante dez minutos e centrifugado também por dez minutos, a fase aquosa contendo os ácidos nucleicos (parte superior) foi transferida para um novo tubo, eliminando-se a fase com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

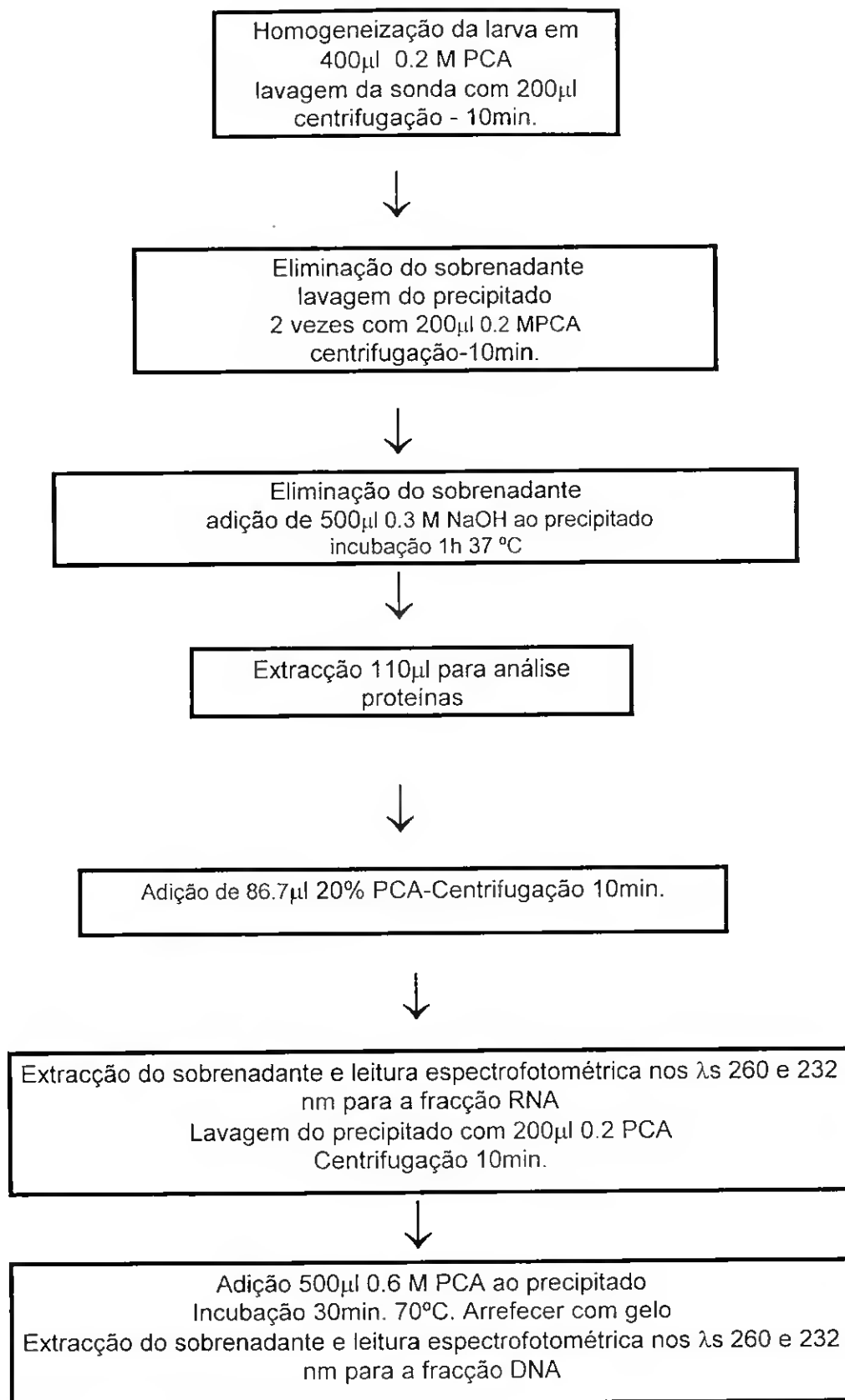


Figura 2.1 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação das concentrações em ácidos nucleicos pela técnica espectrofotométrica.

O passo em que se adicionou clorofórmio/álcool isoamílico foi de novo repetido, mas a agitação e centrifugação durou apenas cinco minutos, de forma a fazer desaparecer os vestígios de fenol.

- Determinação da fluorescência

A determinação da fluorescência dos ácidos nucleicos depende do uso de fluoróforos específicos que reagem com os ácidos nucleicos e produzem um aumento da intensidade da fluorescência. Neste trabalho, utilizou-se o fluoróforo brometo de etídio (EB) para determinar a fluorescência do DNA e do RNA da amostra. Este fluoróforo liga-se às bases citosina-guanina que existem tanto no DNA como no RNA. Um outro fluoróforo a bisbenzamida (H33258), selectivo apenas para o DNA uma vez que se liga apenas às bases adenina-timina, tem sido também utilizado em conjugação com o EB (CLEMMESEN, 1989). No entanto, a bisbenzamida não melhora o limite de detecção, particularmente se estão presentes proteínas mesmo que vestigiais, porque o comprimento de onda de excitação é próximo do comprimento de onda de absorção das proteínas (HOLL & WEBB, 1989), o que não acontece com o EB, pelo que se optou por este corante. Assim adicionou-se 50 µl de EB a uma alíquota da amostra, a qual se diluiu anteriormente até 600 µl com uma solução tampão TRIS-HCL e a fluorescência do DNA e do RNA foi determinada com um comprimento de onda de excitação de 366 nm e de emissão de 590 nm com um fluorímetro Perkin-Elmer Filter modelo LS-2.

Outra alíquota da amostra foi também diluída até 600 µl com solução tampão TRIS-NaCl e tratada com ribonuclease A (RNase), por forma a distinguir a fluorescência produzida pelo RNA da produzida pelo DNA. Incubou-se, então, a amostra a 37°C durante trinta minutos e arrefeceu-se à temperatura ambiente, tendo-se medido a fluorescência do DNA, após adição de 50 µl de EB. A fluorescência do RNA foi calculada pela diferença entre a fluorescência total (RNA e DNA) e a fluorescência apenas do DNA.

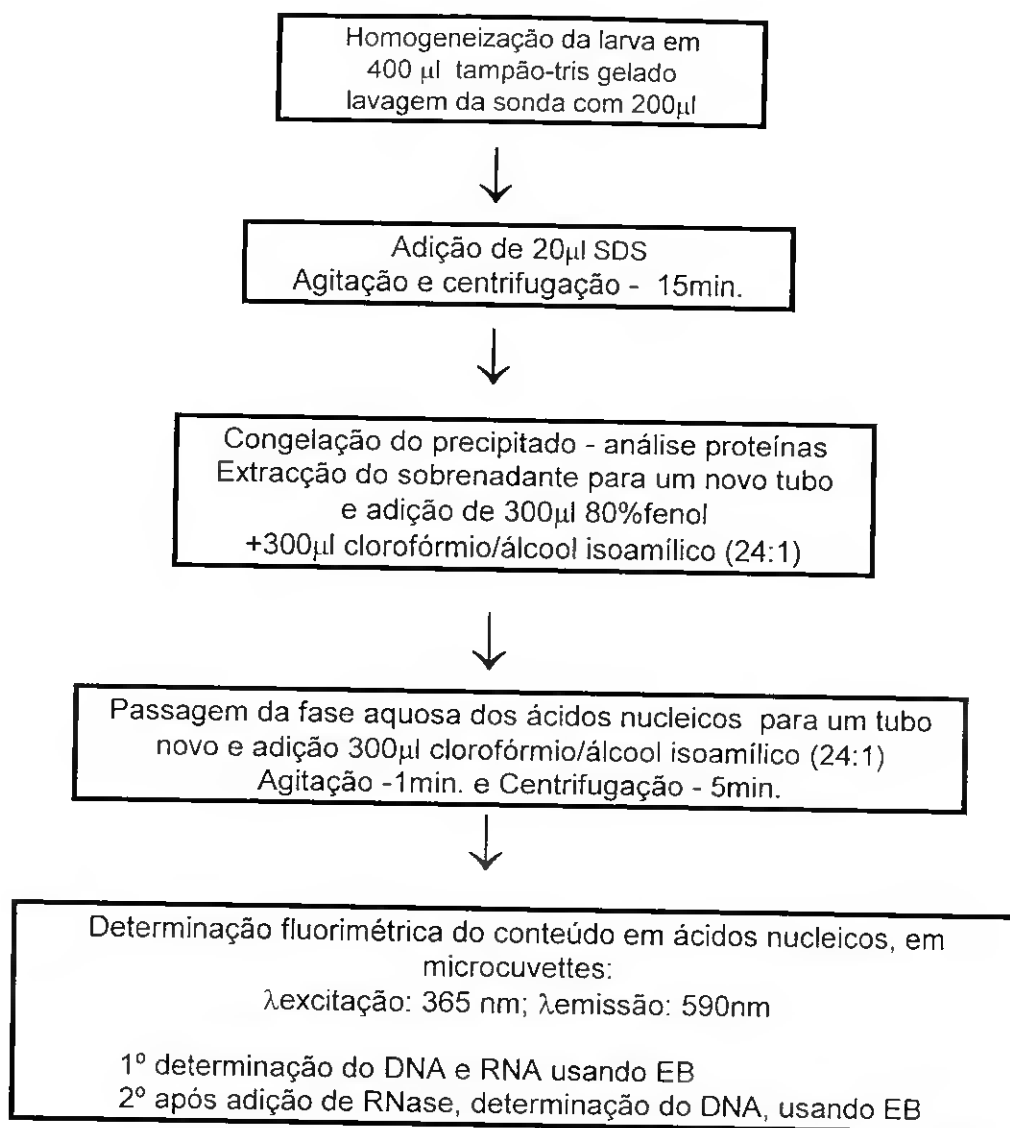


Figura 2.2 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação da concentração das larvas em ácidos nucleicos na técnica fluorimétrica.

- Determinação da concentração

As concentrações dos ácidos nucleicos foram determinadas utilizando rectas padrão, calculadas diariamente a partir, de DNA de vitelo e RNA de levedura, do tipo das apresentadas nas Figuras 2.3 e 2.4.

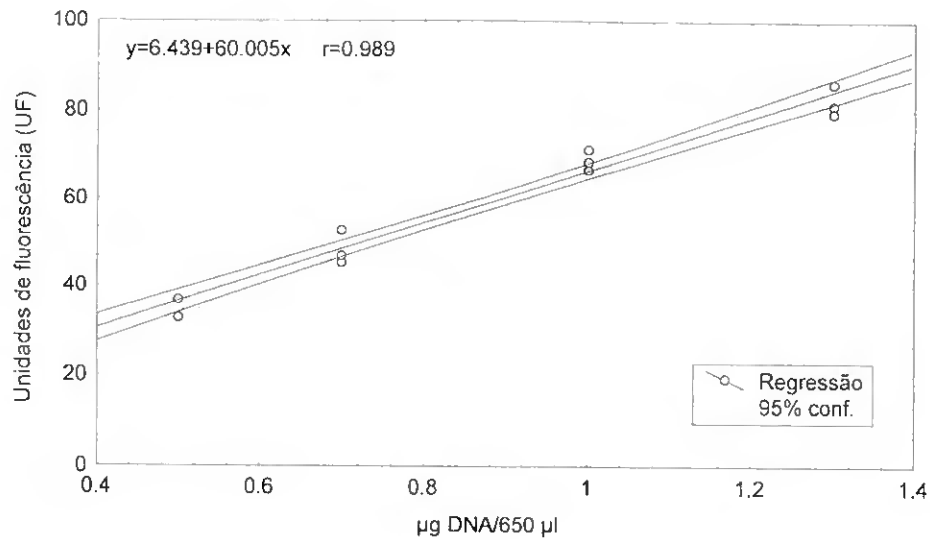


Figura 2.3 - Variação das unidades de fluorescência com diferentes concentrações de ácido desoxirribonucleico (dia: 22-5-92)

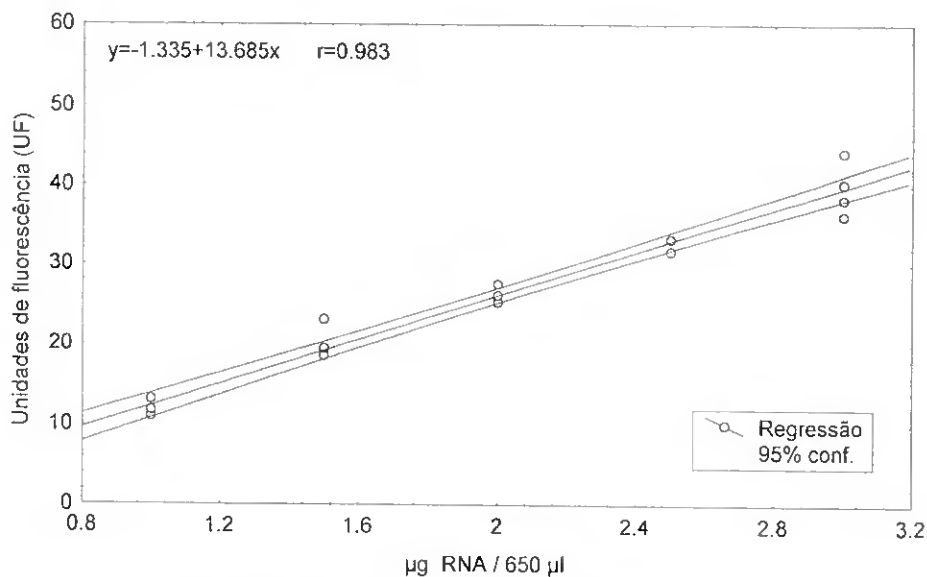


Figura 2.4 - Variação das unidades de fluorescência com diferentes concentrações de ácido ribonucleico (dia: 22-5-92).

2.3 - Comparação das técnicas

Para este efeito utilizaram-se estados larvares de *C. harengus*, congelados a -70°C , cuja idade oscilava entre os 7 e os 66 dias, cultivadas, umas na ausência de alimento e outras na presença de alimento. As larvas utilizadas neste trabalho provieram de uma

experiência realizada, anteriormente, no Departamento de Zoologia da Universidade de Aberdeen. As larvas processadas, por cada uma das duas técnicas de determinação de ácidos nucleicos, apresentavam a mesma idade e tinham estado sujeitas às mesmas condições de cultivo, no que se refere a alimentação, fotoperíodo e temperatura. Analisaram-se larvas com 7 dias, (que nunca foram alimentadas devido à existência de vitelo), larvas com 10, 28, 46 e 53 dias, alimentadas desde o fim das reservas vitelinas e larvas com 12 e 52 dias, privadas de alimento durante 5 e 6 dias, respectivamente, antes da colheita para conservação e posterior análise.

Ainda com o objectivo de comparar os resultados obtidos por cada uma das técnicas analisou-se uma larva de dimensões elevadas, com 65/66 dias. Realizou-se um corte longitudinal fraccionando a larva em duas porções e cada uma delas foi homogeneizada separadamente. Cada solução foi dividida em seis alíquotas para processamento através das duas técnicas referidas.

2.4- Técnicas de homogeneização

De entre as várias técnicas de homogeneização de larvas de peixe existentes salientam-se as que se baseiam na utilização do macerador vibro-oscilante ("shaking-mill") (CLEMMESSEN, 1990), do homogeneizador mecânico (CANINO & CALDARONE, 1995; BERGERON *et al.*, 1991) e do desintegrador ultrasónico (ROBINSON & WARE, 1988). Para se efectuar a escolha da mais adequada, optou-se por compará-las. Desta forma, homogeneizaram-se cinco larvas da mesma idade (18 dias) e sujeitas ao mesmo regime alimentar, através de cada uma das técnicas descritas.

Relativamente ao macerador vibro-oscilante utilizou-se o modelo GLEN-CRESTON, com dois suportes para cinco tubos cada, permitindo o tratamento de dez larvas em simultâneo, o que é realizado em quinze minutos. Antes de se colocarem os tubos neste homogeneizador foram adicionados a cada um deles, até cerca de um terço da sua altura, esferas de vidro de 0.2 mm de diâmetro que promovem a ruptura dos tecidos quando o aparelho entra em funcionamento.



Os procedimentos realizados com o homogeneizador mecânico POLYTRON 10-35 e com o sonicator COLE PARMER série 4710 foram semelhantes e resumiram-se a três períodos de quinze segundos, com intervalos da mesma duração entre eles, para permitir o arrefecimento da sonda. Para além disto, o tubo foi mantido em gelo durante o processo.

2.5- Grau de purificação dos ácidos nucleicos

Para se determinar o grau de purificação dos ácidos nucleicos extraídos pelo procedimento escolhido e para determinar se o RNA era completamente digerido pela RNase, recorreu-se à electroforese em gel de agarose e utilizou-se uma metodologia baseada em MANIATIS *et al.* (1982).

Inicialmente, homogeneizaram-se dez larvas e separaram-se dez alíquotas que foram sujeitas ao procedimento de extracção e purificação descrito para técnica fluorimétrica. A três das alíquotas foi adicionada RNase e procedeu-se à incubação, durante trinta minutos a 37 °C.

Para a realização da electroforese esterilizada em DEPC (Pirocarbonato dietil) preparou-se o gel, dissolvendo 1g de agarose em 70 ml de água, levando-o à ebulição e arrefecendo-o posteriormente até 60 °C. Em seguida, adicionou-se 22 ml da solução tampão (ácido propanesulfónico- MOPS, 0.1 M - pH 7.0; acetato de sódio-40 mM e EDTA-5 mM -pH-8.0) e 20 ml de formaldeído (12.3 M). O gel foi colocado no molde numa *hotte* e deixado a repousar durante, pelo menos, trinta minutos à temperatura ambiente.

A uma alíquota da solução de ácidos nucleicos purificados adicionou-se 0.1 volume de acetato de sódio (pH-5.2), agitou-se e juntou-se depois 2.5 volumes de etanol a baixa temperatura. Esta solução foi armazenada a -70°C e posteriormente, centrifugada a 13000 rpm durante cinco minutos por forma a precipitar os ácidos nucleicos. O sobrenadante foi então eliminado e deixou-se o precipitado secar à temperatura ambiente durante quinze minutos. Ao precipitado adicionou-se 2.0 µl da solução

tampão inicial, 3.5 µl de formaldeído (12.3 M) e 10.0 µl de formamida. Procedeu-se depois a uma centrifugação rápida de forma a acumular os reagentes no fundo do tubo. Em seguida, as amostras foram incubadas durante quinze minutos a 65 °C e posteriormente arrefecidas em gelo. Adicionou-se então 2.0 µl de solução tampão DECP esterilizada (50% glicerol; EDTA, 1mM - pH-8.0; bromofenol-0.25% e cianol de xileno FF-0.25%) e centrifugaram-se as amostras durante um minuto.

De cada uma das amostras retirou-se 20 µl que foram colocados nos poços do gel de agarose. Correu-se o gel na solução tampão inicial a 4 V/cm. Após o bromofenol ter migrado aproximadamente 8 cm, o que levou em média quatro horas, aplicou-se o corante fluorescente brometo de etídio (0.5 µl/ml em acetato de amónia-0.1 M) e esperou-se quarenta e cinco minutos. Por vezes, quando a coloração era muito intensa, foi necessário efectuar uma descoloração durante trinta minutos em acetato de amónia. O gel foi fotografado com luz ultravioleta.

2.6 - Percentagem de recuperação de ácidos nucleicos

Para se avaliarem as perdas de ácidos nucleicos que ocorrem durante o procedimento de extracção e purificação, uma quantidade conhecida de RNA e DNA "padrão" foi adicionada a um homogeneizado de larvas antes do procedimento de extracção. Com base nas leituras de fluorescência do padrão, das amostras com adição de padrão e das amostras sem padrão, foi possível determinar a quantidade de DNA e RNA que se perde durante o procedimento de purificação. Posteriormente, calculou-se a percentagem de recuperação dos dois tipos de ácidos nucleicos.

2.7 - Determinação de proteínas insolúveis

A determinação das proteínas insolúveis seguiu o procedimento baseado em LOWRY *et al.* (1951) e adaptado por HASHIMOTO *et al.* (1979) (Figura 2.5).

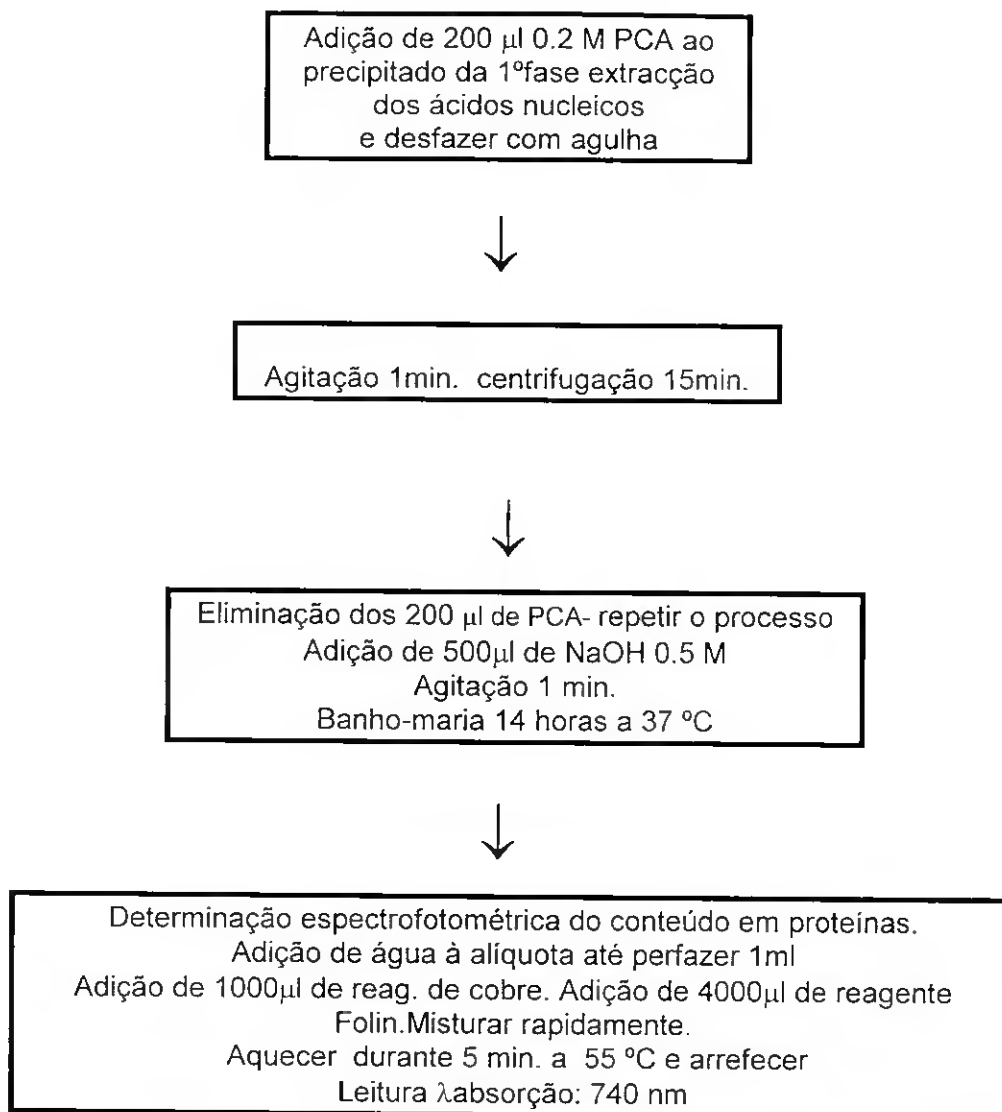


Figura 2.5 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação da concentração das larvas em proteínas insolúveis.

Na primeira fase procedeu-se à purificação do precipitado obtido num passo intermédio da determinação dos ácidos nucleicos pela técnica fluorimétrica. Depois de se descongelar o precipitado referido foi adicionado 200 µl de PCA (0.2 M). Após centrifugação a 6000 rpm durante dez minutos, a porção sedimentada foi lavada duas vezes e o precipitado final ressuspenso em 500 µl de NaOH (0.5 M) e incubado por catorze horas a 37°C. Diluiu-se 50 µl de amostra em água destilada até 1 ml. Adicionou-se, em seguida, 1 ml de reagente alcalino de Cobre, agitou-se e deixou-se a amostra repousar durante dez minutos, sem contacto directo com a luz solar. Seguidamente, acrescentou-se 4 ml de reagente de Folin-Ciocalteu, misturou-se

rapidamente, e incubou-se durante cinco minutos a 55°C. As amostras arrefeceram em banho-maria, até que se atingisse a temperatura ambiente e leu-se a absorvância no comprimento de onda de 740 nm, através de um espectrofotómetro Perking Lambda 2UV/VIS. As concentrações das proteínas nas larvas foram determinadas através de rectas padrão, construídas diariamente com albumina pura de bovino (Figura 2.6).

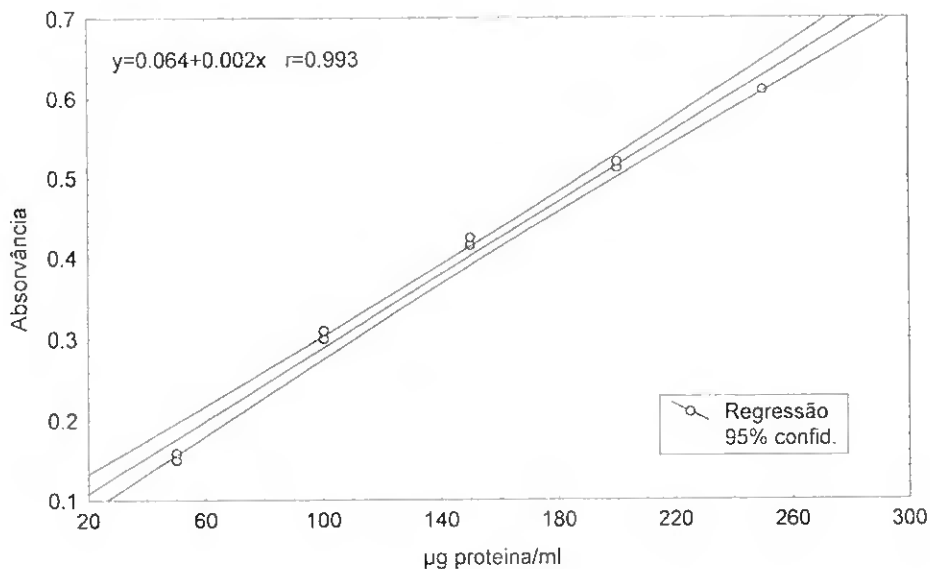


Figura 2.6 - Variação da absorvância com diferentes concentrações de proteína (dia: 6-6-92).

2.8 - Reagentes

Os produtos químicos utilizados foram, de um modo geral, de um grau de pureza analítico elevado ("pró-análise"). O brometo de etídio, o RNA de levedura e a ribonuclease A foram obtidos pela SERVA, o DNA de vitelo, a albumina de bovino, o reagente Folin & Ciocalteu's foram providenciados pela SIGMA, sendo os restantes produtos químicos utilizados originários da MERCK.

2.9 - Tratamento dos dados

O limite de detecção da técnica fluorimétrica foi determinado segundo MILLER & MILLER (1988) que o define como a concentração que produz uma leitura (Y) (neste caso fluorescência relativa) igual à leitura do branco (Y_b) mais dois desvios padrões (s_b) do branco:

$$Y = Y_b + 2 s_b$$

A sensibilidade de uma determinada técnica é considerada um termo menos adequado do que limite de detecção, porque tem uma utilização mais ampla. De facto, quando se refere que um método é mais sensível que outro é porque tem um limite de detecção mais baixo (MILLER & MILLER, 1988).

A comparação entre as técnicas estudadas foi efectuada através do teste t de student (SOKAL & ROLHF, 1981), sendo p a probabilidade de se verificar a hipótese nula (H_0), cuja rejeição foi efectuada sempre que $p < 0.05$. A H_0 testada pressupõe a inexistência de diferenças significativas entre as quantidades de ácidos nucleicos detectadas pelas várias técnicas testadas. Recorreu-se, também para este fim, ao coeficiente de variação, que se define como o desvio padrão da amostra expresso em percentagem da média, pelo que é uma medida de dispersão independente das unidades em que se utiliza.

3- Resultados

3.1- Comparação entre as técnicas usadas: espectrofotométrica e fluorimétrica

A aplicação das duas técnicas a larvas de peixe, dentro do mesmo grupo de idade e tipo de alimentação, mostrou que apenas existem diferenças significativas na relação RNA/DNA, nas fases larvares mais iniciais (com sete e dez dias) (Tabela II.1).

Os resultados provenientes da determinação dos ácidos nucleicos em metades de uma mesma larva mostraram a inexistência de diferenças significativas a nível da concentração quer de RNA quer de DNA, e da relação RNA/DNA (Tabela II.2).

Tabela II.1 - Comparação de duas técnicas para determinação de ácidos nucleicos em larvas de peixe.

(\bar{x} - média, s - desvio padrão, n - nº de amostras, t. student - teste t de student, * - $p < 0.05$ e = - $p > 0.05$)

A) MESMO GRUPO DE LARVAS- RNA/DNA

CLEMMESEN (1988,1990) vs SCHMIDT-THANNHAUSER (1945)								
idade	regime	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s	n	t.student
7 dias	vitelo	2.76	0.28	6	5.84	0.42	8	*
10 dias	alimento	2.07	0.40	5	6.53	0.77	5	*
12 dias	inanição	1.12	0.14	5	3.85	0.21	5	*
28 dias	alimento	5.39	0.74	6	5.75	0.54	7	=
46 dias	alimento	4.79	0.74	6	4.27	0.54	9	=
52 dias	inanição	1.87	0.53	4	3.85	0.61	8	=
53 dias	alimento	4.80	0.78	6	5.57	0.54	8	=

B) MESMA LARVA (65/66 dias - ALIMENTADA)

CLEMMESEN (1988,1990) vs SCHMIDT-THANNHAUSER (1945)							
	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s	n	t.student
$\mu\text{g RNA}$	38.31	10.23	6	43.38	8.23	6	=
μgRNAmg	2.98	0.55	6	3.36	0.39	6	=
$\mu\text{g DNA}$	7.81	1.45	6	11.2	1.28	6	=
μgDNAmg	0.65	0.07	6	0.90	0.08	6	=
RNA/DNA	4.62	0.62	6	4.01	0.71	6	=

3.2- Comparação das principais técnicas de homogeneização

Não existiram diferenças significativas, a nível da concentração de ácidos nucleicos detectados, entre os homogeneizadores comparados, como se pode observar na Tabela II.2. No entanto, os resultados obtidos pelo desintegrador ultrasónico apresentaram, na maioria dos casos, um coeficiente de variação menor, para além de ser mais fácil a sua limpeza entre utilizações.

3.3- Purificação dos ácidos nucleicos extraídos

Os resultados da electroforese revelaram nas alíquotas em que não foi aplicado RNase, DNA pouco degradado e RNA com uma percentagem de degradação um pouco mais acentuada. Nas alíquotas em que se adicionou a enzima verificou-se a ausência de banda de RNA (Figura 2.7).

Tabela II.2 - Comparação dos procedimentos de homogeneização para posterior determinação do conteúdo em ácidos nucleicos das larvas com 18 dias alimentadas. (n=5; \bar{x} - média; s-desvio padrão; vx-coeficiente de variação (%); *- teste de student significativo (p<0.05))

	Homog. mecânico			Macerador vibro-oscil.			Des. Ultrasónico		
	\bar{x}	s	vx	\bar{x}	s	vx	\bar{x}	s	vx
$\mu\text{gRNA/l}$	10.9	1.68	15.41	13.24	4.32	32.63	12.45	2.0	12
$\mu\text{gRNA/mg}$	6.58	1.32	20.06	5.26	1.43	27.19	6.65	1.41	23
$\mu\text{gDNA/l}$	1.34	0.15	11.19	2.01	0.22	10.95	1.89	0.13	12
$\mu\text{gDNA/mg}$	0.79	0.1	12.66	0.83	0.19	22.89	0.81	0.21	15
RNA/DNA	8.21	1.22	14.86	6.54	2.05	31.35	6.56	1.42	19

3.4- Limite de detecção, coeficiente de variação e percentagem de recuperação de ácidos nucleicos

O limite de detecção da técnica fluorimétrica utilizada teve um valor médio de 0.075 μg DNA/ml e 0.412 μg RNA/ml. O coeficiente de variação assumiu o valor de 3.7% para a

concentração de DNA, de 14.7% para o RNA e de 14.3% para a relação RNA/DNA. O DNA apresentou uma percentagem de recuperação média de 92.1% ($\pm 4.6\%$), enquanto que o RNA mostrou um valor ligeiramente superior, 95.3% ($\pm 3.4\%$). As percentagens de recuperação de ácidos nucleicos foram normalmente boas, superiores a 90 %, tendo sido, posteriormente, aplicado um factor de conversão para os 100 %.

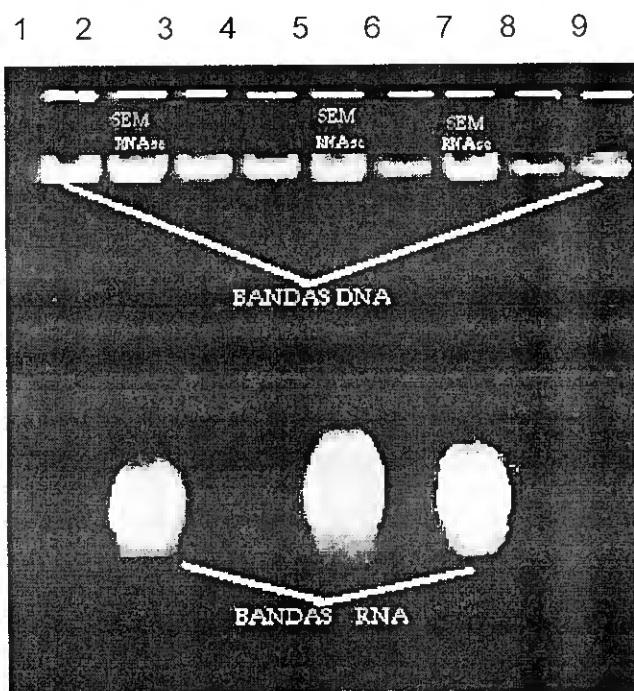


Figura 2.7 - Electroforese em gel de agarose de amostras de DNA e RNA purificado de larvas de arenque. Nos poços 2, 5 e 7 não se usou a RNase, tendo-se aplicado essa enzima nos restantes.

4- Discussão

A comparação das técnicas de determinação de ácidos nucleicos foi limitada pelo facto de serem necessárias soluções de homogeneização diferentes, o que impossibilitou a utilização de alíquotas do mesmo homogeneizado. Assim, apenas puderam ser usadas amostras paralelas, ou seja, larvas com a mesma idade e sujeitas ao mesmo regime

alimentar, supostamente no mesmo estado nutricional. Porém, verificou-se a existência de variação entre larvas da mesma idade e sujeitas às mesmas condições de cultivo. Esta situação pode explicar as diferenças encontradas nos resultados obtidos por cada uma das técnicas, as quais desapareceram quando para as duas técnicas se utilizaram fracções de uma mesma larva.

Dado não existirem diferenças significativas nos resultados obtidos por cada um dos métodos analisados, considerou-se a técnica fluorimétrica mais apropriada para o processamento das larvas de peixe. Com efeito, esta técnica têm sido a mais utilizada pelos investigadores que se dedicam ao estudo da condição nutricional (CLEMMESSEN, 1988, 1989, 1990, 1993, 1994; ROBINSON & WARE, 1988; HOVENKAMP, 1990; BERGERON *et al.*, 1991; MCGURK *et al.*, 1992; STEINHART & ECKMANN, 1992; MATHERS *et al.*, 1994; BAILEY *et al.*, 1995 e CANINO & CALDARONE, 1995) e, apesar de não existir ainda um método padrão internacionalmente aceite, a sua utilização sistemática facilita a comparação de resultados.

Convém também referir o aparente inconveniente da técnica fluorimétrica em não permitir o acesso ao conteúdo em proteínas na mesma larva onde se determinam os ácidos nucleicos, que foi ultrapassado quando se efectuaram algumas alterações ao procedimento de extracção e purificação descrito por CLEMMESSEN (1988, 1990). Estas modificações resumiram-se à eliminação dos produtos que reagiriam com as proteínas antes da sua extracção. Assim, eliminou-se a proteinase K da solução tampão de Tris, e procedeu-se à redução da concentração do sulfato de sódio e laurilo de 2% para 1%. De facto, este detergente biológico aniónico parece interferir nas leituras de fluorescência dos ácidos nucleicos (CLARKE *et al.*, 1989; DEBEVOISE & TAGHON, 1988) e na determinação de proteínas segundo a técnica de LOWRY (PETERSON, 1977) se for em concentrações superiores a 1%. Por outro lado, extraiu-se por centrifugação o precipitado de proteínas antes da adição do fenol, uma vez que este, mesmo em quantidades vestigiais, interfere também na determinação de proteínas pela técnica indicada. Segundo BENSADOUN & WEINSTEIN (1976), esta substância reduz a acção do reagente de Folin-Ciocalteu necessário à leitura da absorvância das proteínas. De qualquer forma, através deste procedimento, apenas se obtém uma fracção das

proteínas totais, que se classificam como pouco solúveis ou insolúveis, uma vez que a porção mais solúvel fica em solução aquosa juntamente com os ácidos nucleicos. A porção insolúvel contém proteínas miofibrilares (extraíveis apenas com uma solução tampão de força iónica elevada) como por exemplo o fibrinogénio, miosina e actina e, para além destas, as escleroproteínas ou estroma (não extraíveis), nomeadamente o colagénio e a queratina (HASHIMOTO *et al.*, 1979).

A determinação das proteínas insolúveis só foi conseguida com a utilização de procedimentos de purificação das amostras antes da análise dos ácidos nucleicos. Estes são contestados por alguns autores (CALDARONE & BUCKLEY, 1991; CANINO & CALDARONE, 1995) uma vez que podem conduzir à perda quer de DNA quer de RNA. No entanto, as percentagens de recuperação de ácidos nucleicos foram normalmente, superiores a 90 %. O DNA apresentou uma média de 92.1%, enquanto que o RNA mostrou um valor ligeiramente superior, 95.3% e estes valores assemelham-se mesmo aos apresentados por autores que não purificaram os homogeneizados, e que, supostamente deveriam obter percentagens superiores. Assim, CANINO & CALDARONE (1995) indicam valores de 99.5% para o DNA e de 94.8% para o RNA, DEBEVOISE & TAGHON (1988) referem percentagens de 65% para o DNA e de 78% para o RNA. Valores superiores são referidos por CLEMMESSEN (1990), apesar de também proceder à purificação, nomeadamente 98% para o DNA e 102% para o RNA. No entanto, estes valores de percentagem de recuperação só indicam que o protocolo analítico subsequente à extracção inicial dos ácidos nucleicos não implicou perdas significativas, mas não informa sobre a eficiência da extracção dos ácidos nucleicos durante a homogeneização. No geral, constatou-se que a percentagem de recuperação do RNA foi sempre ligeiramente superior à do DNA.

De facto, é possível que o DNA não seja totalmente extraído durante a homogeneização uma vez que, contrariamente ao RNA, para além da membrana celular tem ainda de se “libertar” da membrana nuclear. A percentagem de recuperação dos ácidos nucleicos melhora normalmente com a incorporação de sulfato de laurilo e sódio. Este deve ser, no entanto, aplicado em concentrações baixas (PETERSON, 1977; DEBEVOISE & TAGHON, 1988; CLARKE *et al.*, 1989) para não interferir,

como se referiu, na leitura da absorvância e fluorescência das amostras. Segundo estes autores, o composto em causa, como contribui para a solubilização das proteínas e componentes da membrana celular, tem a dupla vantagem de provocar a lise das membranas, além de desnaturar enzimas como as ribonucleases, que provocam rapidamente a degradação do RNA. Assim, o procedimento de homogeneização é de grande importância na qualidade posterior dos resultados obtidos, sendo a comparação das principais técnicas de homogeneização disponíveis de especial interesse.

A utilização do macerador vibro-oscilante, no processo de homogeneização individual das larvas, foi proposta por CLEMMESSEN (1990) de forma a reduzir o tempo desta tarefa. De facto, um número normalmente elevado de larvas são processados nestes estudos, pelo que a economia de tempo é um factor a considerar. Uma outra vantagem deste homogeneizador é promover uma melhor ruptura das células e da membrana nuclear (CLEMMESSEN, 1990). No entanto, quando se compara esse procedimento de homogeneização com um homogeneizador mecânico (tipo polytron ou ultra-turrax) e com um desintegrador ultrasónico, e apesar de não existirem diferenças significativas entre eles a nível da quantidade de ácidos nucleicos detectada, o macerador vibro-oscilante tem a desvantagem de, não obstante ser muito mais dispendioso, apresentar um coeficiente de variação maior. Para além disso, com este procedimento não se podem manter as larvas em gelo durante a homogeneização, o que pode causar degradação dos ácidos nucleicos, a não ser que se disponha de um sofisticado dispositivo de refrigeração por azoto líquido, o que não foi utilizado neste trabalho, nem por CLEMMESSEN (1990). Tal problema não se colocou com a utilização quer do homogeneizador mecânico quer do desintegrador ultrasónico. Relativamente ao tempo consumido durante a homogeneização, os quinze minutos necessários para homogeneizar simultaneamente dez larvas pelo macerador vibro-oscilante foi semelhante ao que as outras técnicas necessitam, ou seja aproximadamente minuto e meio por larva.

Um problema, ainda associado à homogeneização, reside na necessidade de utilização da larva na totalidade. Este é o procedimento que normalmente se pratica

como forma de evitar o consumo elevado de tempo que acarreta a separação do tubo digestivo do resto do corpo da larva. No entanto, tal pode conduzir a um aumento da quantidade de ácidos nucleicos detectada, uma vez que se estão a quantificar também os ácidos nucleicos presentes nas presas que a larva, eventualmente, ingeriu e que se encontram ainda por digerir no seu tubo digestivo (UEBERSCHAR & CLEMMESSEN, 1992). Uma solução para ultrapassar este problema poderia consistir na manutenção dos indivíduos, após a recolha, durante um determinado período de tempo, sem alimento. Contudo, em termos práticos tal é muito difícil de conseguir. De facto, as larvas de peixe perecem poucos minutos após a recolha e para além dos aspectos técnicos de cultivo, muito difíceis de ultrapassar, manter as larvas sem alimento pode provocar alterações no metabolismo do animal, que influenciarão a determinação posterior da condição (DAGG & LITTLEPAGE, 1972). No entanto, CLEMMESSEN (comunicação pessoal, 1990) analisou a influência das presas no tubo digestivo das larvas na quantidade de ácidos nucleicos detectada, efectuando várias determinações em larvas com o tubo digestivo cheio e em larvas com o tubo digestivo vazio. Os resultados dessa autora mostraram que a influência das presas no interior da larva, na quantidade total de ácidos nucleicos determinada, era mínima e podia ser desprezada, provavelmente devido à rápida acção das nucleases após a morte das presas. Desta forma, a homogeneização das larvas na sua totalidade deverá ser considerada sem problemas.

Actualmente, em estudos de ecologia a análise individual do conteúdo químico das larvas assume um relevo especial, dado a variabilidade de situações que podem ocorrer na natureza (CLEMMESSEN, 1994). No que se refere às proteínas insolúveis, apesar de se ter utilizado apenas uma larva para cada determinação, tal não acarretou quaisquer dificuldades, uma vez que o limite de detecção das proteínas varia entre 5 e 25 µg/ml (LOWRY *et al.*, 1951) e a quantidade deste tipo de macromoléculas existentes em cada larva foi superior. No entanto, no caso dos ácidos nucleicos poderão colocar-se alguns problemas. O limite da técnica espectrofotométrica utilizada por BUCKLEY (1979) apresenta, segundo este autor, um limite de detecção de aproximadamente 2 µg DNA ou RNA/ml, o que corresponde aproximadamente à quantidade de DNA existente numa larva de *S. pilchardus* ou *C. harengus* com 8 mm, não se conseguindo determinar de forma individual em larvas de comprimentos inferiores, pelo o que se

torna necessário recorrer à homogeneização conjunta de larvas. Com a técnica fluorimétrica, os limites de detecção são normalmente muito inferiores, permitindo a análise de larvas recém-eclodidas (4-5 mm). De facto, os resultados relativos ao limite de detecção apresentados por CLEMMESSEN (1988) indicam valores de 0.1 μg DNA ou RNA/ml. Assim, estes valores não se afastam dos obtidos no presente trabalho, 0.075 μg DNA/ml e 0.412 μg RNA/ml. De qualquer forma, situaram-se bastante abaixo dos valores de ácidos nucleicos registados nas menores larvas de sardinha estudadas.

Para finalizar os resultados da electroforese mostraram que o procedimento de purificação origina DNA de alto peso molecular e RNA de baixo peso molecular com uma pequena percentagem de degradação. Tal facto explica-se, segundo CLEMMESSEN (1990), porque o RNA apresenta menos material "protector" que o DNA e é mais susceptível de ser degradado durante o referido processo. Por outro lado, a degradação do RNA pela RNase parece ser bastante efectiva, uma vez que se verificou ausência de banda de RNA sempre que a enzima foi aplicada.

5 - Conclusões

Atendendo às principais técnicas utilizadas na determinação dos ácidos nucleicos em larvas de peixe, a espectrofotométrica e a fluorimétrica, considerou-se a última mais adequada para o processamento das larvas de peixe. De facto, e apesar de não existirem diferenças significativas nas quantidades de ácidos nucleicos detectadas, a técnica fluorimétrica tem sido a mais utilizada, e como não existe ainda um procedimento padrão internacionalmente aceite, facilita a comparação de resultados.

A alteração realizada na técnica fluorimétrica de determinação dos ácidos nucleicos permitiu a análise na mesma larva também das proteínas insolúveis. Esta possibilidade de determinação das proteínas insolúveis só foi conseguida com a modificação dos procedimentos e purificação dos ácidos nucleicos. Tal não provocou decréscimos nas percentagens de recuperação de ácidos nucleicos, que foram normalmente boas.

A comparação dos procedimentos de homogeneização demonstrou que não existiram diferenças significativas entre os homogeneizadores analisados, ou seja, um macerador vibro-oscilante, um homogeneizador mecânico (tipo polytron ou ultra-turrax) e um desintegrador ultrasónico. No entanto, a quantidade de ácidos nucleicos detectada neste último apresentou um menor coeficiente de variação, para além do apresenta uma maior facilidade de limpeza

O limite de detecção da técnica escolhida, ou seja, a fluorimétrica, foi bastante reduzido, permitindo a determinação da quantidade de ácidos nucleicos, de forma individual, mesmo nas larvas mais pequenas.

Verificou-se, também que, de uma forma geral, pequenas alterações no procedimento de extracção e purificação poderão originar diferenças a nível das quantidades totais de RNA e DNA detectadas, e na razão RNA/DNA. Tal facto torna difícil a comparação directa entre dados de distintos autores, sendo imprescindíveis a uniformização dos procedimentos analíticos e a sua intercalibração.

CAPÍTULO III

VALIDAÇÃO DOS ÍNDICES BIOQUÍMICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DO ESTADO NUTRICIONAL DE LARVAS DE *SARDINA PILCHARDUS*

1- Introdução

Actualmente dedica-se uma atenção considerável à composição química das larvas de peixe, sobretudo a nível dos ácidos nucleicos para a sua utilização em índices sobre a condição larvar (BUCKLEY & BULOW, 1987; HOVENKAMP, 1990; CANINO *et al.*, 1991; CALDARONE & BUCKLEY, 1991; HOVENKAMP & WITTE, 1991; RICHARD *et al.*, 1991; MCGURK *et al.*, 1992; STEINHART & ECKMANN, 1992; CLEMMESSEN, 1993, 1994; CANINO, 1994; MATHERS *et al.*, 1994; BAILEY *et al.*, 1995; CANINO & CALDARONE, 1995).

Por exemplo, a razão RNA/DNA é um índice bioquímico muito utilizado para analisar o crescimento e a condição nutricional das larvas de peixe e que tem proporcionado resultados consistentes entre espécies (BUCKLEY & LOUGH, 1987; ROBINSON & WARE, 1988; CHÍCHARO, 1993; CLEMMESSEN, 1994; BAILEY *et al.*, 1995, CANINO & CALDARONE, 1995; FOLKVORD & MOKSNESS, 1995). Exemplos de outros índices que têm sido propostos são a relação RNA/Proteína, expressa em μg de RNA por mg de proteína (HOULIHAN *et al.*, 1990, 1993) e a quantidade de DNA de uma larva, expressa em μg de DNA por mg de peso seco (BERGERON *et al.*, 1991).

De qualquer forma, o cultivo de larvas de peixe em condições controladas é fundamental para analisar a resposta dos índices bioquímicos aos diferentes níveis alimentares. Só desta forma é possível a interpretação do estado nutricional em indivíduos capturadas no meio marinho (BUCKLEY & LOUGH, 1987; ROBINSON & WARE, 1988; HOVENKAMP, 1990; CANINO *et al.*, 1991; CLEMMESSEN, 1994).

Os estudos de calibração, relativos à condição nutricional, têm sido realizados em laboratório para as mais diferentes espécies, nomeadamente *Clupea harengus* (BUCKLEY, 1984; CLEMMESSEN, 1987b; ROBINSON & WARE, 1988; CHÍCHARO, 1993), *Pseudopleuronectes americanus* (BUCKLEY, 1980, 1982), *Gadus morhua* (BUCKLEY,

1979), *Morone saxatilis* (MARTIN & WRIGHT, 1987), *Scophthalmus maximus* (CLEMMESSEN, 1987b) e *Hippoglossus hippoglossus* (PITTMAN, 1991). No entanto, é geralmente aceite que a comparação de larvas cultivadas em laboratório com indivíduos capturados na natureza acarreta muitas limitações.

De facto, existem diferenças consideráveis entre a morfologia das larvas “selvagens” e a de larvas cultivadas (BALBONTIN *et al.*, 1973). A comparação entre estes dois tipos de larvas permite verificar que as cultivadas são normalmente mais pequenas e pesadas que as do meio natural, para a mesma espécie e no mesmo estado de desenvolvimento (BLAXTER, 1975). Estas diferenças parecem ser o resultado da acção conjunta da redução da actividade, devido à limitação de espaço num tanque de cultivo e da dieta, dado a utilização de itens alimentares diferentes dos existentes no mar (THEILACKER, 1980 a,b). Também CANINO *et al.* (1991) fazem notar que as concentrações de presas normalmente existentes nas culturas de laboratório excedem as densidades do meio marinho em, pelo menos, uma ordem de grandeza, dificultando ainda mais a fiabilidade das comparações entre ambos.

Como é evidente, estas diferenças também se devem reflectir a nível da composição química dos indivíduos, quando se comparam larvas cultivadas em laboratório e larvas recolhidas na natureza. De facto, MATHERS *et al.* (1994) verificaram que em larvas de *C. harengus* a concentração de DNA foi superior nos indivíduos do meio natural relativamente aos mantidos em condições laboratoriais, para a mesma gama de dimensões. Tal reflectiu-se nas relações RNA/DNA que foram significativas superiores nas larvas cultivadas em laboratório. Inversamente, ROBINSON & WARE (1988) verificaram que a razão RNA/DNA encontrada no meio marinho, também para a espécie *C. harengus*, era superior à registrada em larvas alimentadas em laboratório. Estes autores concluíram que tal podia ser explicado devido a diferenças entre populações e também porque é notoriamente difícil manter larvas de peixes, de certas espécies de clupeídeos, em cativeiro.

A grande maioria das experiências em laboratório nesta área não incorpora variáveis hidrodinâmicas muito relevantes na taxa de encontro entre as larvas e as suas presas, como é o caso da turbulência típica do meio marinho (MACKENZIE & LEGGETT, 1991). De facto, em laboratório é muito difícil simular a turbulência natural, pelo que frequentemente opta-se pela sua exclusão. No entanto, trata-se de um factor que contribui de forma reconhecida para o sucesso da alimentação de larvas de peixe (HUNTER, 1972, 1981; SUNDBY & FOSSUM, 1990), não considerar a turbulência de pequena escala pode originar uma subestimação de várias ordens de grandeza na frequência de contactos entre as larvas e suas presas (MACKENZIE *et al.*, 1990, 1996).

Também a temperatura de cultivo poderá ser uma importante limitação à extrapolação dos resultados das experiências laboratoriais para a natureza, uma vez que as taxas de alimentação das populações naturais de larvas de peixe são directamente influenciadas por este parâmetro (FOLKVORD & MOKSNESS, 1995). Contudo, é difícil integrar num tanque de cultivo a variabilidade térmica que ocorre no meio marinho, sobretudo nas camadas mais superficiais da coluna de água. Porém, é esta a zona de distribuição preferencial dos ictioplânctones de sardinha (RÉ, 1984), pelo que se expõem mais a variações de temperatura e turbulência.

Assim, a utilização dos resultados obtidos em laboratório para a interpretação do estado nutricional de larvas capturadas no mar, mostra-se pouco fiável e segundo SUTHERS (1992) deve ser feita de forma muito cuidadosa. Daí que, e por forma a obviar este inconveniente, a realização de experiências de validação no meio natural seja o mais aconselhado.

Nesta perspectiva optou-se por realizar, neste trabalho, uma experiência na natureza em condições controladas, em que as larvas foram mantidas no interior de câmaras de rede que permitiram a passagem diferencial das presas incluindo a sua exclusão total.

O objectivo deste capítulo foi analisar de que forma o estado nutricional das larvas de *S. pilchardus* se reflecte em diferentes parâmetros bioquímicos que utilizam os ácidos nucleicos e as proteínas *per si* ou através de relações entre eles (DNA/larva, RNA/larva, DNA/mg, RNA/mg, Proteína insolúvel/mg, RNA/Proteína insolúvel, Proteína insolúvel/DNA e RNA/DNA). Pretendeu-se também avaliar qual o índice mais apropriado ao estudo das condições de sobrevivência no meio natural, bem como calcular o nível, denominado “nível crítico”, a partir do qual os indivíduos deverão ser considerados em inanição.

2 - Material e Métodos

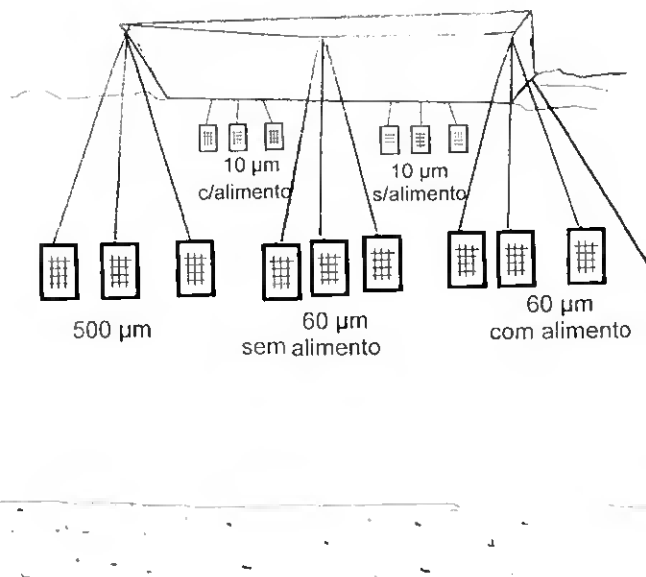
2.1 - Experiência no meio natural

Em Janeiro de 1994, época correspondente a um pico da postura da sardinha, realizaram-se vários arrastos com uma duração de cinco minutos, na zona da Barra de Faro/Olhão com uma rede de plâncton de malha de 500 μm , diâmetro de boca de 40 cm e comprimento de 160 cm, equipada com um copo colector Hydrobios modelo 438950 e com um fluxómetro digital da mesma marca modelo 438110. Depois da recolha, as amostras foram mantidas em recipientes com água salgada a uma temperatura baixa, de forma a diminuir a actividade dos eventuais predadores. Posteriormente, os ovos foram separados do restante material e contados, colocando-se cerca de 200 ovos em cada uma das nove câmaras HIDRO-BIOS utilizadas.

Trataram-se de câmaras cilíndricas com 25 cm de diâmetro, 50 cm de altura e com 24.5 l de volume (Figura 3.1. A.), diferindo apenas, entre elas, pelo facto de estarem equipadas com redes de diferentes malhagens. Três câmaras estavam equipadas com rede de 500 μm , seis com rede de malha 60 μm e seis com rede de malha 10 μm . As câmaras encontravam-se suspensas de um barco ancorado a meio do canal da Ilha de Faro e foram colocadas à profundidade de 2 metros. (Figura 3.1. B.)



A)



B)

Figura 3.1- A) Fotografia de uma das câmaras utilizadas na experiência de validação, B) Esquema geral da experiência onde se indica a malha das várias câmaras

As três câmaras com rede de 500 μm preencheram-se, para além dos ovos, com água do local. Nas seis câmaras de 60 μm de malha, em três delas colocou-se apenas água do local mas filtrada por crivo de 10 μm de malha de forma a excluir potenciais presas. Nas restantes três adicionou-se, para além de água, microzooplâncton concentrado recolhido no local com uma rede de 60 μm , de forma a enriquecê-las com alimento suplementar. Relativamente às câmaras de 10 μm , em três delas colocou-se apenas água do mar filtrada por crivo de 10 μm , de forma a assegurar a ausência de alimento, nas restantes três adicionou-se alimento segundo o procedimento descrito para as câmaras de 60 μm .

Assim, existiam três câmaras de 500 μm nas quais as larvas após a eclosão apenas tinham à sua disposição o alimento existente no local, as seis câmaras de 60 μm , três sem alimento e três enriquecidas com alimento e as seis câmaras de 10 μm , três privadas de presas e três com disponibilidade de alimento (Tabela III.1).

Tabela III.1 - Condições resumidas da experiência de validação (x - indica o tipo de alimento no interior da respectiva câmara).

Alimento	rede 500 μm	rede 60 μm	rede 10 μm
natural	x		
concentrado		x	x
ausente		x	x

Durante as duas semanas que durou a experiência as câmaras foram limpas, regularmente, para evitar a colmatação das redes.

As câmaras com malha de 10 μm (sem alimento) foram recolhidas ao fim de dez dias, sobretudo devido a problemas relacionados com a colmatação. No entanto, tendo em consideração MIRANDA *et al.* (1990), seriam necessário treze dias para que

ocorresse a morte das larvas por inanição, pelo que também era aconselhável recolher as câmaras alguns dias antes.

Relativamente às restantes câmaras, o problema da colmatação não foi colocado de forma tão premente. Para além disso, é provável que mesmo as câmaras de 60 μm privadas inicialmente de alimento apresentassem alguma disponibilidade de presas (p.ex. fitoplanctontes e ovos de invertebrados de dimensões inferiores à malha da rede) pelo que estas câmaras só se recolheram quinze dias depois do início da experiência.

2.2- Análise bioquímica

As larvas encontradas no fim da experiência foram imediatamente colocadas em azoto líquido, sendo transferidas alguns dias depois para um congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A análise bioquímica incidiu sobre dez larvas de cada uma das câmaras, preferencialmente com diferentes comprimentos, de forma a diminuir a influência das dimensões nos resultados.

A análise dos ácidos nucleicos efectuou-se segundo a técnica fluorimétrica descrita no capítulo anterior e que se encontra resumida na Figura 2.2 (pág. 19). As proteínas insolúveis extraídas num passo intermédio do procedimento acima indicado foram determinadas segundo o protocolo resumido na Figura 2.5 (pág. 24) do capítulo II.

A homogeneização das larvas foi efectuada com um desintegrador ultrasónico, Cole-parmer série 4710 com sonda de 3 mm de diâmetro. A leitura da fluorescência das amostras, para posterior determinação da concentração em ácidos nucleicos, foi realizada num espectrofluorímetro HITACHI modelo 650-10, enquanto que a leitura das absorvâncias, para cálculo da concentração em proteínas insolúveis, foi alcançada através de espectrofotómetro HITACHI modelo U-1100.

2.3- Tratamento dos resultados

O tratamento dos resultados obtidos foi efectuado recorrendo ao programa Statistica versão 4.5 para Windows. A notação para os coeficientes estatísticos e testes utilizada neste capítulo pretende seguir a comumente utilizada nos manuais de estatística, sendo n o número de observações, \bar{x} a média, s o desvio padrão, indicado normalmente a seguir à média e ao sinal \pm , V_x coeficiente de variação, p a probabilidade de se verificar uma determinada hipótese nula (H_0), cuja rejeição foi efectuada sempre que $p < 0.05$ e F a estatística de teste da análise de variância (ANOVA).

Dentro de cada grupo de amostras a distribuição das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Kolmogorof-Smirnov, que é bastante potente quando as frequências esperadas são reduzidas ou mesmo quando o número de observações é baixo (ZAR, 1984). Como as variáveis em questão não diferiram significativamente de uma distribuição normal, utilizaram-se estatísticas paramétricas.

O tratamento dos dados consistiu, basicamente, na aplicação de uma ANOVA simples com uma entrada e efeitos fixos. Nesta análise testou-se uma hipótese nula, que considerou a inexistência de diferenças significativas a nível de conteúdo em ácidos nucleicos, proteínas e relações entre eles nas larvas provenientes dos diferentes tipos de câmaras. Complementarmente, quando se rejeitou a H_0 e para se determinar quais os grupos de larvas que diferiam significativamente entre si aplicou-se o teste *Post Hoc* de Tukey. Estes testes foram desenvolvidos para se aplicarem a seguir a uma ANOVA da qual resultou um F significativo e de entre os vários tipos de testes disponíveis o de Tukey é o mais aconselhado pelos estatísticos para a detecção das “verdadeiras” diferenças entre grupos (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1987).

3 - Resultados

A temperatura da água durante esta experiência não apresentou grandes oscilações, para além das variações típicas relacionadas com a maré e foi em média 15.3 °C.

Os estados embrionários capturados encontravam-se maioritariamente nos estados intermédios ou no final do seu desenvolvimento, pelo que a eclosão de acordo com a temperatura registada durante esse período, deverá ter ocorrido um a dois dias depois da sua colocação no interior das câmaras. Este período foi determinado com base em BLAXTER (1969) e MIRANDA *et al.* (1990), que analisaram a influência da temperatura no período de incubação dos ovos de *S. pilchardus*. Os resultados de MIRANDA *et al.* (1990), SILVA & MIRANDA (1992) referem que a reabsorção das reservas vitelinas regista-se três a seis dias após a eclosão, pelo que nas câmaras recolhidas ao fim de 10 dias a duração da inanição terá variado entre 2 e 6 dias. Por outro lado, nas câmaras recolhidas após 15 dias de experiência, o período de inanição situou-se entre 6 e 9 dias.

A sobrevivência registada nas diferentes câmaras foi, de uma forma geral, bastante baixa. De qualquer modo, foi ligeiramente superior à registada em laboratório por SILVA & MIRANDA (1992). Nesse estudo, a sobrevivência variou entre 0% para as larvas não alimentadas e os 5% para as larvas alimentadas, durante os dez dias que durou a experiência. No presente trabalho, após um período idêntico de dez dias, nas câmaras de 10 μ m sem alimento a sobrevivência foi de 5% (10 larvas provenientes de aproximadamente 200 ovos), enquanto que nas câmaras da mesma malhagem com alimento foi de 9% (18 larvas em 200 ovos).

Após quinze dias, nas câmaras de 60 μ m sem alimento a sobrevivência foi de 6% (12 larvas em 200 ovos) e nas câmaras com alimento de 10.5% (21 larvas em 200

ovos), enquanto que nas câmaras com 500 μ m a sobrevivência registou um valor ligeiramente mais elevado, 14% (28 larvas em 200 ovos).

3.1- Ácido desoxirribonucleico (DNA)

A quantidade de DNA em μ g por larva diferiu significativamente entre as larvas das várias câmaras ($p < 0.0001$). No entanto, o teste de Tukey revelou que nas câmaras com malha de 10 μ m, com e sem alimento, as diferenças entre os indivíduos não foram significativas ($p < 0.933$). O mesmo ocorreu entre as câmaras sem alimento de 60 μ m e entre estas e a câmara que simulava a natureza (Anexo I - Tabela 5). Por outro, verificou-se um aumento de DNA nas larvas das câmaras que permaneceram mais tempo no meio aquático (Figura 3.2). Este parâmetro revelou o menor coeficiente de variação nas diferentes situações criadas, com uma média de 10% (Anexo I - Tabela 3). Também a concentração de DNA, expressa em μ g DNA por mg de peso seco (DNA/mg ou DNA/PS) diferiu de forma significativa entre as larvas das diferentes câmaras ($p < 0.0001$), não distinguindo apenas as larvas das câmaras de 10 μ m com alimento das câmaras sem alimento de 60 μ m ($p < 0.249$) e os indivíduos das câmaras de 60 μ m com alimento das câmaras de 500 μ m ($p < 0.998$) (Anexo I - Tabela 6). Quando se sujeitaram as larvas a um período de privação de alimento total ou parcial, situação correspondente às câmaras com rede de malha 10 e 60 μ m, respectivamente, verificou-se um aumento na concentração de DNA (Figura 3.3). O mesmo ocorreu, mas de maneira menos nítida, com as larvas com alimento das câmaras com malha de 10 μ m. O coeficiente de variação do DNA/mg foi superior ao DNA/larva, com uma média de 28.4% (Anexo I - Tabela 3).

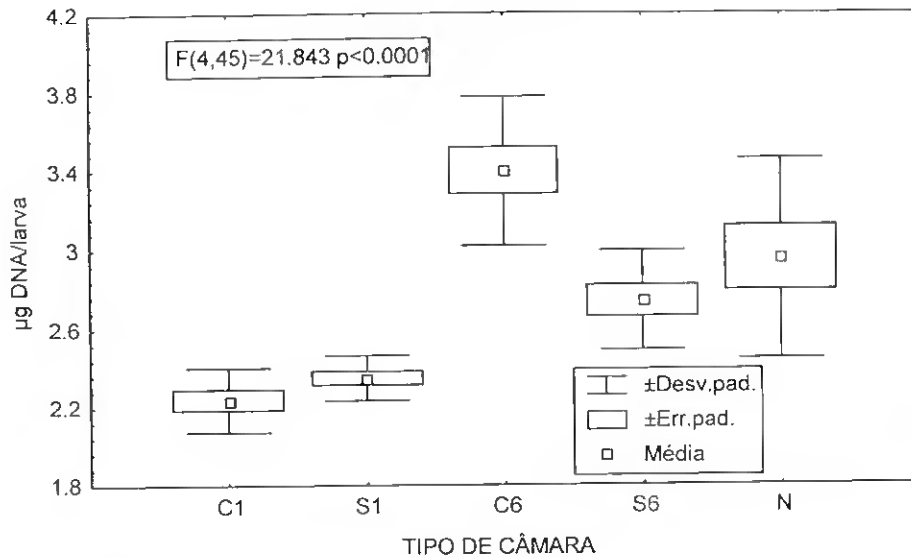


Figura 3.2 - Variação do conteúdo de DNA em µg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 µm com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm e F a estatística de teste da análise de variância).

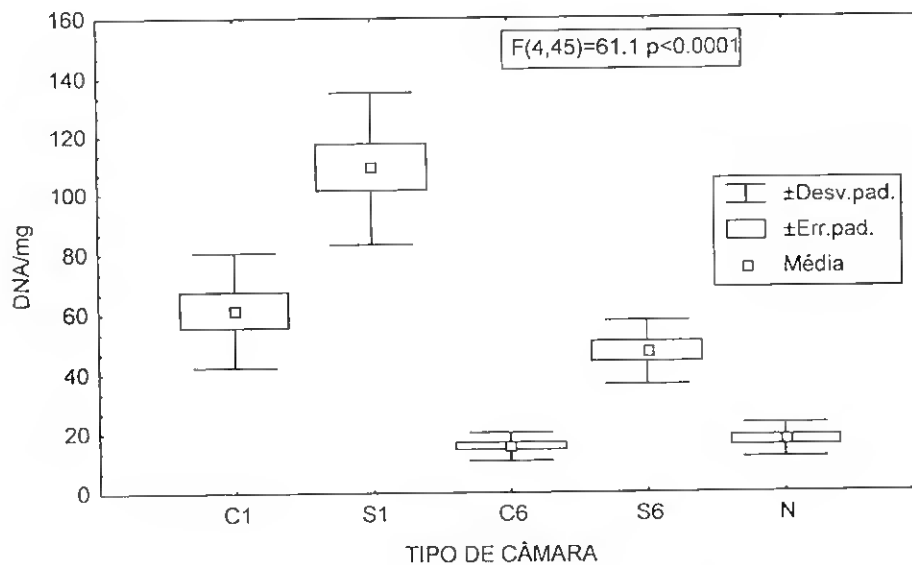


Figura 3.3 - Variação do conteúdo de DNA em µg por mg de peso seco da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 µm com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm e F a estatística de teste da análise de variância).

3.2-Ácido ribonucleico (RNA)

A quantidade de RNA por larva diferiu significativamente entre as situações estudadas ($p < 0.0001$) (Figura 3.4). O teste de Tukey revelou diferenças significativas entre larvas das câmaras com alimento e sem alimento e entre larvas das câmaras de diferente malhagem mas na mesma situação alimentar (Anexo I - Tabela 7), que foram retiradas em diferentes alturas, logo de idade diferente. A concentração de RNA, expressa em $\mu\text{g RNA}$ por mg de peso seco, apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados ($p < 0.0001$) (Figura 3.5). Porém o teste de Tukey indicou que tal se associou a diferenças nas larvas provenientes das câmaras de $10 \mu\text{m}$, enquanto que nas restantes câmaras se revelou independente da presença ou ausência de alimento disponível (Anexo I - Tabela 8). O coeficiente de variação do RNA foi mais elevado do que o DNA ou seja foi em média de 30.5% (Anexo I - Tabela 3).

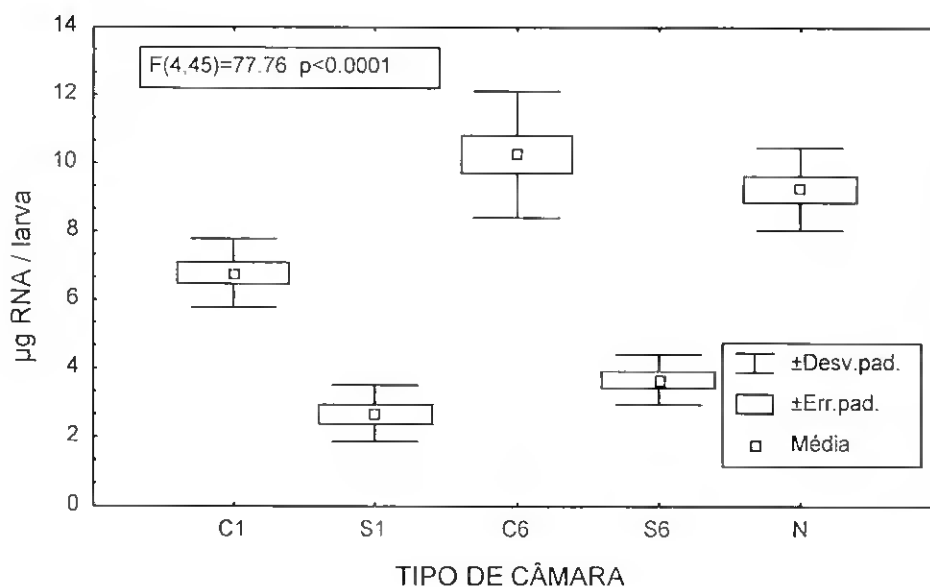


Figura 3.4 - Variação do conteúdo de RNA em μg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de $10 \mu\text{m}$ com alimento, S1- câmara com rede de $10 \mu\text{m}$ sem alimento, C6- câmara com rede de $60 \mu\text{m}$ com alimento, S6- câmara com rede de $60 \mu\text{m}$ sem alimento, N- câmara com rede de $500 \mu\text{m}$ e F a estatística de teste da análise de variância).

3.3-Proteína insolúvel (Pins)

A análise do conteúdo de proteína insolúvel (Pins) em μg por larva revelou a inexistência de diferenças significativas entre as câmaras ($p < 0.998$). Para além disso apresentou um elevado coeficiente de variação, ou seja de 55.5% (Anexo I - Tabela 7). Verificou-se um ligeiro aumento do conteúdo total em Pins nas larvas que permaneceram mais tempo em experiência, que corresponderá um aumento das dimensões das larvas, associado à idade (Figura 3.6).

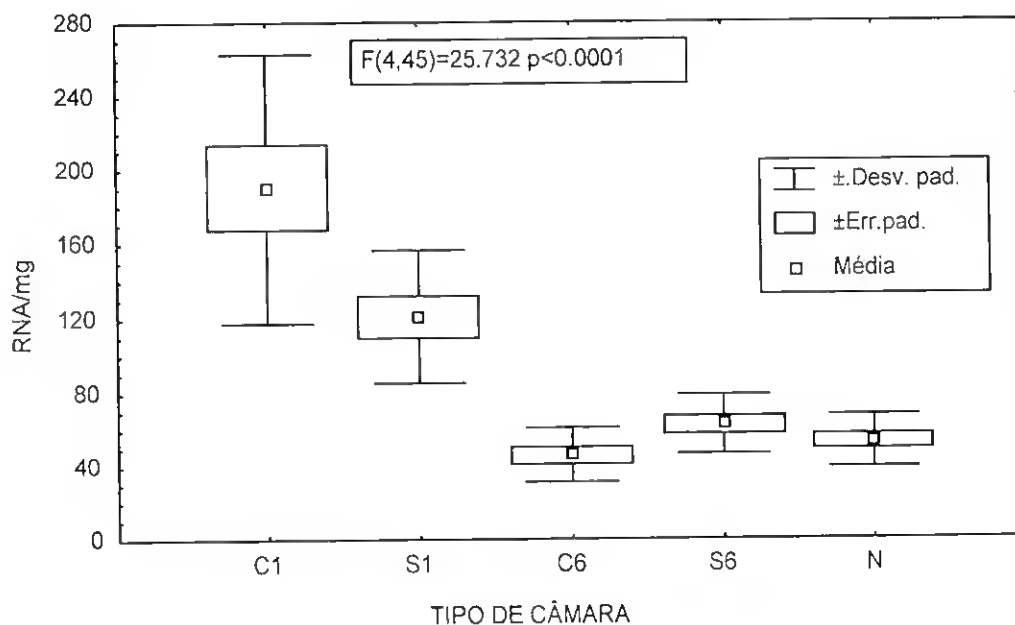


Figura 3.5 - Variação do conteúdo de RNA em μg por mg de peso seco da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 μm com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 μm e F a estatística de teste da análise de variância).

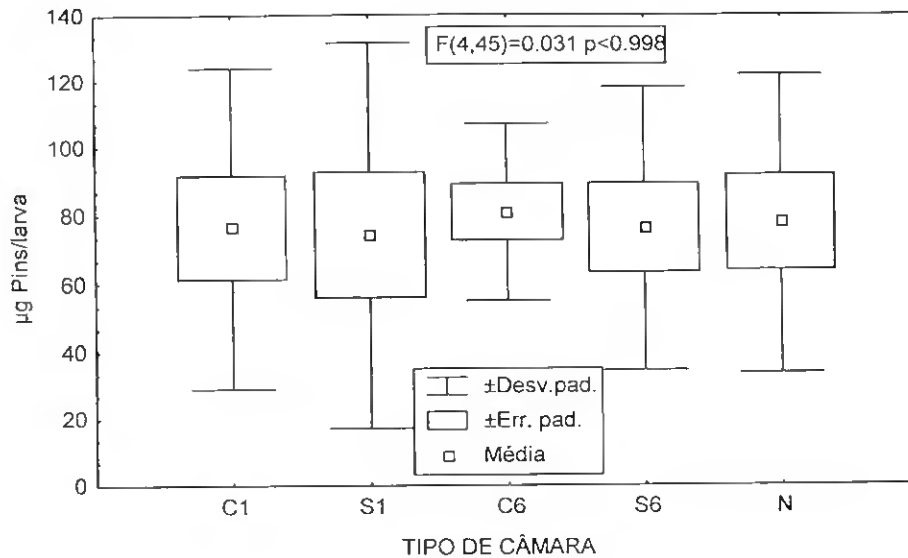


Figura 3.6 - Variação do conteúdo de Proteína insolúvel em µg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 µm com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm e F a estatística de teste da análise de variância).

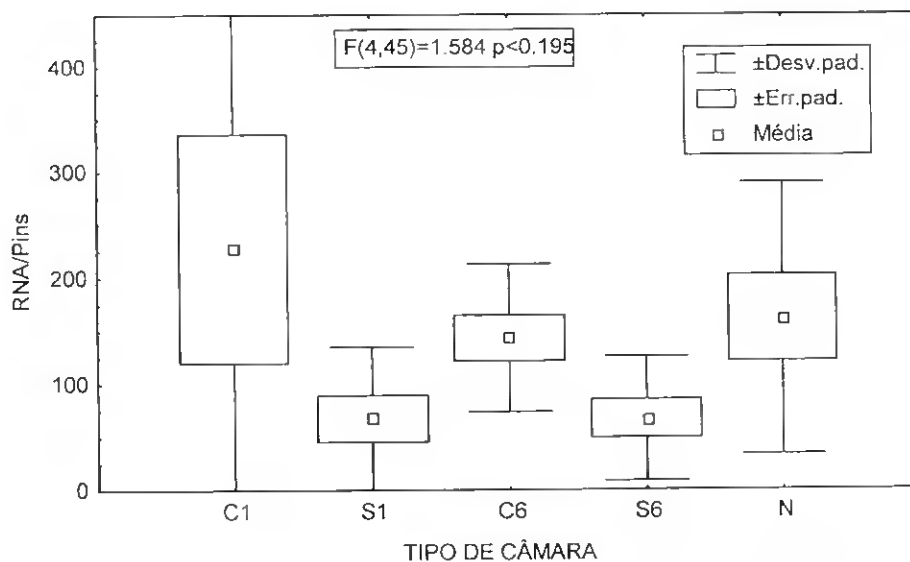


Figura 3.7 - Variação da relação RNA/Pins da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 µm com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm e F a estatística de teste da análise de variância).

3.4-RNA/Pins

Relativamente à razão μg RNA por mg Proteína insolúvel (RNA/Pins), não se encontraram diferenças significativas entre as larvas das câmaras com e sem alimento ($p < 0.195$). De qualquer modo, os valores deste índice decresceram em situações de privação de alimento (Figura 3.7). Porém, os coeficientes variação mais elevados registaram-se nos resultados expressos em RNA/Pins, com média de 93.3% (Anexo I - Tabela 3).

3.5- Pins/DNA

Os resultados da relação μg Proteína insolúvel por μg de DNA (Pins/DNA) mostraram que este índice não foi sensível às diferentes situações alimentares (Figura 3.8), uma vez que a aplicação da ANOVA não detectou diferenças significativas ($p < 0.721$). Para além disso, e à semelhança do índice anterior, apresentou um elevado coeficiente de variação e que foi em média de 54.4 % (Anexo I- Tabela 3).

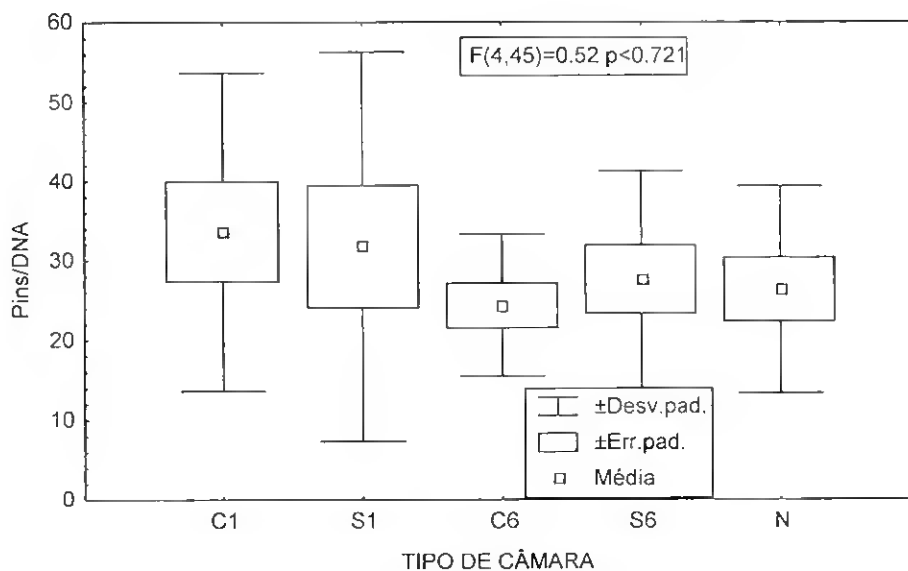


Figura 3.8 - Variação da razão Pins/DNA nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 μm com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm sem alimento, N- câmara com rede de 500 μm e F a estatística de teste da análise de variância).

3.6 - RNA/DNA

No que respeita à razão μg de RNA por μg de DNA (RNA/DNA) verificou-se que diferiu significativamente entre as câmaras ($p < 0.0001$). Foi este o único índice, que segundo o teste de Tukey (Anexo I - Tabela 9) distinguiu significativamente apenas as larvas de câmaras com alimento das de câmaras sem alimento, não revelando diferenças entre as larvas recolhidas em alturas diferentes, pressupostamente de idade diferente (Figura 3.9). Para além disto, a razão RNA/DNA foi o índice que apresentou, em média, coeficientes de variação mais baixos, 22.4%, contrastando por exemplo com 54.4% para Pins/DNA e 93% para RNA/Pins (Anexo I - Tabela 3).

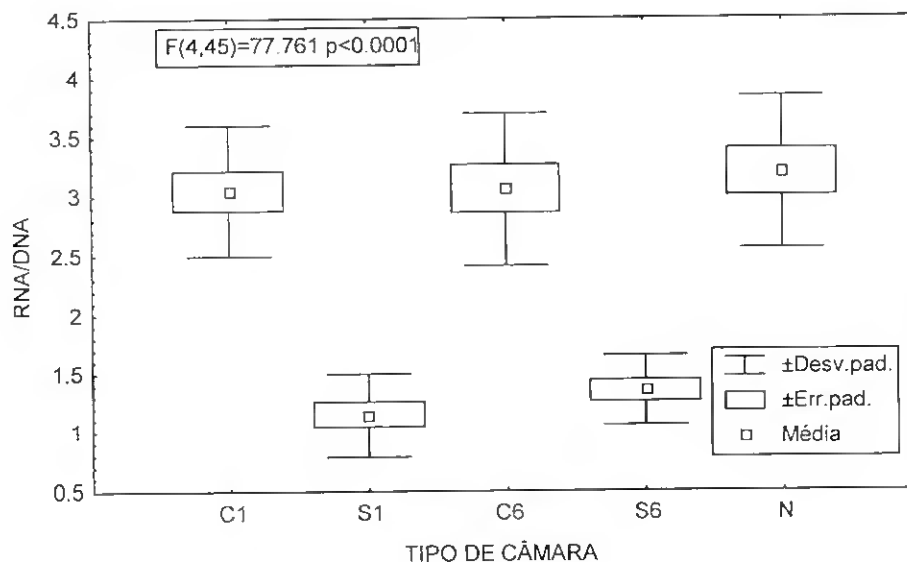


Figura 3.9 - Variação da relação RNA/DNA nas câmaras com rede de diferente malhagem (C1- câmara com rede de 10 μm com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm sem alimento, N - câmara com rede de 500 μm e F a estatística de teste da análise de variância).

Nesta perspectiva, este índice revelou-se especialmente útil para a separação entre larvas privadas de alimento e larvas alimentadas. Para se obter o nível de RNA/DNA que separa estes grupos, calculou-se em primeiro lugar a média deste índice em cada

uma das câmaras sem alimento. Estes resultados foram relativamente próximos nas câmaras de malhagem diferente, nomeadamente 1.2 (± 0.35) na câmara de 10 μm e 1.4 (± 0.3) na câmara de 60 μm , ambos na ausência de alimento. Em segundo lugar, e considerando o valor 1.3 resultante da média da razão RNA/DNA nos dois tipos de câmaras, verificou-se que 90% das larvas que eram classificadas correctamente em função desse "nível crítico". Tal facto indicou que um valor de RNA/DNA abaixo de 1.3 deverá traduzir uma larva em situação nutricional carenciada.

Por outro lado, a câmara com malha de 500 μm , que deveria simular o ambiente natural e permitir obter os níveis da razão RNA/DNA característicos de situações normais (3.2 ± 0.64), forneceu valores ligeiramente superiores aos das câmaras com alimento de malha de 10 e 60 μm (3.1 ± 0.55 e 3.1 ± 0.65 respectivamente), mas cuja diferença não foi significativa ($p < 0.973$) (Anexo I - Tabela 9).

4- Discussão

4.1-Ácido desoxirribonucleico (DNA)

O facto da quantidade de DNA por larva apresentar valores superiores nas câmaras que permaneceram mais tempo no meio aquático pode relacionar-se com o facto deste parâmetro ser um indicador do número total de células do indivíduo (BARRON & ADELMAN, 1984; ANGER & HIRCHE, 1990).

A nível celular, a quantidade total de DNA por célula é constante em tecidos somáticos normais, dentro de determinada espécie e não alterável devido à inanição (BUCKLEY, 1980) ou outros factores de *stress*, como poluição (BARRON & ADELMAN, 1984) ou doença (STEINHART & ECKMANN, 1992). De facto, o DNA como portador da informação genética não é afectado por alterações ambientais. Por conseguinte a quantidade de DNA tornou-se uma referência para se inferir sobre o número total de células de um determinado tecido (BULOW, 1987).

Apesar da quantidade total de DNA por larva não permitir a distinção entre larvas alimentadas e não alimentadas, a concentração de DNA, expressa em $\mu\text{g DNA/mg}$ de peso seco (DNA/mg ou DNA/PS) apresentou-se como um índice com algumas potencialidades para aquele efeito. De facto, quando se sujeitaram as larvas a um período de privação de alimento total ou parcial, situação correspondente às câmaras sem alimento com rede de malha 10 e 60 μm , respectivamente, verificou-se um aumento na concentração de DNA. Este aumento tem sido atribuído a uma redução no volume celular função da privação de alimento, pelo que um maior número de células estarão presentes numa porção equivalente de tecido (BULOW, 1987). Numa experiência com peixes adultos, realizado por BULOW (1970), este autor registou que após 45 dias de inanição a concentração de DNA aumentava e a de RNA decrescia. Num estudo com larvas da espécie *Solea solea*, BERGERON *et al.* (1991) e RICHARD *et al.* (1991) verificaram que a quantidade de DNA expressa em μg por mg de peso seco aumentava em função do intervalo de inanição e estabeleceram um “nível crítico”, 30 μg de DNA/mg de peso seco, acima do qual consideraram que a larva se encontrava em inanição.

As larvas da espécie *S. pilchardus*, estudadas neste trabalho e que se encontravam nas câmaras privadas de alimento, apresentaram valores de DNA/mg bastante superiores ao “nível crítico” referido pelos autores anteriores. Tal poderá estar relacionado com o facto de a quantidade de DNA celular variar consoante o grau de evolução das espécies de peixe (HINEGARDNER & ROSEN, 1972).

Também as larvas das câmaras com malha de 10 μm e com alimento que só permaneceram dez dias no meio aquático apresentaram valores um pouco superiores ao “nível crítico” indicado por RICHARD *et al.* (1991) e BERGERON *et al.* (1991), o que indicaria algum *stress* alimentar. No entanto, este facto poderá dever-se à aprendizagem para capturar presas não ter sido ainda totalmente concluída (MCGURK *et al.*, 1992). Com efeito a idade das larvas nessa situação nesta experiência era reduzida (máximo de 9 dias). Durante este período as larvas consomem muita energia procurando presas (BLAXTER & STAINES, 1971) e não conseguem criar reservas. Se o alimento não está disponível nessa altura, as reservas do vitelo desaparecem

rapidamente e a capacidade de se alimentarem decresce ainda mais. Assim, os indivíduos nesta situação poderão experimentar a inanição completa no meio marinho. No caso de larvas com mais idade, com reservas acumuladas, que não necessitam de período de aprendizagem para capturar presas e que são capazes de se alimentar de uma maior variedade de organismos, a situação será diferente e menos crítica (RICHARD *et al.*, 1991). Já EHRlich (1974) defendia que a resistência à inanição tende a aumentar durante a ontogénese.

4.2 - Ácido ribonucleico (RNA)

A quantidade de RNA quer a nível do indivíduo como a nível celular revelou-se mais variável do que a quantidade de DNA, o que se pode associar ao facto da primeira ser mais influenciada pelas condições externas. Esta macromolécula está ligada à transferência do código genético do DNA nuclear para o citoplasma e com a síntese de novas proteínas, sendo superior em tecidos com um crescimento mais rápido ou com uma maior taxa de síntese proteica (BULOW, 1987).

O conteúdo de uma larva em RNA parece ser um indicador da taxa de síntese proteica e do nível da actividade metabólica e depende muito das condições externas, entre elas do nível alimentar a que o indivíduo foi sujeito (HOULIHAN, 1991). De facto, a quantidade total de RNA mostrou-se sensível ao nível alimentar, mas tal como o índice anterior também foi afectado pela dimensão da larva.

Neste âmbito, BULOW (1970) referiu que, numa experiência com peixes adultos, a quantidade de DNA manteve-se constante durante catorze dias de inanição, seguidos de seis dias de alimentação, enquanto que o RNA decresceu durante a privação e aumentou rapidamente com a disponibilidade de alimento. Relativamente a estudos com larvas, tal como neste trabalho, CLEMMESSEN (1987b) analisou o comportamento da quantidade total de RNA em indivíduos das espécies *C. harengus* e *Scophthalmus maximus*, na ausência e presença de alimento e apresentou conclusões semelhantes.

Este decréscimo verificado no conteúdo total em RNA está associado sobretudo a uma diminuição do RNA ribossomal uma vez que, segundo YOUNG (1970), 85% a 94% do RNA de uma célula é ribossomal. Tal implicará uma diminuição da taxa de síntese proteica. Porém, é necessário considerar que nas células eucarióticas esta taxa depende não só da quantidade de RNA, ou seja do número total de ribossomas no tecido mas também da actividade desses organelos (PAIN & CLEMENS, 1980). Com efeito, existe uma reserva considerável de ribossomas inactivos que não participam na síntese de proteínas mas que, em caso de necessidade tornam-se activos.

Em determinadas condições de *stress* alimentar quase todos os ribossomas cessam actividade, sendo mesmo em condições extremas reabsorvidos (HUNT, 1983). Segundo LOUGHAN & GOLDSPINK (1984) existe um decréscimo de 17% na quantidade de RNA e de 41% na sua actividade, durante a inanição. A síntese de proteínas é um processo que requer muito energia, e grande parte dela é utilizada pelas reacções que ocorrem nos ribossomas, pelo que em situações de carência alimentar a energia é canalizada para assegurar funções básicas (NOMURA *et al.*, 1983).

Para além de depender do estado nutricional, como já se referiu, a quantidade de ribossomas existentes numa larva, depende obviamente da dimensão do indivíduo. Assim a comparação entre duas larvas, relativamente à quantidade de RNA existente, só é possível expressando o RNA de forma independente da dimensão.

Nessa perspectiva, efectuou-se uma tentativa de tornar a quantidade total de RNA independente da dimensão larvar, expressando-se esta quantidade em μg RNA por mg de peso seco. No entanto, a análise deste índice apresentou diferenças significativas entre todos os grupos estudados, e não foi sensível à disponibilidade alimentar nas câmaras de $60\mu\text{m}$. Desta forma, não será muito útil para a determinação do estado nutricional das larvas desta espécie.

4.3-Proteína insolúvel (Pins)

A análise do conteúdo de proteína insolúvel (Pins) por larva parece também não ser muito útil na análise do estado nutricional das larvas de peixe, dado que não revelou a existência de diferenças significativas entre os indivíduos provenientes de câmaras com níveis alimentares distintos. Verificou-se apenas um ligeiro aumento do conteúdo total em Pins com o decorrer da experiência em correspondência a uma provável maior idade das larvas. Esta relativa constância das proteínas insolúveis deve-se ao facto de serem, basicamente proteínas fibrilares, como o colagénio, só utilizadas em caso de carência muito extrema do organismo (BOHINSKI, 1987) e tal como o DNA não serão muito afectadas pelas condições ambientais. Com efeito, o colagénio é uma molécula bastante estável e que é muito pouco mobilizada (LOVE, 1970), sendo contudo a proteína mais abundante nos animais, representando cerca de 30% do total das proteínas presentes.

4.4-RNA/Pins

Relativamente à razão RNA/Proteína insolúvel (RNA/Pins), este índice decresceu na privação de alimento, apresentando valores normalmente abaixo de 100. No entanto, não revelou diferenças significativas entre câmaras, além do que se caracterizou por coeficientes de variação muito elevados. Assim, não deverá constituir uma opção em estudos sobre estado nutricional de larvas de peixe, nomeadamente da espécie *S. pilchardus*. De facto, este índice, ou seja a concentração de RNA existente nos tecidos expressa em relação à concentração de proteínas, é utilizado sobretudo em estudos relacionados com a medição da síntese proteica, enquanto que se privilegia a utilização da razão RNA/DNA em estudos sobre o estado nutricional e sobre a taxa de crescimento das larvas de peixe (HOULIHAN, 1991; HOULIHAN *et al.*, 1993). De qualquer forma, seria de esperar que os resultados do índice RNA/Pins, não diferissem acentuadamente em relação à razão RNA/DNA, uma vez que, embora o denominador seja diferente, quer o DNA como Pins são ambos macromoléculas cujas quantidades se caracterizam por serem pouco variáveis em distintas condições ambientais. No entanto, tal pode associar-se a uma certa variabilidade intrínseca da síntese proteica

típica deste período do desenvolvimento larvar (WESTERMAN & HOLT, 1988), o que se reflectirá nas proteínas insolúveis.

4.5-Pins/DNA

Através dos resultados da relação Proteína insolúvel/DNA (Pins/DNA) observou-se que este índice não foi sensível aos diferentes níveis alimentares, sobretudo nas fases mais iniciais, que correspondem às câmaras de 10 μ m. Nas fases larvares mais avançadas verificou-se um ligeiro aumento nas câmaras privadas de alimento, o que se explica através de uma maior concentração de proteína insolúvel no interior de cada célula. De facto, em caso de carência alimentar são reabsorvidas preferencialmente outras macromoléculas. No entanto, esta razão é considerada, sobretudo, um índice da massa celular, que informa sobre as dimensões das células (DAGG & LITTLEPAGE, 1972; BARRON & ADELMAN, 1984; BULOW, 1987). Nesta perspectiva, constatou-se também no presente estudo que este índice foi menor entre as larvas recolhidas em primeiro lugar, pressupostamente com menor idade.

4.6-RNA/DNA

No presente trabalho este índice foi bastante sensível à disponibilidade alimentar das larvas analisadas. A este resultado estará associado o facto da razão RNA/DNA ser, de todos os índices referidos nas secções anteriores, o mais usado pelos investigadores da área. Com efeito, a utilização do índice RNA/DNA para a determinação do estado nutricional dos organismos e da sua taxa de crescimento está muito vulgarizada, sobretudo em larvas de peixe (BUCKLEY, 1979, 1980, 1982, 1984; WRIGHT & MARTIN, 1985; BUCKLEY & LOUGH, 1987; CLEMMESSEN, 1987a,b, 1988, 1989, 1990; CHÍCHARO, 1993). No entanto, foram também realizados vários trabalhos em peixes adultos (BULOW, 1970, 1971, 1974, 1978, 1981; HAINES, 1973), em crustáceos (DAGG & LITTLEPAGE, 1972; BAMSTEDT & SKJOLDAL, 1980; ANGER & HIRCHE, 1990), em bivalves (WRIGHT & HETZEL, 1985; CHÍCHARO *et al.*, 1994; CHÍCHARO & CHÍCHARO, 1994; CHÍCHARO & CHÍCHARO, 1995), em cefalópodes (CLARKE *et al.*, 1989), em

poliquetas (DEBEVOISE & TAGHON, 1988), em microalgas (DORTCH *et al.*, 1983) e em bactérias (PAUL & MYERS, 1982).

A utilização desta relação baseia-se no facto do DNA, como portador da informação genética, existir em quantidades constantes dentro das células e não alteráveis por circunstâncias ambientais, enquanto que a quantidade de RNA no organismo é muito variável e sensível à inanição. A razão RNA/DNA é usualmente considerada um índice muito mais preciso na determinação do estado nutricional, do que apenas a quantidade de RNA, uma vez que não é afectada por diferenças no número de células. Nesta perspectiva, esta razão exprime a quantidade de RNA por célula (BULOW, 1987) e o potencial biossintético de crescimento de uma larva de peixe pode ser determinado através deste índice (CANINO, 1994).

Desta forma, uma redução do potencial de crescimento pode ser indicado por um decréscimo significativo na razão RNA/DNA. Esta diminuição ocorre, entre dois a cinco dias, após o início da privação de alimento, segundo experiências em laboratório com larvas de um número considerável de espécies de peixe (BUCKLEY, 1984; WRIGHT & MARTIN, 1985; CLEMMESSEN, 1989; RICHARD *et al.*, 1991).

O presente estudo, realizado em condições controladas no meio natural, demonstrou que as larvas alimentadas apresentam relações RNA/DNA superiores comparativamente às larvas sujeitas a privação de alimento. O facto da média da razão RNA/DNA ter sido semelhante nas larvas provenientes dos dois tipos câmaras em não se adicionou alimento de início, ou seja com rede de 10 e de 60 μm de malha, pode indicar que os mesmos os fitoplanctontes de maiores dimensões, como as diatomáceas que só penetram, provavelmente, nas câmaras com malha de maior abertura, e apesar da sua composição em ácidos gordos (St. JOHN & LUND, 1996), não foram suficientes para assegurar a boa condição das larvas de peixe. De facto, existem vários trabalhos que referem que o fitoplâncton *per si* não é suficiente para alimentar os peixes nesta fase da vida (SCURA & JERDE, 1977; BELL & SARGENT, 1996). Relativamente às câmaras enriquecidas com o resultado de arrastos prévios de microzooplâncton, parecem ter constituído um meio adequado para o crescimento das

larvas, sendo tal da responsabilidade não só das presas potenciais colocadas inicialmente, mas também da produção zooplancónica que continuou no interior das câmaras.

A câmara com malha de 500 μ m que deveria simular o ambiente natural e fornecer os níveis da razão RNA/DNA característicos de larvas em situações normais, evidenciou valores ligeiramente superiores aos dos indivíduos das câmaras com alimento concentrado, de malha de 10 e 60 μ m, apesar de não serem significativamente diferentes. Tal facto poderá explicar-se pela distribuição das larvas e do seu alimento se encontrar em agregados no meio aquático (ROTHSCHILD *et al.*, 1982), alguns dos quais poderão apresentar densidades superiores às das câmaras com alimento concentrado.

Por outro lado, e apesar do baixo coeficiente de variação deste índice, a maior dispersão dos valores de RNA/DNA entre as larvas das câmaras com alimento tem, também, sido referido por outros autores (CLEMMESSEN, 1987b; RAAE *et al.*, 1988; BERGERON *et al.*, 1991; MATHERS *et al.*, 1993). Esta variação pode ser devida ao facto de, durante um desenvolvimento larvar normal (ou seja com alimento disponível), existirem períodos de proliferação de células acompanhados de altas taxas de síntese proteica, que alternam com períodos de taxas de síntese proteica reduzidas (WESTERMAN & HOLT, 1988). De facto, FUKUDA *et al.* (1986) referem que as larvas de arenque só depois de atingirem 30 mm, conseguem o equilíbrio metabólico, relativamente aos níveis de glicogénio, fosfolípidos e proteínas.

O objectivo principal que se pretendeu atingir com esta experiência foi, não só verificar se a razão RNA/DNA decrescia em larvas sujeitas a privação de alimento, mas também estabelecer-se um “nível crítico” a partir do qual se considerará que uma determinada larva de sardinha, capturada no meio natural estava sujeita a condições de inanição.

Nesta perspectiva, os resultados deste estudo indicaram que para valores menores que 1.3 se poderá considerar que as larvas estavam em situação nutricional

carenciada. Verificou-se que este valor não difere, acentuadamente, dos encontrados por outros autores para espécies diferentes (Tabela III.2).

Como os “níveis críticos” obtidos nas câmaras recolhidas em alturas diferentes assemelharam-se muito, poderá supor-se que a idade das larvas não influenciará acentuadamente a razão RNA/DNA. Esta suposta estabilidade do “nível crítico”, à medida que a larva cresce é muito importante, pois numa amostra de ictioplâncton proveniente do meio natural, a variabilidade de dimensões pode ser elevada. A análise deste índice num conjunto considerável de larvas de sardinha provenientes de arrastos no meio marinho, cujos resultados se apresentam no capítulo seguinte (Capítulo IV), não evidenciou a existência de qualquer relação entre o comprimento larvar e a razão RNA/DNA. Tal pode estar relacionado com as dimensões relativamente reduzidas das larvas capturadas, sobretudo na costa algarvia, que raramente ultrapassaram os 20 mm.

A independência deste índice relativamente às dimensões das larvas é, também, defendido por BUCKLEY (1979, 1980, 1982, 1984) e ROBINSON & WARE (1988). No entanto, existem autores que não concordam com esta conclusão, nomeadamente SUTHERS *et al.* (1992), e recomendam a utilização dos resíduos da regressão entre o RNA e o DNA, de forma que o índice não seja influenciado pela dimensão. De facto, CLEMMESSEN (1989) foi a primeira a colocar restrições nesta área e apresentar dois “níveis críticos” da razão RNA/DNA para larvas de dimensões e idades diferentes. Esta autora, em 1994, refere que apesar de a maioria dos “níveis críticos” publicados, até àquele momento, utilizaram razões RNA/DNA independentes quer da idade quer do comprimento, os seus resultados contrariam este facto.

Também MCGURK *et al.* (1992) demonstraram que a razão RNA/DNA nas larvas estudadas aumentava com o comprimento, o que justificaram através de um crescimento das células sem aumento do seu conteúdo em DNA (hipertrofia).

No seu último trabalho, CLEMMESSEN (1994) apresentou um modelo de regressão linear para o cálculo dos “níveis críticos” de diferentes comprimentos da espécie *C. harengus*. Contudo, como a dependência, relativamente ao comprimento, foi menos acentuada nas larvas não alimentadas considerou-se que os seus resultados, no que respeita ao “nível crítico” do índice RNA/DNA, estavam em concordância com a maioria dos autores que cultivaram larvas de espécies diferentes em condições de inanição (Tabela III.2). Nesta perspectiva, sugeriu mesmo que devia existir um mínimo da razão RNA/DNA, que será independente da espécie, da dimensão e da idade e que será próximo de 1, abaixo do qual a sobrevivência das larvas no seu meio natural não ocorrerá. Curiosamente, parece também existir uma certa similaridade entre grupos taxonómicos bastantes distintos. De facto, um “nível crítico” da razão RNA/DNA de 1.1 foi também determinado em pós-larvas de bivalves (CHÍCHARO & CHÍCHARO, 1995).

Tabela III.2 - Comparação dos “níveis críticos” da razão RNA/DNA em diferentes espécies.

Espécie	Inanição (dias)	RNA/DNA	Temperatura (°C)	Referências
<i>Ammodytes americanus</i>	7	1.5	9	BUCKLEY (1984)
<i>Morone saxatilis</i>	19-21	1.2	12	WRIGHT & MARTIN (1985)
<i>Scophthalmus maximus</i>	7	1.3	14.9	CLEMMESSEN (1987b)
<i>Pleuronectes platessa</i>	21	1.0	6	HOVENKAMP (1990)
<i>Theragra chalcogramma</i>	7	1.0	6	CANINO <i>et al.</i> (1991)
<i>Coregonus spp.</i>	5	1.9	8	STEINAHNAT & ECKMANN (1992)
<i>Clupea harengus</i>	6-9	1.2 (10mm) 1.7 (23mm)	14.4	CLEMMESSEN (1994)
<i>S. pilchardus</i>	2-6 7-9	1.2 1.4	15.3	presente estudo

Para além da discussão sobre a influência do comprimento na razão RNA/DNA, tem gerado também alguma controvérsia o tipo de RNA utilizado neste índice. Normalmente, determina-se o RNA total, mas este é basicamente constituído por RNA ribossomal. Este tipo de RNA é a forma aparentemente mais estável não se decompondo de imediato após uma diminuição da taxa de crescimento. Por esta razão, DAGG & LITTLEPAGE (1972) consideram que se devia utilizar apenas o RNA mensageiro, em virtude da sua maior sensibilidade às alterações na síntese das proteínas, pois tem uma vida mais curta. No entanto, segundo LEHNINGER (1981) este tipo de RNA é difícil de isolar, não só porque possui uma duração média de vida menor, mas também porque representa apenas uma pequena parte do RNA celular total. Além disso, e segundo o mesmo autor, também é limitativo o facto de cada proteína ou grupo de proteínas requerer a sua molécula específica de RNA mensageiro. Na realidade, o isolamento de um RNA mensageiro puro, a partir de uma mistura que contém centenas de RNA mensageiros, é uma tarefa extremamente difícil de se conseguir.

Porém em condições de redução de taxa de crescimento, apesar de mais lenta que a do RNA mensageiro, ocorre uma diminuição efectiva na quantidade de RNA ribossomal (UEBERSCHAR & CLEMMESSEN, 1992). De facto, os ribossomas não são imediatamente reabsorvidos em situação de *stress* nutricional, reagindo a variações na disponibilidade alimentar durante períodos curtos, apenas com alterações da sua actividade e não na sua quantidade (HOULIHAN *et al.*, 1986). A redução do número de ribossomas só ocorre após alguns dias, com temperaturas entre 14°C e 16 °C (cinco dias de acordo com UEBERSCHAR & CLEMMESSEN, 1992 e três a quatro dias segundo CLEMMESSEN, 1994). Esta resposta lenta do RNA ribossomal reflecte-se no RNA total, porém tal não significa uma diminuição significativa da sensibilidade da razão RNA/DNA para avaliar a sobrevivência futura da larva. De facto, um período relativamente curto de privação de alimento não acarreta consequências para as larvas em termos de sobrevivência.

Nesta perspectiva, o interesse particular da razão RNA/DNA consiste na possibilidade de detecção dos sintomas iniciais que preconizam que a sobrevivência irá,

efectivamente, ser posta em causa. Este aspecto é muito importante, uma vez que as larvas fracas ou moribundas são rapidamente eliminadas pela predação, mas larvas sujeitas a poucas horas de ausência de alimento mantêm a sua condição física inalterada.

Este índice, considerado por vários autores a melhor opção para a análise do estado nutricional de larvas de peixe (BUCKLEY, 1984; ROBINSON & WARE, 1989; CLEMMESSEN, 1994), apresentou o menor coeficiente de variação relativamente aos restantes índices analisados, o que constitui mais um motivo para que a sua aplicação esteja tão generalizada e forneça resultados fiáveis.

5- Conclusões

A manutenção de larvas de sardinha em câmaras especiais de rede no meio marinho, com diferentes disponibilidades de alimento, revelou-se uma forma adequada de estudar as alterações bioquímicas que ocorrem nos indivíduos com falta de alimento. Desta forma, evitou-se os inconvenientes associados às condições laboratoriais, como a alimentação artificial, a limitação de espaço, a ausência de turbulência, entre outros.

O índice DNA/mg peso seco detectou, sobretudo, as diferentes situações alimentares nas câmaras com rede de malha de 10 μ m, ou seja em larvas numa fase mais inicial do desenvolvimento. Este índice parece assim, especialmente, sensível às condições de inanição, em fases mais próximas da reabsorção das reservas vitelinas.

Contrastando com os índices referidos, a razão Pins/DNA não diferiu significativamente entre as situações analisadas, assumindo assim pouca importância na detecção do estado nutricional. Da mesma forma, o índice RNA/Pins também não apresentou diferenças significativas entre as larvas provenientes das distintas câmaras, pois apesar de em média ter sido superior nas câmaras com alimento, apresentou uma grande variabilidade de resultados numa mesma câmara.

De entre os índices analisados, a razão RNA/DNA foi o mais apropriado para classificação do estado nutricional de uma larva de sardinha. De facto, este foi o índice mais sensível ao nível alimentar a que as larvas estiveram sujeitas e com o menor coeficiente de variação dentro de cada câmara. Esta razão diferiu significativamente apenas entre larvas originárias de câmaras com e sem alimento, não distinguindo larvas recolhidas em diferentes alturas de tempo, como aconteceu com outros índices.

A determinação do limite, denominado "nível crítico", a partir do qual se pode considerar que uma larva estava em situação nutricional carenciada, foi um aspecto fundamental deste estudo uma vez que possibilita o cálculo da percentagem de inanição no meio natural. A experiência de validação indicou 1.3 como o "nível crítico" para a razão RNA/DNA, valores superiores a este indicarão que a sobrevivência das larvas da espécie *S. pilchardus* não estaria posta em causa.

Apesar das indicações de que a razão RNA/DNA constitui a melhor opção neste tipo de estudos, os resultados revelaram que o recurso a outros índices que também utilizam os ácidos nucleicos, como DNA/mg, pode representar um complemento com interesse para o estudo do estado nutricional, com a vantagem de não ser necessário um esforço suplementar a nível de processamento laboratorial. De facto a utilização de multi-índices proporciona informação acrescida devido às diferentes sensibilidades, na detecção de situações de inanição de larvas em distintas fases do desenvolvimento. Desta forma, consegue-se uma aproximação mais correcta da condição das larvas de diferentes dimensões presentes em amostras de ictioplâncton, recolhidas no meio natural.

CAPÍTULO IV

ESTADO NUTRICIONAL EM LARVAS DE *SARDINA PILCHARDUS* NA
COSTA SUL DE PORTUGAL E NO NORTE DE ESPANHA

4.1 - Introdução

A espécie *Sardina pilchardus* encontra-se nas plataformas continentais europeia e norte-africana, concretamente no Atlântico Nordeste, Mar Mediterrâneo e Mar Negro, sendo menos frequente nas costas mais setentrionais (FURNESTIN, 1952). A área de distribuição é condicionada, fundamentalmente, pela temperatura, localizando-se entre a isotérmica superficial dos 10°C, a Norte, que corresponde aproximadamente à Noruega, e a isotérmica dos 20°C, a Sul, que se situa ao nível do Senegal. As fases embrionária e larvar desta espécie suportam uma ampla gama de temperaturas, ocorrendo entre os 12.9 e 23.4°C, porém as densidades mais elevadas verificam-se quando a temperatura superficial varia entre 14 e 17.7°C (SOBRAL, 1975; RÉ, 1984).

A área de distribuição desta espécie sobrepõe-se com a de outros clupeíformes, nomeadamente a Norte (França e Ilhas Britânicas) com *Clupea harengus*, no centro (Península Ibérica) com *Engraulis encrasicolus*, enquanto que a Sul (África Oeste e parte Este do Mediterrâneo) ocorre conjuntamente com *Sardinella aurita* (WYATT, 1985).

Desde o ovo até à fase adulta, a espécie *S. pilchardus*, tal como a maioria dos peixes, passa por alterações profundas na sua morfologia, fisiologia e comportamento. O crescimento da larva envolve, para além de um aumento da massa corporal, modificações a vários níveis, tais como o aperfeiçoamento das barbatanas, início da alimentação exógena e a calcificação dos ossos (BLAXTER, 1975). Existem evidências que estes processos, por vezes, não são graduais, mas que se podem caracterizar por alterações súbitas no desenvolvimento, e que a altura em que ocorrem pode variar com as condições ambientais (BALON, 1984).

As primeiras descrições morfológicas efectuadas sobre as fases iniciais do desenvolvimento de *S. pilchardus* foram efectuadas por LEBOUR (1921), RUSSEL

(1926) e KARLOVAC (1967) com base em exemplares recolhidos no meio marinho. Posteriormente, BLAXTER (1969) contribuiu para aprofundar estes conhecimentos, através do cultivo em laboratório de larvas até uma idade de 20 semanas e um comprimento de 36 mm.

Estes estudos permitiram verificar que ovo possui um grande espaço perivitelino e o vitelo segmentado com uma única gota lipídica. Para além disso, na altura da eclosão os olhos da larva ainda não estão pigmentados, nem a boca nem as mandíbulas completamente desenvolvidas. À medida que o vitelo é reabsorvido, o corpo da larva aumenta e os olhos e a boca desenvolvem-se, *a posteriori* por fraccionamento da barbatana primordial surgem as barbatanas definitivas. A barbatana dorsal apresenta uma característica distintiva para a espécie, que se caracteriza por finalizar paralelamente à zona terminal do tubo digestivo. Com o aperfeiçoamento das barbatanas, a larva torna-se mais activa, o que se torna necessário para a captura do alimento. Um aspecto particular desta espécie é o facto da pigmentação dos olhos coincidir, aproximadamente, com o início da alimentação exógena. A partir desta altura, a capacidade de capturar presas e a funcionalidade do sistema digestivo tornam-se determinantes para a sobrevivência larvar.

Neste contexto, os conhecimentos sobre a morfologia e fisiologia do sistema digestivo destas larvas são fundamentais de forma a aumentar a compreensão sobre factores responsáveis por mortalidade no meio natural. Estudos recentes, onde se cultivaram larvas de sardinha no laboratório, permitiram a descrição do processo de desenvolvimento do sistema digestivo de *S. pilchardus* (MIRANDA *et al.*, 1990; SILVA, 1990). Estes autores verificaram a existência de um canal alimentar longo e recto e que os órgãos associados, o fígado e o pâncreas, são estruturas alongadas e compactas. A parte inicial do tubo digestivo funciona como uma região de transporte, a zona intermédia como responsável pela digestão e absorção dos lípidos, enquanto que a parte final digere as proteínas por pinocitose. Numa situação de inanição, a maioria das estruturas do tubo digestivo degenera impossibilitando a larva de digerir o alimento, mesmo que este se torne *a posteriori* disponível, conduzindo-a irremediavelmente à morte.

Os estudos realizados em laboratório sobre os ictioplanctontes de *S. pilchardus* têm sido complementados com trabalhos no meio natural. De entre estes, destacam-se os efectuados a nível da distribuição vertical (FAGE, 1920), da delimitação temporal da postura (RAMALHO, 1927, 1929, 1933) e sobre ecologia da postura (RÉ, 1981, 1984, RÉ *et al.*, 1990).

A distribuição vertical dos ictioplanctontes de sardinha parece seguir um padrão semelhante ao dos clupeídeos, em geral, variando entre os 0 m e os 30 m de profundidade (FAGE, 1920; RÉ, 1984). Desta forma, ocupam a zona mais superficial da coluna de água, o que os torna especialmente sensíveis às variações de temperatura e turbulência.

No que se refere à distribuição espacial dos ictioplanctontes, as áreas de posturas restringem-se à plataforma continental, no entanto, com o desenrolar da época da reprodução, aproximam-se da costa. De facto, as zonas de maior concentração de ovos parecem localizar-se aquém da batimétrica dos 100 metros (AFONSO, 1991).

Em virtude de os adultos desta espécie serem reprodutores contínuos, e segundo RÉ *et al.* (1990), a postura da sardinha estende-se por praticamente todo o ano sendo mínima no Verão. No entanto, existem duas épocas principais de reprodução, uma na Primavera e outra no Outono-Inverno. Na região Noroeste da Península Ibérica a postura é mais intensa durante os meses de Outono e Inverno, enquanto que na costa Sul, nomeadamente na costa algarvia (RÉ *et al.*, 1990; CHÍCHARO & TEODÓSIO, 1991), tal como no Mar Cantábrico (SOLÀ *et al.*, 1990), ocorre principalmente durante os meses de Primavera.

Relativamente à distribuição espacial dos juvenis, estes encontram-se sobretudo entre o Cabo Ortegual e o Cabo da Roca (DIAS *et al.*, 1989). No entanto, segundo estes autores, por vezes, verifica-se uma forte concentração de juvenis na costa do Algarve, a qual pode atingir cerca de 70% do total estimado em toda a costa portuguesa.

Os juvenis e os adultos parecem ocorrer separados em termos espaciais, quer horizontalmente quer com a profundidade. Assim, os indivíduos com idades entre 1 e 5 anos ocorrem maioritariamente na parte Sul da área ocupada pelo manancial, por conseguinte em águas portuguesas, enquanto os indivíduos de 5 anos ou mais são encontrados sobretudo no Mar Cantábrico, no Norte de Espanha (PASTOR *et al.*, 1986; ROBLES *et al.*, 1992). Por outro lado, enquanto que os juvenis se distribuem entre a linha de costa e a batimétrica dos 50 metros, os adultos ocorrem preferencialmente em águas mais profundas, até à batimétrica dos 200 metros (DIAS *et al.*, 1989).

A relação entre os juvenis e os adultos apresenta um interesse considerável em espécies pelágicas de vida curta (SMITH, 1985). A importância do sucesso do recrutamento, no caso específico da sardinha, foi demonstrada por PESTANA (1989). De acordo com esta autora, a análise da evolução do manancial nesta espécie entre 1976 e 1989 evidenciou que, a curto prazo, a produção depende da nova classe anual. Também, segundo CUSHING (comunicação pessoal, 1996), as variações nas capturas de sardinha na Península Ibérica poderão depender de factores climáticos.

Na verdade, a maioria dos clupeídeos apresenta flutuações espaciais e temporais no recrutamento, por vezes acentuadas (TROADEC, 1978), cujas causas devem ser investigadas, já que anos consecutivos de maus recrutamentos podem, a curto prazo, provocar o colapso do manancial. No entanto, apesar da associação entre recrutamentos fracos e mortalidade larvar elevada não estar consolidada (SHARP, 1981), estudos aprofundados sobre as fases mais iniciais da vida dos peixes, contribuirão para o esclarecimento de toda esta problemática (SUTHERS, 1992). De entre estes, destacam-se estudos sobre os factores que determinam a sobrevivência larvar, como a inanição, a predação e as condições hidrológicas. Por conseguinte, e devido às potencialidades que a aplicação dos índices sobre o estado nutricional apresenta para a investigação das causas potenciais de mortalidade no meio natural, será de incentivar a sua utilização nesta área.

Nesta perspectiva, o primeiro objectivo do presente capítulo foi analisar as variações dos índices de condição bioquímicos determinados em larvas de *S. pilchardus*

recolhidas na costa Atlântica da Península Ibérica, concretamente na costa algarvia e costa Norte de Espanha (Figura 4.1). Paralelamente, visou-se também estudar os índices morfométricos na costa algarvia e comparar os resultados obtidos pelos métodos, morfométrico e bioquímico. Em terceiro lugar, pretendeu-se relacionar as variações no estado nutricional das larvas, na percentagem de inanição e na taxa de crescimento proteico com parâmetros abióticos e bióticos como a temperatura, a disponibilidade de presas e a densidade de potenciais predadores.

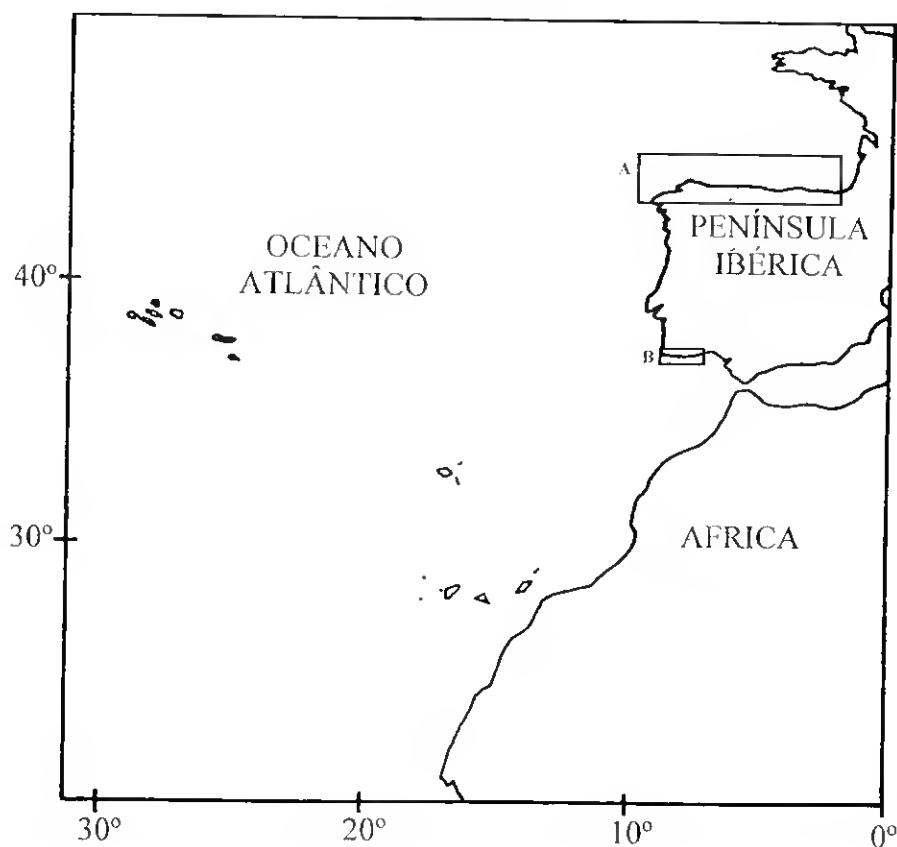


Figura 4.1- Localização das zonas amostradas: A - Norte de Espanha e B - Sul de Portugal (Algarve)

2- Material e Métodos

2.1- Costa portuguesa

De forma a detectar os períodos de maior abundância de larvas de sardinha, foram recolhidas amostras de zooplâncton mensalmente, entre Novembro 1991 e Outubro de 1992, na zona da barra de Faro-Olhão (Ria Formosa), sempre no período diurno e durante a preia-mar. Em Dezembro de 1991, realizou-se uma primeira amostragem mais intensa, em que a periodicidade de recolha, durante duas semanas, foi de três em três dias, de forma capturar larvas de sardinha provenientes do primeiro período de reprodução dessa espécie.

Entre Abril e Maio de 1992, e no âmbito de uma estadia do Navio de Investigação alemão "R.V.Poseidon" em águas portuguesas, foi possível estudar também de forma mais aprofundada a segunda época de postura de sardinha que ocorre na Primavera. Para tal, realizaram-se recolhas em quatro transectos perpendiculares à costa Sul do Algarve, nas zonas de Sagres, Albufeira, barra de Faro-Olhão e foz do Guadiana. Para além disso, efectuaram-se também recolhas paralelas à costa entre a zona de Portimão e de Tavira. Tentou-se, assim que a amostragem efectuada representasse, o melhor possível, a zona em estudo no período de tempo respectivo.

As recolhas na costa algarvia iniciaram-se no dia 29 de Abril de 1992 com a realização do transecto do Guadiana, no dia 2 de Maio efectuou-se o transecto da Ria Formosa e nos dias 4 e 6 de Maio procedeu-se à amostragem ao longo dos transectos de Albufeira e Sagres, respectivamente. Estes quatro primeiros transectos foram realizados perpendicularmente à costa e até uma profundidade que, em geral, não ultrapassou os 300 metros. Ao longo destes transectos foram estabelecidas, normalmente, seis estações de recolha, encontrando-se a primeira, o mais próximo possível da costa. As estações denominaram-se de G1, G2, G3, G4 e G5 no transecto do Guadiana, de R1, R2, R3, R4, R5 e R6 no transecto da Ria, de A1, A2, A3, A4, A5 e

A6 no transecto de Albufeira e de S1, S2, S3, S4, S5 e S6 no transecto de Sagres (Figura 4.2).

As recolhas paralelas à costa algarvia realizaram-se nos dias 3 e 5 de Maio e apenas pontualmente se ultrapassou a batimétrica dos 50 metros, tendo-se estabelecido 8 estações aproximadamente equidistantes, denominadas de TC1, TC2, TC3, TC4, TC5, TC6, TC7 e TC8 (Figura 4.2; Tabela IV.1). A recolha de amostras iniciou-se entre as 7.30 e as 8.00h (excepto no transecto do Guadiana, que teve início às 14.45h), prolongando-se, por vezes até cerca das 19.00h, mas sempre dentro do período diurno.

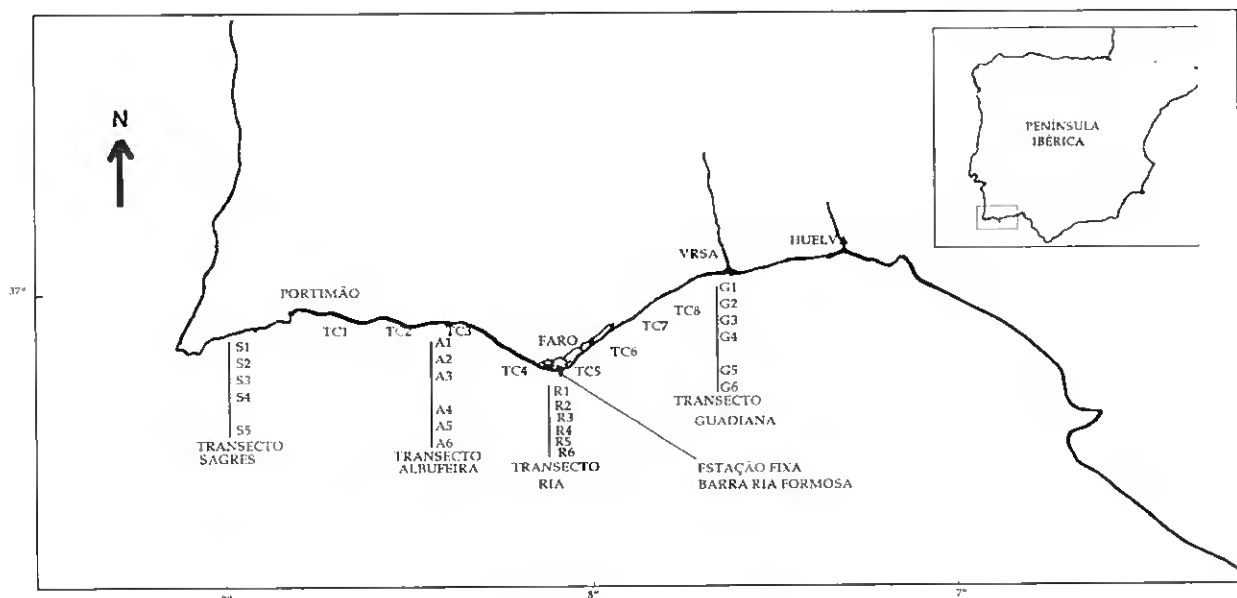


Figura 4.2- Mapa da costa algarvia com a localização das estações

Quanto à recolha de informação sobre parâmetros abióticos, na barra de Faro/Olhão (Ria Formosa) foi determinada apenas a temperatura superficial. No entanto, em cada estação, realizada a bordo do navio de investigação Poseidon, registou-se a direcção e a velocidade do vento e efectuaram-se perfis de temperatura de água com um CTD - "conductivity, temperature and depth sensor" (com excepção do transecto da Ria

Formosa devido a uma avaria na sonda). Obtiveram-se ainda imagens de satélite Meteosat4 durante os dias de duração do cruzeiro que mostram a temperatura à superfície não corrigida para a absorção atmosférica. No entanto, consideram-se válidos os valores das temperaturas relativas, uma vez que, durante o período em que decorreu o estudo, as condições de nebulosidade na costa algarvia foram escassas, constantes e homogéneas, pelo que a absorção atmosférica diferencial poderá ser desprezada.

Determinou-se também a turbulência da água, de acordo com MACKENZIE & LEGGETT (1991), que se aplica apenas dentro da camada de mistura:

$$\log e = -5.104Z^{0.079} + 0.748\log(W^3) + 0.945ENV$$

em que e é a taxa de dissipação da energia cinética da turbulência (m^2s^{-1}), Z é a profundidade da água (m); W é a velocidade do vento (m/s) e ENV é uma variável ambiental, que toma o valor 0 ou 1, consoante a turbulência é medida para além ou sobre a plataforma continental, respectivamente.

Recolhas de microplâncton

Em cada estação na costa algarvia amostrou-se a coluna de água até uma profundidade máxima de 200 metros, tendo-se efectuado arrastos verticais em estratos de 50 metros com uma rede Apstein de 17 cm de boca e malha de 55 μm . Recolheu-se, assim o microplâncton, ou seja os organismos com dimensões entre 60 e 500 μm (CUSHING, 1958). A velocidade de subida da rede foi, em média, de 0.3 m/s. Após a recolha, as amostras foram imediatamente fixadas em formaldeído tamponizado a 4% ou metanol a 90%. As abundâncias do microplâncton foram convertidas em densidades (n^0/m^3) recorrendo ao conhecimento do volume filtrado, o que se conseguiu através da área de boca da rede e da profundidade do arrasto vertical.

Recolhas de mesozooplâncton

Na barra de Faro-Olhão, a colheita dos mesozooplânctontes foi efectuada com uma rede de arrasto pelágico com malha de 500 μm , diâmetro de boca de 40 cm e comprimento de 160 cm, equipada com um copo colector Hydrobios mod. 438950 e com um fluxómetro digital da mesma marca mod. 438110. A malha da rede esteve obviamente associada às dimensões dos organismos que integram o mesozooplâncton e que são superiores a 500 μm (CUSHING, 1958). Realizaram-se arrastos horizontais, à profundidade de um metro e com uma duração de cinco minutos. Após o arrasto as amostras foram rapidamente observadas, tendo-se retirado as larvas de sardinha visíveis a olho nu, as quais foram colocadas em microtubos apropriados e conservadas em azoto líquido.

Durante as recolhas efectuadas na costa algarvia a bordo do navio "Poseidon" foi utilizada uma rede tipo Bongo com malha de 500 μm e 60 cm de diâmetro de boca e com um comprimento de 250 cm, equipada com copo colector e fluxómetro da marca e modelo acima referida. Neste caso realizaram-se sempre arrastos oblíquos entre a superfície e uma profundidade próxima do fundo. A velocidade de arrasto foi de 2 nós. Depois de finalizado o arrasto as larvas de sardinha foram processadas de forma idêntica à anteriormente descrita. A parte restante da amostra, provavelmente ainda com larvas de sardinha, com potenciais predadores invertebrados e restantes zooplânctontes, foi fixada com formaldeído tamponizado a 4%.

A realização de arrastos horizontais ou oblíquos implica a instalação de um fluxómetro, de forma a possibilitar a determinação da quantidade de água filtrada pela rede. De facto, sabendo a distância, em metros, que corresponde a uma rotação do fluxómetro (factor de calibração do fluxómetro - **calib**), o número de rotações do aparelho efectuadas num determinado percurso (**rot**) e área, em m^2 , da boca da rede (πr^2) foi possível calcular, o volume filtrado (**vol**), em m^3 através da fórmula seguinte:

$$\text{vol} = \text{rot} \times \text{calib} \times \pi r^2$$

Depois de conhecido o volume filtrado, a abundância dos zooplanctontes foi convertida em densidade, n^o/100m³.

Processamento laboratorial das amostras

A fracção da amostra de mesozooplâncton, fixada durante o cruzeiro na costa algarvia, foi analisada com uma lupa binocular WILD M7. Quando a abundância dos organismos o exigia, a amostra foi dividida em subamostras, recorrendo-se para tal ao fraccionador de Folsom. Em cada amostra e para cada *taxon* contou-se um número nunca inferior a 500 indivíduos, o que está de acordo com FRONTIER (1974), e referido também por GONÇALVES (1991). Enumerou-se e mediu-se com uma ocular micrométrica, as larvas de sardinha restantes, bem como os seus predadores potenciais (quetognatas, sifonóforos, hidromedusas, misidáceos, etc.). As amostras de microplâncton foram analisadas com um microscópio de inversão ZEISS e identificadas as presas potenciais das larvas de peixe. De acordo com os resultados da análise prévia do tubo digestivo e segundo outros estudos sobre o conteúdo intestinal na mesma espécie (LEBOUR, 1919; BLAXTER, 1969; CONWAY *et al.*, 1991) foram identificadas os seguintes grupos de presas: dinoflagelados, tintinídeos, ovos de invertebrados, *nauplii*, copepoditos, copépodes, velígeras de bivalves e velígeras de gastrópodes.

Relativamente à morfometria, as medições efectuadas nas larvas de *S. pilchardus* foram as seguintes (Figura 4.3):

- a) comprimento padrão - distância entre a extremidade da mandíbula e o fim da notocorda
- b) altura do corpo - profundidade do corpo da larva na zona de inserção das barbatanas peitorais (**P**)

- c) altura da cabeça - distância entre a zona mais elevada da cabeça e a parte posterior da mandíbula, medida perpendicularmente ao eixo antero-posterior (C)
- d) diâmetro do olho - medido segundo o maior diâmetro (O).

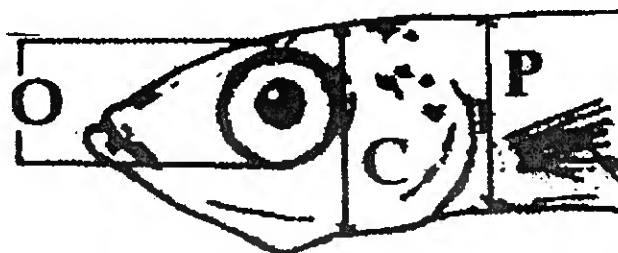


Figura 4.3 - Medições realizadas nas larvas de sardinha: diâmetro do olho (O), altura da cabeça (C) e altura do corpo (P).

As medições anteriormente referidas, foram utilizadas para calcular as relações seguintes: diâmetro do olho/altura da cabeça (O/C) e diâmetro do olho/altura do corpo (O/P).

As larvas em que se determinaram os índices morfométricos foram também processadas para a obtenção dos índices bioquímicos.

Em todas as larvas analisadas foi medido o comprimento padrão, enquanto que as restantes medições só se realizaram em larvas das amostras provenientes do cruzeiro realizado na costa algarvia.

A utilização do comprimento da larva em estudos deste tipo, tem uma limitação que resulta da contracção causada pela captura e fixação das larvas obtidas no meio natural (HAY, 1981). Este autor observou uma diminuição do comprimento do corpo da

larva de *Sardinops sagax*, que pode variar entre 5 e 43 %, dependendo da técnica de recolha e fixação utilizada. Este problema levou THEILACKER (1980b) a apresentar um factor de correcção, que visa converter o comprimento após a recolha e fixação no comprimento real da larva. Esta equação tem em consideração que a contracção diminui com o comprimento e aumenta com a duração do arrasto e tempo despendido até à fixação. O algoritmo que foi aplicado aos comprimentos padrão determinados neste trabalho expressa-se de acordo com a equação seguinte:

$$\ln y = \ln x_1 + 0.289e^{(-0.434x_1x_2)^{-0.68}}$$

onde, x_1 é o comprimento medido em mm, x_2 é o tempo de retenção na rede mais o tempo de processamento em minutos, e y é o comprimento real da larva em mm.

Para a determinação do peso seco as larvas foram inicialmente descongeladas e lavadas com uma solução aquosa de formato de amónia (9%). Em seguida, foram medidas à lupa com uma ocular micrométrica e colocadas em filtros de fibra de vidro Whatman GF/C com 21 mm de diâmetro. Estes filtros foram previamente marcados, sujeitos a 450 °C durante duas horas, lavados com a mesma solução de formato de amónia, secos numa estufa durante quatro horas e pesados, após passagem por um excicador com sílica gel activa, numa microbalança ($\approx 1\mu\text{g}$). Em cada filtro foi colocado apenas uma larva, de forma a poder-se determinar o seu peso individual. Os filtros com as larvas foram então colocados, durante aproximadamente vinte e quatro horas numa estufa a 60 °C, até se atingir um peso constante. O peso da larva foi calculado a partir da diferença entre o peso final e o peso inicial do filtro.

Devido à impossibilidade de determinação dos ácidos nucleicos após este processo, optou-se por retirar um grupo de larvas o mais variado possível relativamente às suas dimensões e sujeitá-las a este tratamento. Antes da análise bioquímica, as larvas foram medidas e o seu peso calculado, de forma individual, através da relação exponencial seguinte, previamente determinada entre o comprimento e o peso (Figura 4.4):

$$y = 0.000041x^{3.6472} \quad (r=0.997, \text{variância explicada}=99.12\%, n=120)$$

em que y é o peso seco em mg e x é o comprimento padrão em mm.

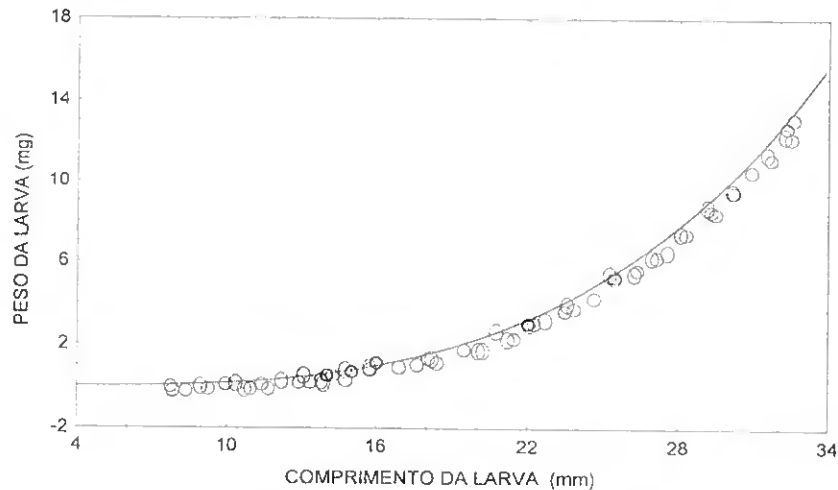


Figura 4.4 - Variação do peso seco em função do comprimento da larva de *S. pilchardus*.

Um estudo mais aprofundado do conteúdo digestivo das larvas de sardinha foi realizado apenas com uma amostra de 60 indivíduos provenientes da zona da barra da Ria Formosa, em Dezembro de 1991. Este estudo consistiu na separação, à lupa binocular, do tubo digestivo do resto do corpo, após o que se procedeu à sua abertura com agulhas muito finas. O conteúdo do tubo digestivo foi observado ao microscópio e identificado em grandes grupos taxonómicos.

Para as larvas recolhidas durante o cruzeiro de Maio 1992 determinou-se apenas a percentagem de repleção do tubo digestivo, ou incidência alimentar. Esta foi definida como a percentagem de larvas que continham pelo menos um item alimentar, relativamente ao total de estados larvares observados na amostra (RÉ, 1984; CONWAY *et al.*, 1991).

No que respeita à análise bioquímica, os ácidos nucleicos determinaram-se segundo a técnica fluorimétrica descrita no segundo capítulo, cujo procedimento se encontra resumido na Figura 2.2 (pág. 19). As proteínas insolúveis extraídas num passo

intermédio do procedimento acima indicado, foram analisadas segundo a protocolo resumido na Figura 2.5 (pág. 24), do mesmo capítulo. A homogeneização das larvas, provenientes da amostragem realizada em Dezembro de 1991, foi efectuada com um homogeneizador mecânico, Ultra-turrax modelo T25, equipado com eixo gerador de 8 mm de diâmetro e as restantes larvas com um desintegrador ultrasónico, Cole-parmer série 4710 com sonda de 3 mm de diâmetro. A leitura da fluorescência para determinação da concentração em ácidos nucleicos foi realizada num espectrofluorímetro HITACHI modelo 650-10. A leitura das absorvâncias para determinação da concentração em proteínas insolúveis foi efectuada através de espectrofotómetro HITACHI modelo U-1100.

2.2-Costa espanhola

As recolhas de larvas de *S. pilchardus* na costa espanhola foram efectuadas no âmbito do projecto de cooperação europeu SARP (Sardine Anchovy Recruitment Project), financiado pela União Europeia, contrato número MA 1.96, tendo como participantes a Grã-Bretanha, a Alemanha, a Espanha e Portugal. Tratou-se de um estudo integrado que visou analisar os processos que controlam, sobretudo durante a fase larvar dos clupeídeos, os níveis de recrutamento.

As estações de recolha, distribuídas ao longo de 22 transectos, situaram-se na zona Norte - Noroeste da costa espanhola, que para efeitos de amostragem foi dividida em três áreas: área 1 - entre San Sebastian e Gijon, área 2 - entre Gijon e o Cabo Ortegal e área 3 - entre o Cabo Ortegal e o Cabo Finisterra (Figuras 4.5 a 4.8). Entre 17 de Abril e 12 Maio de 1991 realizou-se uma campanha a bordo do navio "Cornide de Saavedra". Posteriormente, em 1992, a amostragem processou-se de forma mais intensiva e prolongou-se durante os meses de Março, Abril, Maio e Junho. As recolhas, com o mesmo navio que no ano anterior, foram efectuadas entre 6 e 20 de Março e entre 2 e 11 de Abril. Entre 4 e 24 de Maio a amostragem decorreu a bordo do navio

“R.V. Valdivia” e entre 23 de Maio e 10 de Junho, no navio “R. R. S. Challenger”. Desta forma, enquanto que no ano de 1991 apenas se analisaram amostras relativas ao mês de Maio, a amostragem em 1992 estendeu-se por vários meses, nomeadamente Março, Abril, Maio e Junho (Tabela IV.1).

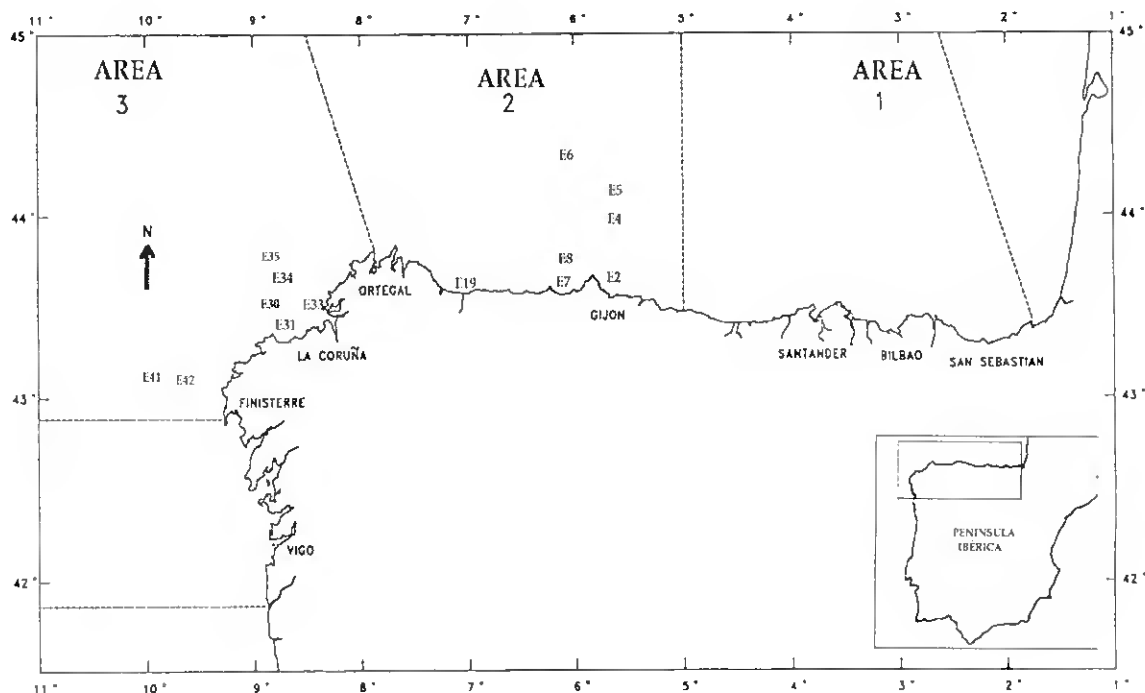


Figura 4.5 - Estações amostradas na costa espanhola em 1991.

Relativamente aos parâmetros abióticos, na costa espanhola foram efectuadas determinações de temperatura à profundidade de 5 metros, com um sensor tipo CTD (“conductivity, temperature and depth sensor”).

Tabela IV.1- Distribuição das estações amostradas na costa espanhola

	ABRIL/MAIO 91	MARÇO 92	ABRIL 92	MAIO 92	JUNHO 92
ÁREA 1		E5,E19	E6,E8,E31, E34	E2,E4,E7,E9,E10, E11,E12,E13 ,E18,E23,E26	E5,E21,E23,E24,
ÁREA 2	E2,E4,E5, E6,E8,E19	E47	E42	E36,E37,E40,E41, E43,E46,E47,E48, E49,E50,E51,E52, E55,E56,E57,E60	E31,E32,E34,E50
ÁREA 3	E30,E31,E33 E35,E41,E4			E71,E72,E74,E79, E80,E84,E85	E62

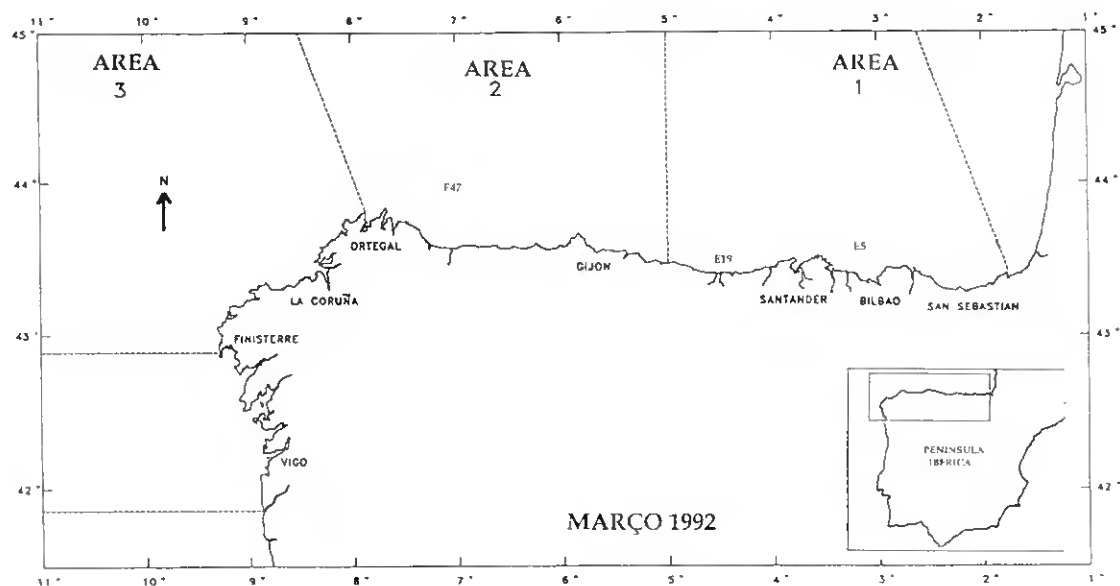


Figura 4.6- Estações amostradas na costa espanhola em Março de 1992.

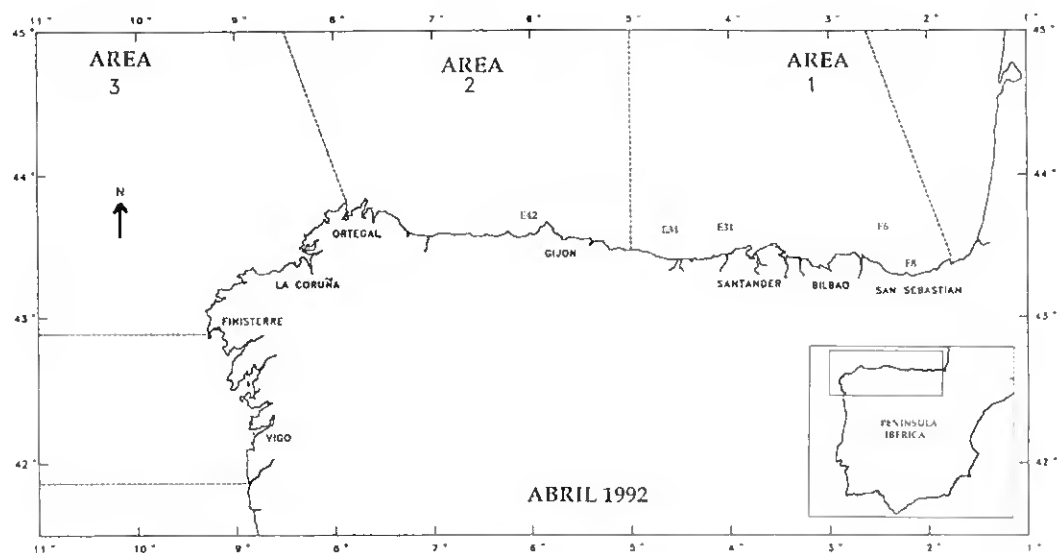


Figura 4.7- Estações amostradas na costa espanhola em Abril de 1992.

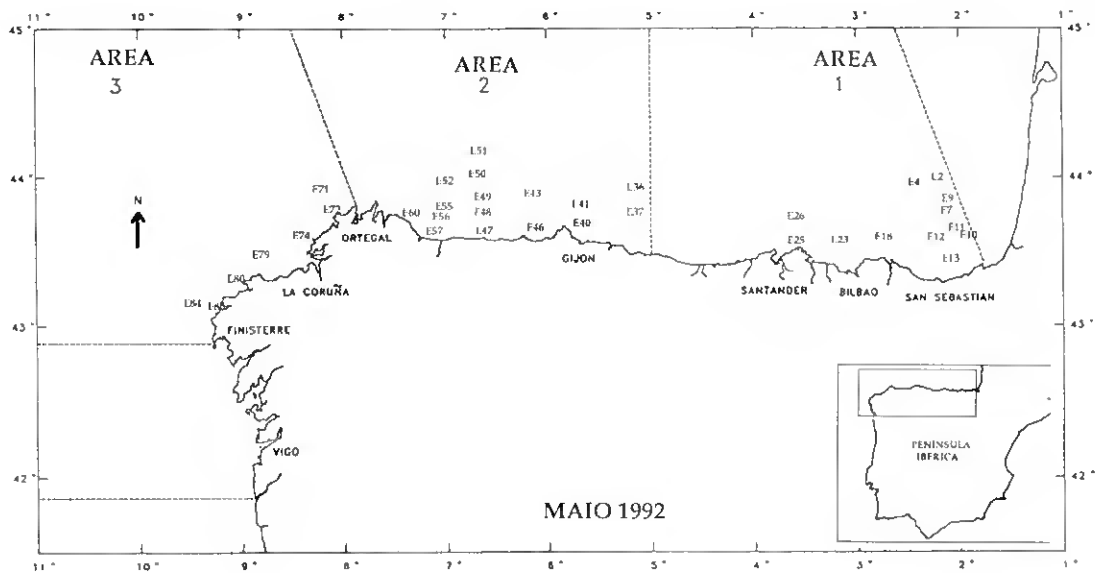


Figura 4.8- Estações amostradas na costa espanhola em Maio de 1992.

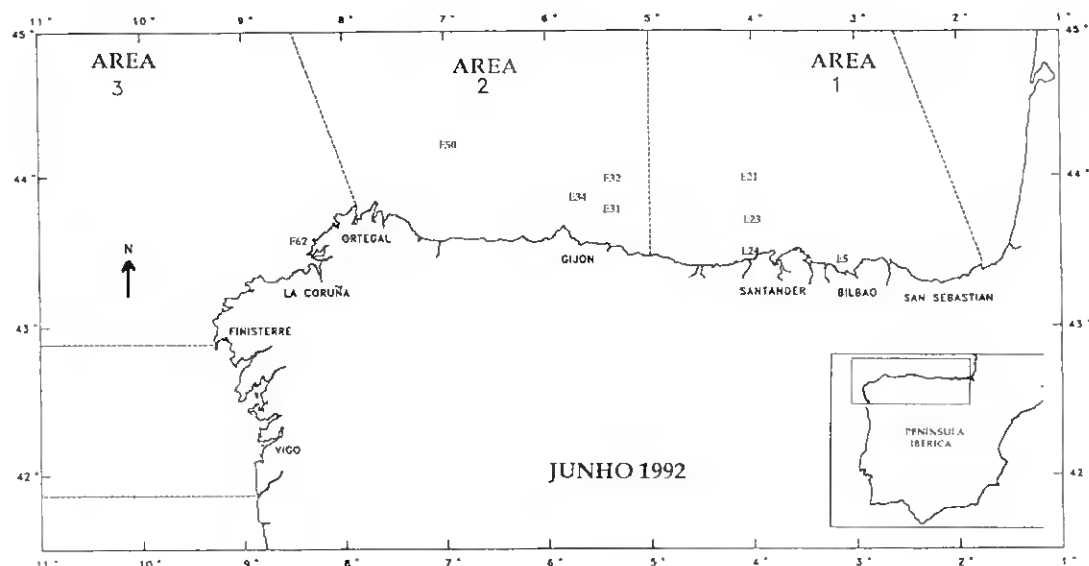


Figura 4.9 - Estações amostradas na costa espanhola em Junho de 1992.

Para a recolha de larvas de peixe realizaram-se arrastos oblíquos duplos, com redes tipo Bongo, desde a superfície até normalmente 5 m do fundo. Foram utilizadas duas redes semelhantes, uma com uma malhagem de 200 μ m e uma boca de 50 cm e outra com uma malhagem de 280 μ m e uma boca de 40 cm, respectivamente no ano de 1992 e de 1991. A velocidade de arrasto situou-se entre os 2 e os 3 nós. O processamento a bordo consistiu na observação rápida da recolha, de forma a retirar as larvas de sardinha visíveis a olho nu, na sua colocação em microtubos e congelação imediata em azoto líquido.

Após o descongelamento, antes de se proceder à análise bioquímica, as larvas de sardinha provenientes das recolhas de mesozooplâncton, foram rapidamente medidas à lupa binocular WILD M7 equipada com ocular micrométrica, e observado o seu conteúdo estomacal apenas externamente.

O processo de estudo da incidência alimentar, aplicado às larvas de sardinha provenientes da costa espanhola, resumiu-se à observação dos indivíduos à lupa

binocular com luz transmitida, tendo-se avaliado por este processo o número de estados larvares que continham alimento no tubo digestivo.

A análise dos ácidos nucleicos e proteínas realizou-se segundo a técnica fluorimétrica descrita no Capítulo II, cujo procedimento se encontra resumido nas Figuras 2.2 e 2.5. A homogeneização das larvas foi efectuada com um desintegrador ultra-sónico, Coleparmer série 4710 com sonda de 3 mm de diâmetro. A leitura da fluorescência para determinação da concentração em ácidos nucleicos foi realizada num espectrofluorímetro HITACHI modelo 650-10, enquanto que a leitura das absorvâncias para determinação da concentração em proteínas insolúveis foi concretizada através de um espectrofotómetro HITACHI modelo U-1100. O peso seco determinou-se de forma similar à descrita para a costa algarvia.

De forma a facilitar a compreensão da amostragem realizada e dos parâmetros analisados nas zonas estudadas optou-se pela apresentação de um resumo na Tabela IV.2.

2.3- Estimativa da taxa instantânea de crescimento proteico

Em 1984, BUCKLEY apresentou um modelo para estimar a taxa instantânea de crescimento proteico. A variedade de espécies de peixe (oito espécies) incluída neste modelo e a similaridade de resultados entre as espécies sugere, segundo o seu autor, que o mesmo é largamente aplicável aos peixes marinhos da zona temperada. A taxa de crescimento proteico (**G_{pi}**) em larvas de peixe, expressa-se em percentagem por dia, a partir da razão **RNA/DNA** e da temperatura média (**T**), em graus centígrados da coluna de água (supondo a inexistência de estratificação) na data da captura. Este modelo traduz-se pela equação seguinte:

$$G_{pi} = 0.93T + 4.75RNA / DNA - 18.18$$

Tabela IV.2 - Descrição resumida dos amostragem efectuada e dos parâmetros analisados.

AMOSTRAGEM							
PAÍS	PORTUGAL			ESPANHA			
ZONAS	costa Sul-Algarve			costa Norte-Noroeste			
ANOS	1991, 1992			1991, 1992			
MESES	Dezembro 91, Abril e Maio 92			Abril/Maio91; Março, Abril, Maio, Junho 92			
NÚMERO DE LARVAS ANALISADAS POR MÊS	96	414	123	30	60	208	84
PARÂMETROS							
	PORTUGAL			ESPANHA			
ABIÓTICOS	temperatura, velocidade do vento, turbulência da água			temperatura e salinidade			
BIÓTICOS	comprimento, índices morfométricos, índices bioquímicos, conteúdo estomacal potenciais presas e predadores			comprimento, conteúdo estomacal, índices bioquímicos			

A temperatura da água e a razão RNA/DNA explicaram 92% da variabilidade na taxa instantânea de crescimento proteico nas larvas estudadas, pelo autor acima citado. Este modelo abrange todo o leque possível, tanto de situações alimentares, desde a inanição ao excesso de presas, bem como de temperaturas, desde 2 °C aos 20 °C.

Teoricamente, o valor da razão RNA/DNA a que não corresponde crescimento proteico líquido numa larva de peixe, a determinada temperatura, denomina-se “nível crítico”.

A determinação do “nível crítico” da razão RNA/DNA pode ser obtido, indirectamente, manipulando a equação acima apresentada (ROBINSON & WARE, 1988). Para tal coloca-se $G_{pi}=0$ e reorganiza-se a equação de forma a obter o “nível crítico” (R_{crit}):

$$RNA / DNA = R_{crit} = (18.18 - 0.93T) / 4.75$$

2.4- Tratamento dos dados

O tratamento dos resultados obtidos foi efectuado recorrendo ao programa Statistica, versão 4.5, para Windows. A notação, utilizada nesta tese, para os coeficientes estatísticos e testes segue a mesma da maioria dos manuais de estatística, sendo n o número de observações, \bar{x} a média, s o desvio padrão, V_x coeficiente de variabilidade, r o coeficiente de correlação simples de Pearson ou ordinal de Spearman, r^2 o coeficiente de determinação, R o coeficiente de correlação linear múltipla, R^2 o coeficiente de determinação múltiplo, b o coeficiente de regressão num modelo de regressão simples, ou o coeficiente de regressão parcial estandardizado num modelo de regressão múltipla, p a probabilidade de se verificar uma determinada hipótese nula (H_0), cuja rejeição foi efectuada sempre que $p \leq 0.05$, H a estatística do teste de Kruskal-Wallis, F a estatística de teste da análise de variância, SS a soma de quadrados na análise de variância, MS o quadrado médio e d.f. o número de graus de liberdade. Os valores das médias dos parâmetros analisados foram apresentados com os respectivos desvios padrão entre parêntesis antecedidos do sinal \pm (ex. $\bar{x} (\pm s)$).

Dentro de cada grupo de amostras, a distribuição das variáveis foi avaliada utilizando o teste de Kolmogorof-Smirnov, que é bastante potente quando as frequências esperadas são reduzidas ou mesmo quando o número de observações é baixo (ZAR, 1984). Se as variáveis em questão não diferiram significativamente de uma distribuição normal, utilizaram-se estatísticas paramétricas, caso contrário, recorreu-se a estatísticas não paramétricas. O nível mínimo de significância (α) adoptado foi de 0.05.

Análise de variância (ANOVA)

Para comparação dos vários parâmetros analisados entre estações e transectos realizados na costa algarvia (Guadiana, Ria, Albufeira e Sagres) ou entre as áreas estudadas na costa espanhola (áreas 1, 2 e 3), recorreu-se a uma ANOVA simples com uma ou duas entradas e efeitos fixos, no caso de distribuições normais e variâncias

homogêneas (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). Quando estas condições não se verificaram, utilizou-se uma ANOVA não paramétrica, concretamente o teste de Kruskal-Wallis (BHATTACHARYA & JOHNSON, 1977). A hipótese nula (H_0) testada pressupôs a não existência de diferenças significativas entre zonas analisadas a nível dos parâmetros estudados. Da aplicação da ANOVA obteve-se a informação sobre a existência, ou não, de diferenças significativas entre os transectos e áreas estudados. No entanto, para determinar quais os transectos ou áreas que diferiam significativamente entre si aplicou-se o teste *Post Hoc* de Tukey. Estes testes foram desenvolvidos para se aplicarem depois de uma ANOVA com um valor de F significativo. De entre os testes disponíveis o de Tukey é o mais aconselhado, uma vez que apenas detecta diferenças que realmente existem (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1987).

Coeficiente de correlação

Para analisar as variações dos parâmetros abióticos e bióticos optou-se pela utilização do coeficiente de correlação de Spearman, já que coeficiente de Pearson assume a existência de distribuições normais e relações lineares entre parâmetros, o que nem sempre se verificou. No entanto, os resultados obtidos por estes dois coeficientes são iguais quando as distribuições são normais (DAWSON-SAUNDERS & TRAPP, 1987). A hipótese nula (H_0), relativa à diferença ou não do coeficiente de correlação de zero, foi testada para cada correlação de forma individualizada. No entanto, se se considerar um nível de significância de 0.05 numa matriz de correlações, uma em vinte será sempre significativa devido ao acaso. Assim, de acordo com CUSHING (comunicação pessoal, 1996), ao nível de significância de cada correlação na matriz de correlações foi aplicado a correcção de Bonferroni (SNEDECOR & COCHRAN, 1989):

$$\alpha/n'$$

em que α é o nível de significância escolhido e n' o número de pares de correlações na matriz.

Análise de regressão

O coeficiente de correlação mede apenas a intensidade de associação entre duas variáveis, enquanto que os modelos de regressão estabelecem uma relação de dependência entre a(s) variável ou variáveis, de modo a que se possa prever o valor de uma sabendo o valor da(s) outra(s) (SOKAL & ROHLF, 1981; ZAR, 1984). Em alguns dos casos analisados, os conhecimentos previamente adquiridos por trabalhos laboratoriais e no meio marinho, através de outros autores, permitiram teorizar a existência de uma relação de causa-efeito, com base nos valores significativos das correlações. Nestes casos, utilizou-se a regressão simples e múltipla, linear e não linear que constitui a expressão analítica do modelo empírico que relaciona variáveis independentes (preditores) e uma variável dependente (BHATTACHARYYA & JOHNSON, 1977).

A avaliação do ajustamento de determinado modelo de regressão aos dados foi efectuada sobretudo com base no coeficiente de determinação e na análise dos resíduos. A presença de uma forte heterogeneidade na dispersão dos resíduos é indicativa de um mau ajustamento do modelo e da eventual não linearidade da relação (ZAR, 1984).

Quando a análise de resíduos permitiu pressupor a existência de relação não linear entre variáveis, recorreu-se à regressão não linear. Esta caracteriza-se pela adição de termos quadráticos, ou elevados a qualquer outro expoente à equação inicial.

Este tipo de modelo denomina-se modelo de regressão polinomial de y com x . O grau mais elevado de x que ocorrer no polinómio indica o grau ou ordem da regressão polinomial.

Os valores de b num modelo de regressão múltipla são denominados coeficientes de regressão parciais. Estes indicam a relação entre a variável dependente e a variável independente, quando se mantém constantes as outras variáveis na equação. No entanto, os valores de b não indicam directamente a importância relativa de cada

variável independente na explicação da variação da variável dependente. Para este efeito utilizam-se os coeficientes de correlação parcial, cujo quadrado é descrito como uma medida da parte da variação da variável dependente, não explicada pelas variáveis independentes já incluídas na equação, que vai ser explicada pela adição da nova variável independente (SILVA, 1993).

Através da regressão múltipla determinaram-se quais os parâmetros que contribuíram significativamente para o modelo, e qual a percentagem de variação explicada por cada um deles, independentemente ou em conjunto. Esta percentagem é calculada pelo coeficiente de determinação (R^2) tendo sido utilizado o coeficiente de determinação ajustado sempre que o número de preditores envolvidos foi superior a um. O coeficiente de determinação ajustado é obtido pela ponderação do coeficiente de determinação em função do número de preditores da equação e do número de observações (SOKAL & ROHLF, 1981).

Análise multivariada

A interpretação dos resultados pode ser simplificada pela utilização de técnicas de análise multivariada, que facilitam a compreensão da estrutura de uma matriz de dados, revelando as relações existentes entre colunas (neste estudo - estações) e linhas (neste estudo - índices de condição, comprimento larvar, parâmetros abióticos, como a temperatura, a velocidade do vento, a turbulência, e parâmetros bióticos, como as densidades de presas e predadores potenciais).

A análise multivariada é um conjunto de técnicas matemáticas que pode ser dividida em dois grandes grupos: a ordenação e a classificação (PIELOU, 1984). A classificação, também denominada de análise hierárquica, baseia-se sumariamente no agrupamento em classes de objectos semelhantes. Estes métodos de análise são utilizados quando não existem *a priori* hipóteses sobre a estrutura dos dados e o estudo se encontra ainda numa fase exploratória (TABACHNICK & FIDELL, 1989). No entanto, convém

salientar que não se tratam de grupos significativamente diferentes, pois estas técnicas não incorporam a aplicação de testes estatísticos de significância.

Os dados foram sempre padronizados antes da aplicação da análise multivariada.

O coeficiente de associação utilizado para a classificação foi a distância euclidiana:

$$d(j,k) = \sqrt{\sum_i (j_i - k_i)^2}$$

onde $d(j,k)$ é a distância entre os pontos j e k num espaço multidimensional. Optou-se pelos coeficientes de distância porque são aplicáveis a dados quantitativos (LEGENBRE & LEGENBRE, 1979).

A medição da distância entre 2 objectos (estações) é fácil de efectuar, através da aplicação directa da fórmula de cálculo da distância euclidiana. No entanto, quando é necessário calcular a distância entre um conjunto de estações já aglomeradas e uma outra estação, ou conjunto de estações, tem de se aplicar um dos vários métodos de aglomeração existentes. Nestes casos, o método escolhido foi método de Ward ou método da variância mínima, o qual utiliza uma aproximação da análise de variância para avaliar a distância entre grupos. Baseia-se no princípio simples de em cada fase de agrupamento a variância dentro do grupo deve ser minimizada relativamente à variância entre grupos (LUDWIG & REYNOLDS, 1988).

O segundo tipo de métodos de análise multivariada que se referiu, ou seja a ordenação, mais concretamente a análise por componentes principais, também se aplicou aos dados. As principais utilizações destas técnicas são a redução do número de variáveis e a detecção da estrutura das relações entre elas (TABACHNICK & FIDELL, 1989). No presente estudo, a análise por componentes principais foi basicamente utilizada com o intuito de reduzir o número de variáveis em estudo, ou seja, de efectuar

uma ligeira triagem dos índices de condição estudados, com base na forma como se relacionavam entre si e também com os parâmetros bióticos e abióticos. Este tipo de análise foi utilizada previamente à aplicação da análise de regressão. De facto, a análise por componentes principais permite reduzir o número de variáveis em estudo e dirigir a atenção para aquelas com uma maior importância. A utilização posterior da análise de regressão visou uma melhor interpretação desses resultados, uma vez que permite especificar quais os parâmetros que contribuíram significativamente para uma determinada variação (por exemplo da condição larvar) e que percentagem de variância explicaram.

A análise por componentes principais é uma técnica que tem por finalidade permitir a representação de uma nuvem de pontos a n dimensões num sistema de eixos a duas ou três dimensões, perdendo o mínimo de informação. A melhor forma de projectar esses pontos num espaço bidimensional é rodar o sistema de eixos de referência de modo a que o eixo dos XX corte a nuvem de pontos pelo seu comprimento maior. O eixo dos XX denomina-se então primeiro eixo principal, pois é o que contém maior variância da nuvem de pontos. O segundo eixo principal é perpendicular ao primeiro e está orientado para captar a segunda maior variância, e assim sucessivamente (PIELOU, 1984). As componentes principais são os vectores associados a cada eixo principal. O processo baseia-se na extracção de valores e vectores próprios. Os valores próprios representam a quantidade de variância associada a cada vector próprio, e estes definem os eixos principais ortogonais. A análise da percentagem de variância associada a cada vector próprio, definida pelo correspondente valor próprio, representa a contribuição individual para a variabilidade global do sistema (LEGENDRE & LEGENDRE, 1979).

A par da análise das coordenadas de cada índice no espaço reduzido, isto é a visualização dos pontos nos gráficos a duas dimensões, a interpretação dos dados foi acompanhada pela análise de parâmetros, como os valores próprios, percentagem de variância explicada e variância acumulada.

3-Resultados

3.1-Costa portuguesa

3.1.1- Parâmetros abióticos

Temperatura

Os valores da temperatura da água à superfície na barra de Faro-Olhão da Ria Formosa, no período que decorreu entre Novembro de 1991 e Outubro de 1992, variaram entre 14.8°C em Fevereiro e 22°C em Julho. Relativamente à temperatura do ar, esta apresentou um mínimo de 10.8°C em Janeiro e um máximo em 30.4°C em Julho. A variação da temperatura da água superficial reflectiu, embora de forma atenuada, a temperatura do ar, com o comportamento típico de uma zona temperada com um mínimo invernal e um máximo estival, sendo a amplitude térmica do ar superior relativamente à da água (Figura 4.10).

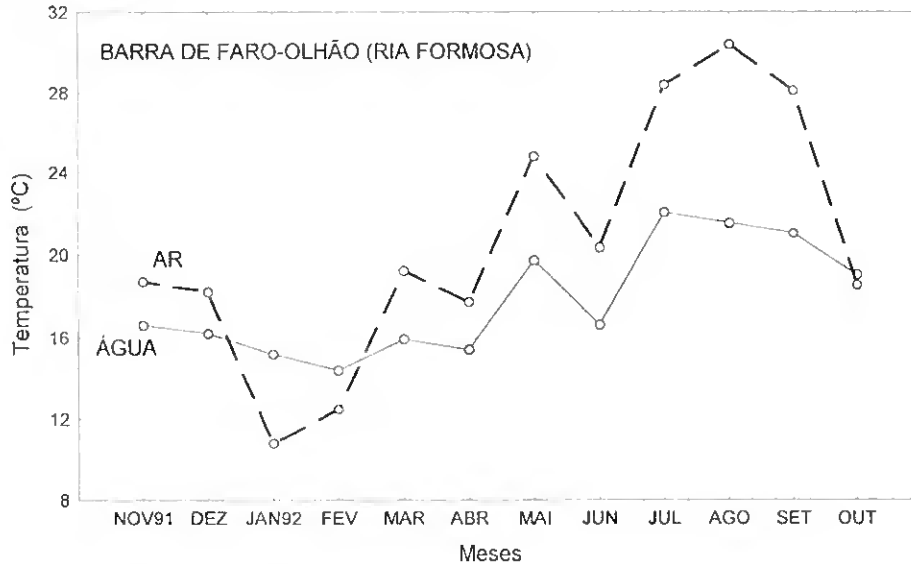


Figura 4.10- Variação da temperatura da água superficial e do ar na zona da Barra de Faro-Olhão ao longo dos meses de recolha.

Relativamente à temperatura da água durante o cruzeiro realizado na costa algarvia, ou seja, entre Abril e Maio de 1992, os valores variaram entre um mínimo de 14.4°C e

um máximo de 17.4°C. No que respeita apenas à temperatura superficial, verificou-se a existência de diferenças significativas entre transectos ($p < 0.003$). A média do transecto do Guadiana foi a mais elevada com 16.6°C (± 0.7), enquanto que nos transectos de Albufeira e de Sagres as médias foram de 16°C (± 0.2) e 15.3°C (± 1.2), respectivamente (Figura 4.11). No entanto, em profundidade esta diferença apenas é notória nas estações costeiras, verificando-se uma maior igualdade nos valores das estações mais oceânicas (Figura 4.12). Durante o período referido, a temperatura do ar variou entre 18.1°C e 21.6°C.

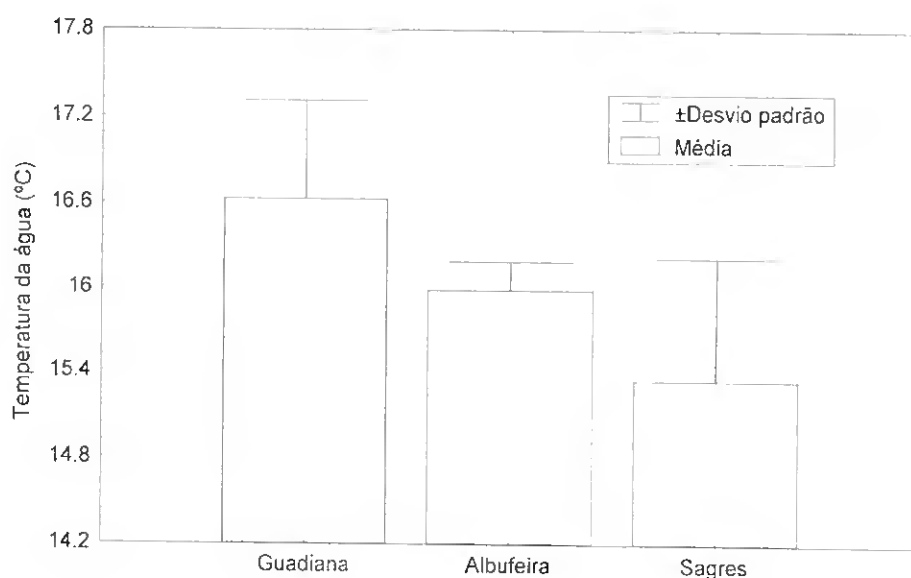


Figura 4.11 - Comparação da temperatura da água nos diferentes transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Por outro lado, e relativamente à distribuição da temperatura em profundidade, verificou-se a inexistência de uma termoclina, ou seja, um gradiente térmico de 0.1°C/m, em Sagres e no Guadiana, excepto na estação G5 (Figura 4.12). Contudo as estações mais próximas da costa em Albufeira registaram-se descontinuidades térmicas da ordem de grandeza referida.

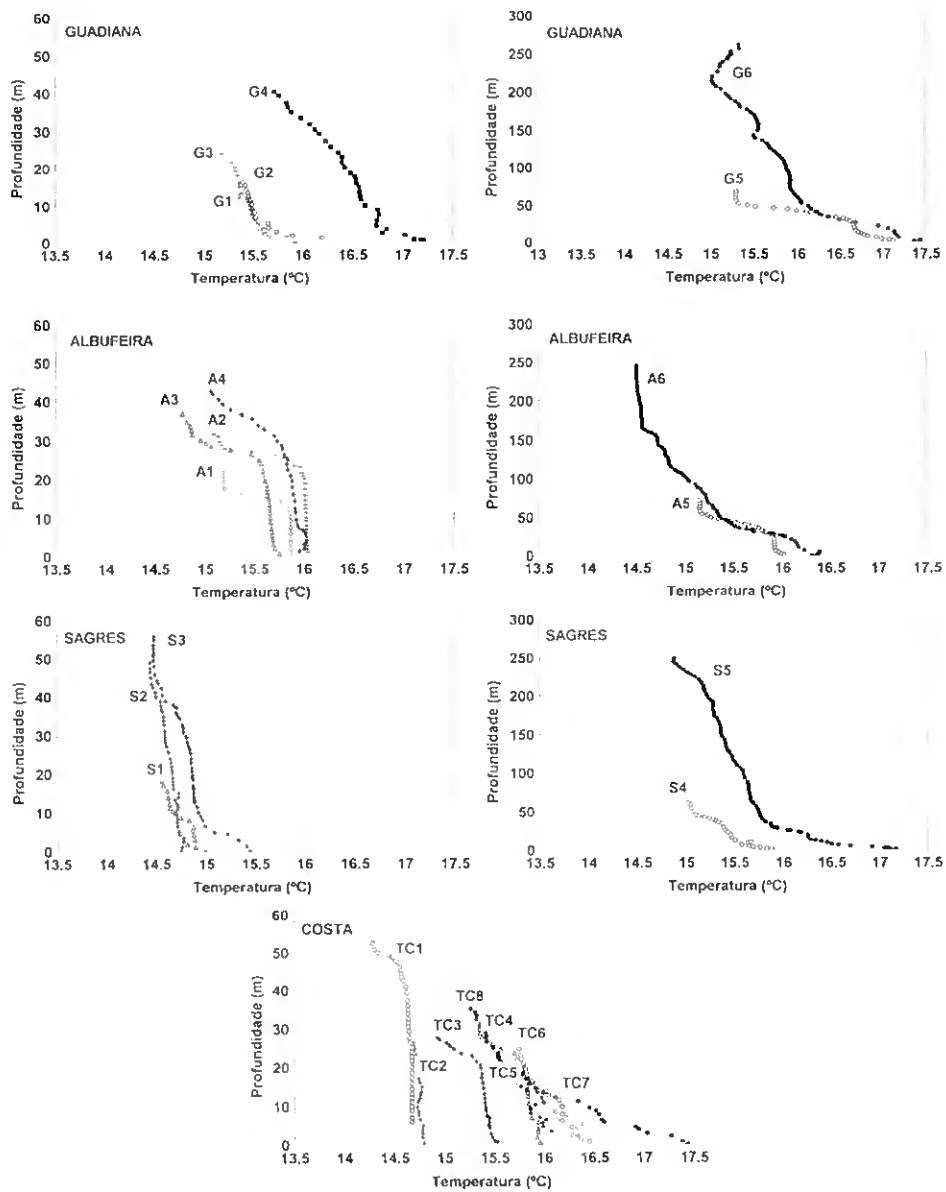


Figura 4.12- Variação da temperatura da água com a profundidade nas estações dos diferentes transectos, Guadiana, Albufeira e Sagres e nas estações realizadas paralelamente à costa. As estações mais costeiras encontram-se associadas nos gráficos do lado esquerdo, enquanto que as mais oceânicas se encontram no lado direito.

Em termos espaciais, a temperatura superficial aumentou com a distância à costa, bem como de Oeste para Este (Figura 4.13), ou seja, com o afastamento da costa ocidental mais exposta e onde o afloramento se fez sentir de forma mais intensa. De

facto, nas estações paralelas à costa, a temperatura decresceu com a proximidade da zona de Sagres. A utilização das imagens obtidas pelo satélite Meteosat4 permitiu uma análise mais pormenorizada da variação da temperatura superficial. Desta forma, pode constatar-se que, no primeiro dia de recolha (29-4-92), existia uma massa de água relativamente fria, situada junto à costa ocidental, que estendia a sua influência até à zona mais Oeste da costa algarvia (zona de Lagos) (Figura 4.14a).

A referida massa de água, ao afastar-se para o largo, parece envolver uma massa de água mais quente, que se encontrava junto à restante parte da costa Sul, nomeadamente para Este de Lagos (Figura 4.14a).

Nos dias seguintes, e até ao dia 5-5-92, a massa de água fria que influenciava o barlavento algarvio, deslocou-se progressivamente para Sudeste, misturando-se com a massa de água mais quente, pelo que deixou de se observar uma diferença nítida entre as características térmicas da água das duas zonas (Figuras 4.14b e 4.14c).

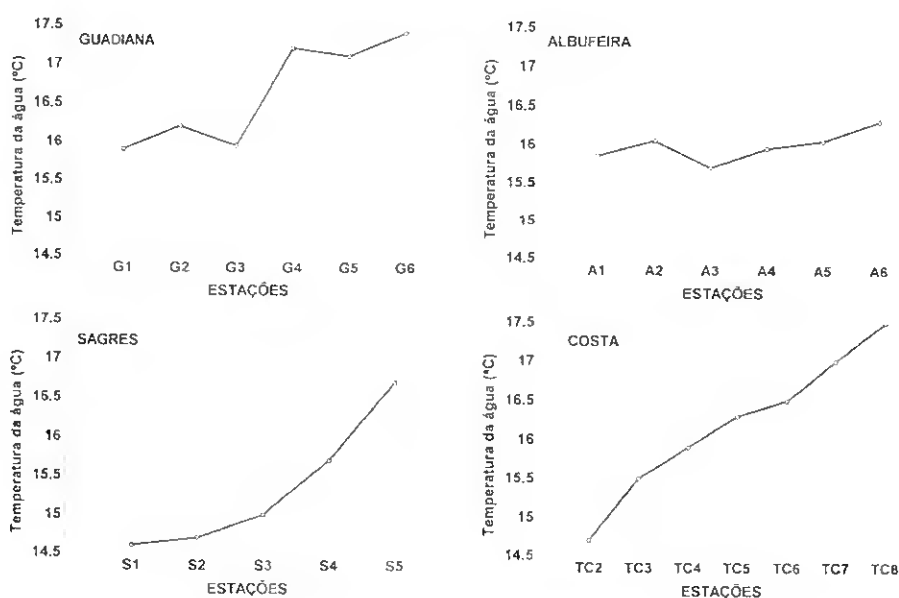


Figura 4.13 - Variação da temperatura superficial da água ao longo das estações efectuadas nos transectos do Guadiana, Albufeira e Sagres e nas estações efectuadas paralelamente à costa.

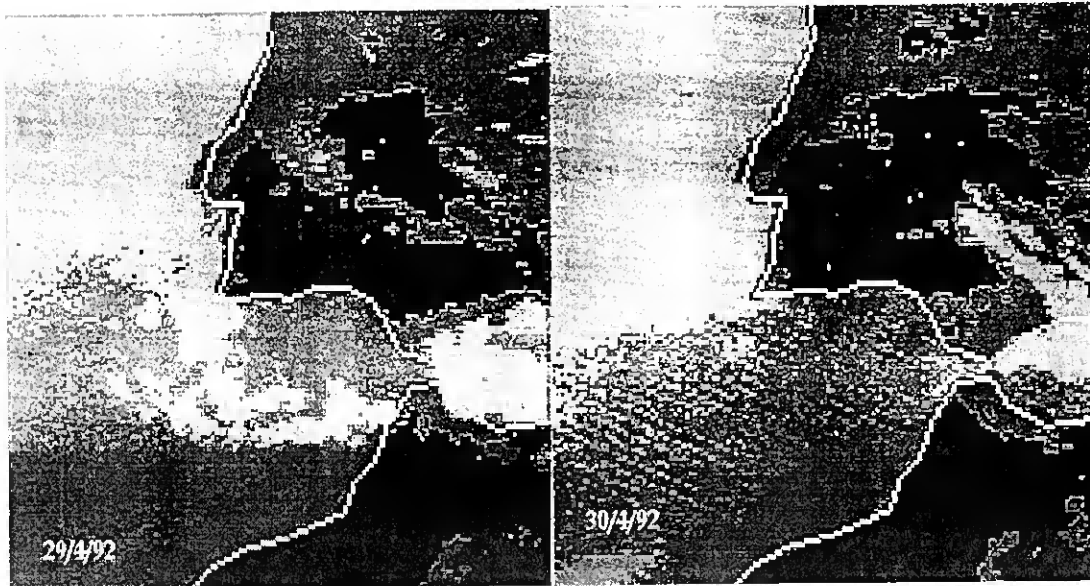


Figura 4.14a.- Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona Sul da Península Ibérica, nos dias 29 e 30 de Abril de 1992. A coloração mais escura corresponde aos valores de temperatura da água mais elevados.

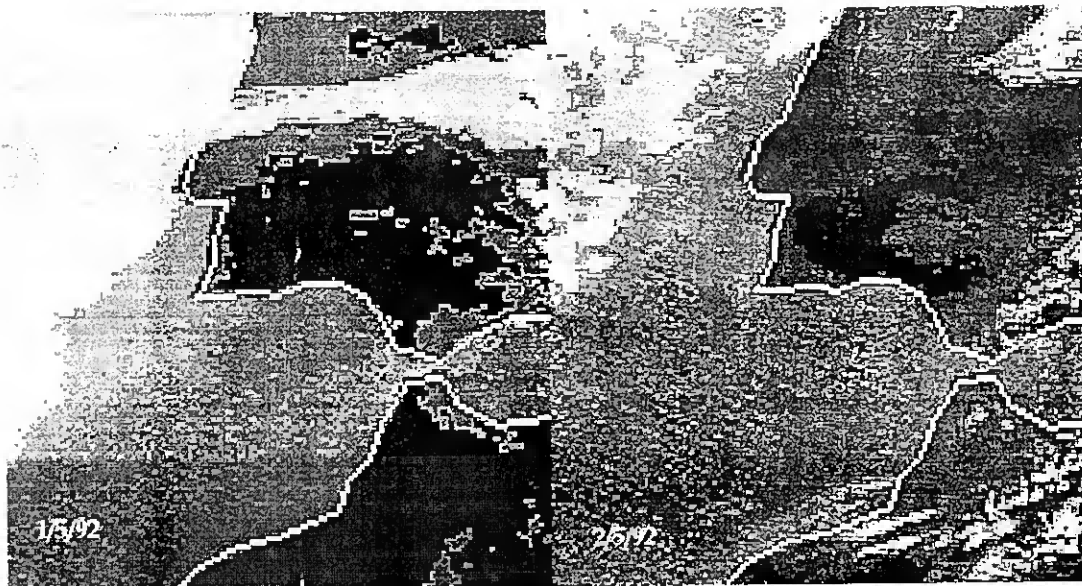


Figura 4.14b.- Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona Sul da Península Ibérica, nos dias 1 e 2 de Maio de 1992. A coloração mais escura corresponde aos valores de temperatura da água mais elevados.

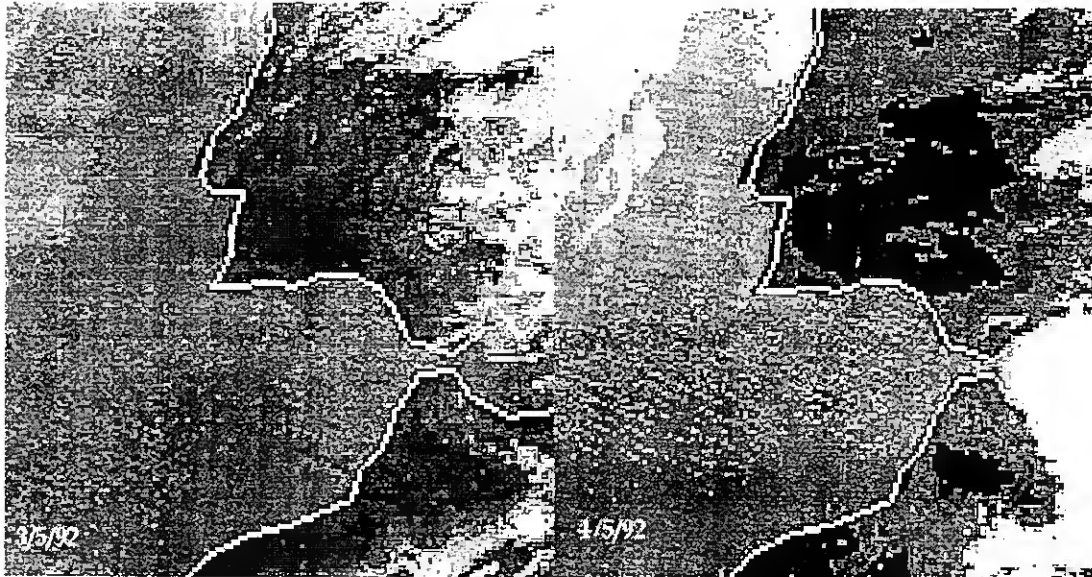


Figura 4.14c.- Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona Sul da Península Ibérica, nos dias 3 e 4 de Maio de 1992. A coloração mais escura corresponde aos valores de temperatura da água mais elevados.

Velocidade e rumo do vento

O regime de ventos caracterizou-se, durante o transecto do Guadiana, realizado no dia 29-4-92 por uma direcção Sudeste e uma velocidade de 3.1m/s. Durante o transecto da Ria Formosa (2-5-92) a direcção do vento foi Norte e a velocidade de 6.7m/s. Quando se realizou o transecto de Albufeira, em 4-5-92 o vento soprava de Noroeste com uma velocidade de 5.3m/s. Em Sagres, no dia 6-5-92 registou-se um vento de Sudeste com uma velocidade de 4.7m/s. Durante as recolhas realizadas paralelamente à costa, nos dias 3 e 5-5-92 o vento manteve a mesma direcção que em Sagres, mas decresceu de velocidade (3.6m/s) (Figuras 4.15-4.16).

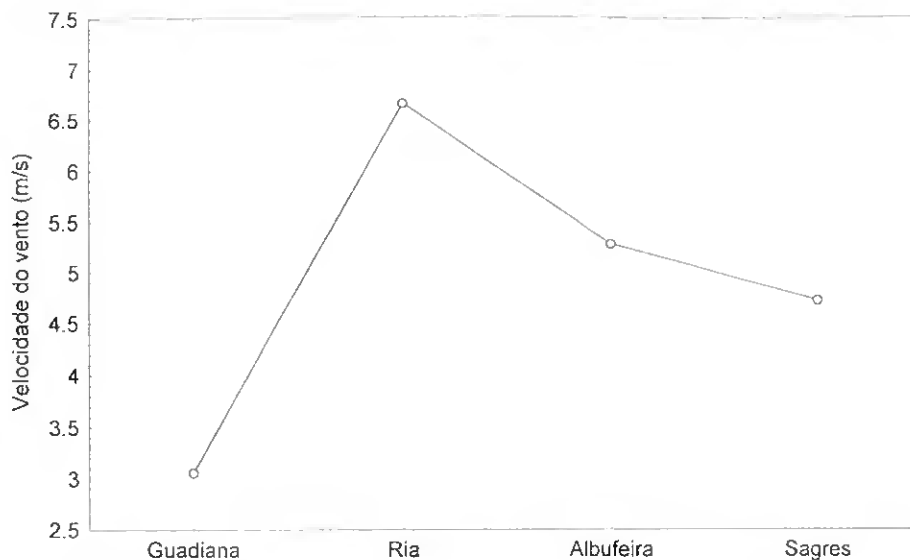


Figura 4.15- Variação da velocidade do vento nos vários transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Precipitação

Durante o período de recolhas na barra de Faro-Olhão apenas ocorreu precipitação no mês de Dezembro de 1991. Contudo entre Abril e Maio de 1992, ou seja no período em que se realizou o cruzeiro, este caracterizou por uma ausência total de precipitação.

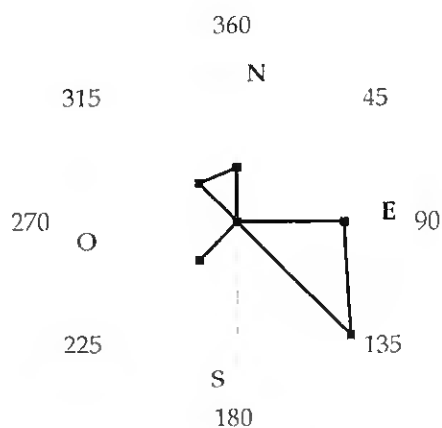


Figura 4.16 - Variação do rumo do vento durante a amostragem na costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

Turbulência

Embora não se tenham revelado diferenças estatisticamente significativas entre transectos ($p < 0.486$) relativamente a este parâmetro, o transecto de Albufeira apresentou valores relativamente superiores, com uma média e respectivo desvio padrão de $0.012 (\pm 0.005)$. Nos restantes transectos os valores médios de turbulência e desvios padrões correspondentes foram: $0.008 (\pm 0.004)$; $0.011 (\pm 0.005)$ e $0.0101 (\pm 0.005)$, respectivamente nos transectos do Guadiana, Ria e Sagres (Figura 4.17). A turbulência tendeu nitidamente para diminuir com a distância à costa, à medida que a profundidade aumentou (Figura 4.18).

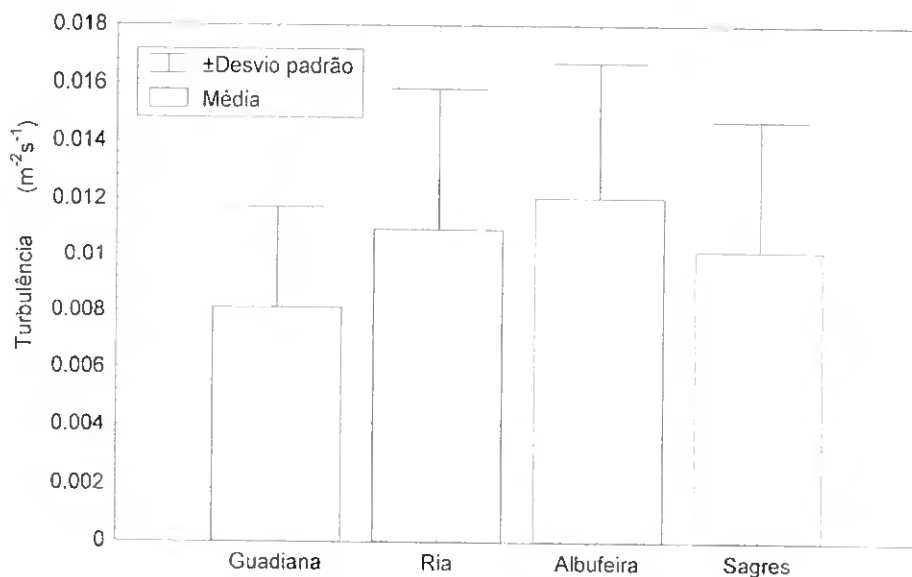


Figura 4.17 - Variação da turbulência da água nos vários transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

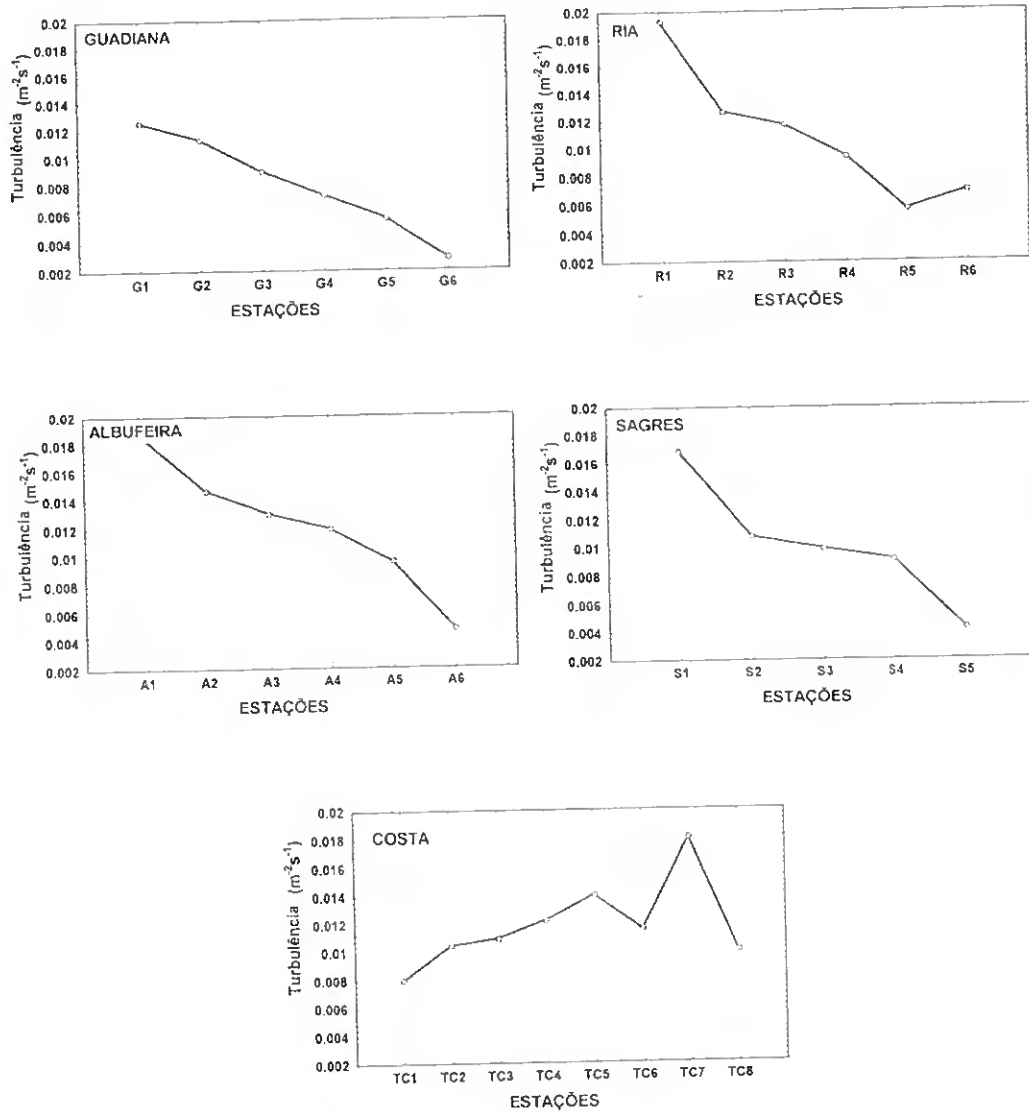


Figura 4.18 - Variação da turbulência da água pelas estações dos vários transectos e pelas estações efectuadas paralelamente à costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

3.1.2 - Parâmetros bióticos: Potenciais presas e predadores zooplancónicos

Nas amostras de microplâncton os principais taxa encontrados foram os dinoflagelados, os ovos de invertebrados e os copépodes em diferentes fases do seu desenvolvimento (*nauplii*, copepodides, copépodes adultos). A composição taxonómica não diferiu de forma acentuada entre estações, pelo que os taxa referidos apresentaram percentagens de ocorrência elevadas (Tabela IV.3).

Por outro lado, no que respeita à sua abundância relativa os dinoflagelados, os *nauplii* e os ovos de invertebrados foram normalmente dos grupos mais abundantes e representaram, em média, uma percentagem superior a 50% do total das capturas por transecto (Figura 4.19). Os *nauplii* dominaram as recolhas nos transecto da Ria e Albufeira, com 32.4% e 21.9% respectivamente enquanto que os dinoflagelados apresentaram as maiores percentagens, 30% e 29.2% nos transectos do Guadiana e de Sagres.

Tabela IV.3- Percentagem de ocorrência dos principais taxa de microplâncton nas amostras recolhidas na costa algarvia.

<i>Taxa</i>	%
Dinoflagelados	100
Tintinídeos	100
Copépode (<i>nauplius</i> , copepoditos e adultos)	100
Ovos de invertebrados	93
Larvas de bivalves	100
Larvas de gastrópodes	86
Cladóceros	20

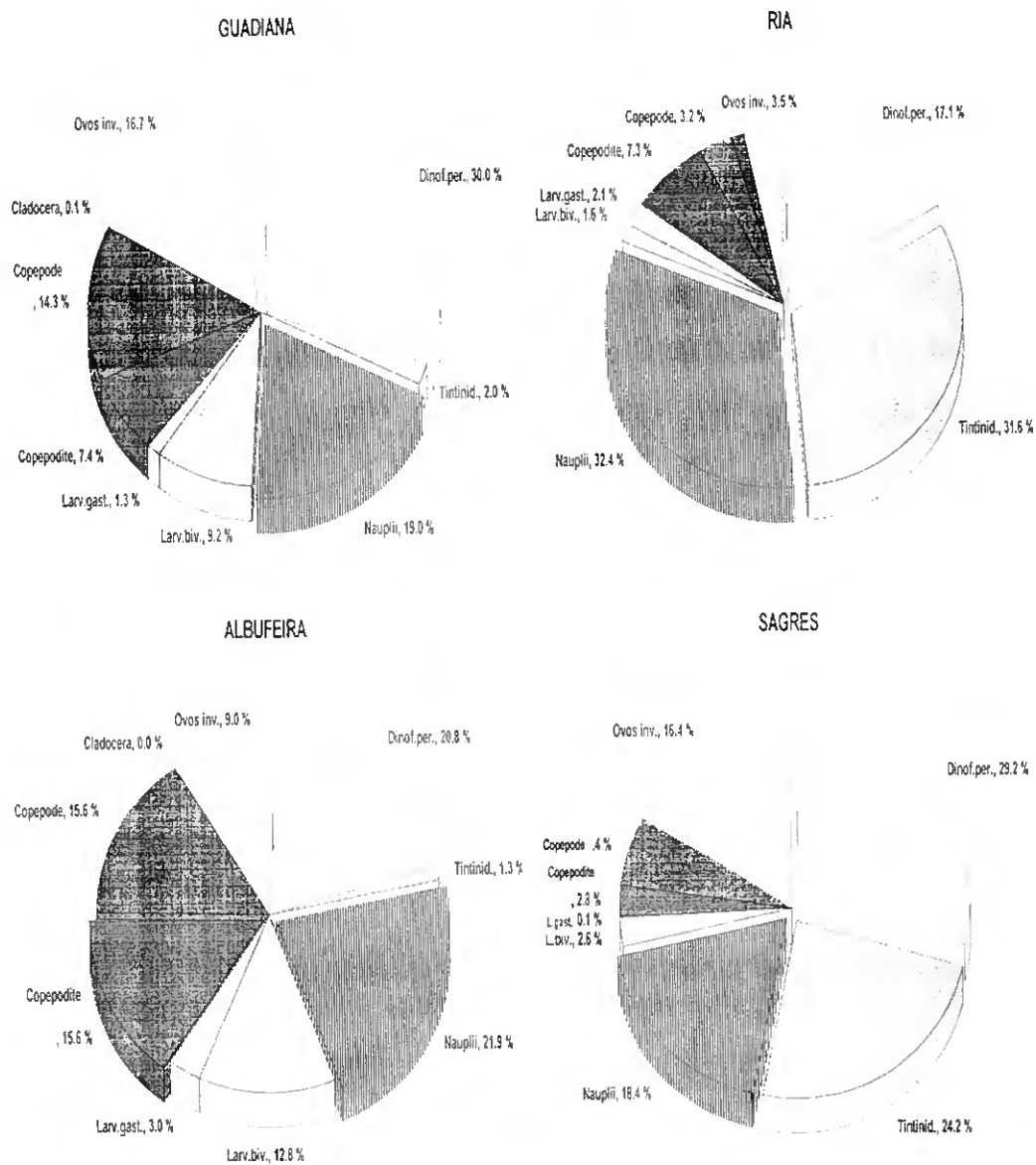


Figura 4.19 - Abundância relativa dos grupos taxonômicos de microplâncton nos diferentes transectos realizados na costa algarvia.

A densidade de presas potenciais para as larvas de sardinha revelou-se superior transecto de Albufeira (Figura 4.20), tendo atingido o valor máximo na estação 1 com 109335.3 indivíduos/m³, o valor mínimo ocorreu na estação da costa (TC6) com 1011 indivíduos/m³ (Figura 4.21). Verificou-se que as densidades de presas diminuíram com a distância à costa. Por outro lado, esta variável não diferiu significativamente entre as

zonas amostradas na costa algarvia, ou seja entre os transectos do Guadiana, Ria, Albufeira e Sagres ($p < 0.207$).

As dimensões destes organismos variaram acentuadamente entre grupos, sendo que os *nauplii*, os dinoflagelados e os ovos de invertebrados apresentaram dimensões médias inferiores a 120 μm , contrastando com grupos como os copépodes adultos, que atingiram valores médios superiores, ou seja de 650 μm (Tabela IV.4).



Figura 4.20 - Variação do número de presas pelos diferentes transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992

Tabela IV.4 - Dimensões médias das presas potenciais das larvas de peixe recolhidas durante as recolhas realizadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Taxa	Média(μm) \pm desvio padrão
Dinoflagelados	112.416 \pm 58.7
Tintinídeos	140.645 \pm 75.4
<i>Nauplius</i>	112.193 \pm 45.7
Copepoditos	312.777 \pm 151.3
Copépodes adultos	650 \pm 381.7
Ovos de invertebrados	63.464 \pm 25.3
Larvas de bivalves	142.553 \pm 145.3
Larvas de gastrópodes	192.733 \pm 98.7
Cladóceros	139 \pm 37

Por outro lado, na análise do mesozooplâncton, os quetognatas surgiram com a maior percentagem de ocorrência, ou seja, 100 % (Tabela IV.5). A abundância relativa deste

grupo taxonómico foi, por vezes, bastante grande. Os valores variaram entre os 3.5% no transecto de Sagres e os 37.8% no transecto da Ria, mas situaram-se sempre entre os três primeiros taxa por ordem de abundância. Este *taxon* esteve representado, na maioria das recolhas, pela espécie *Sagitta friderici*.

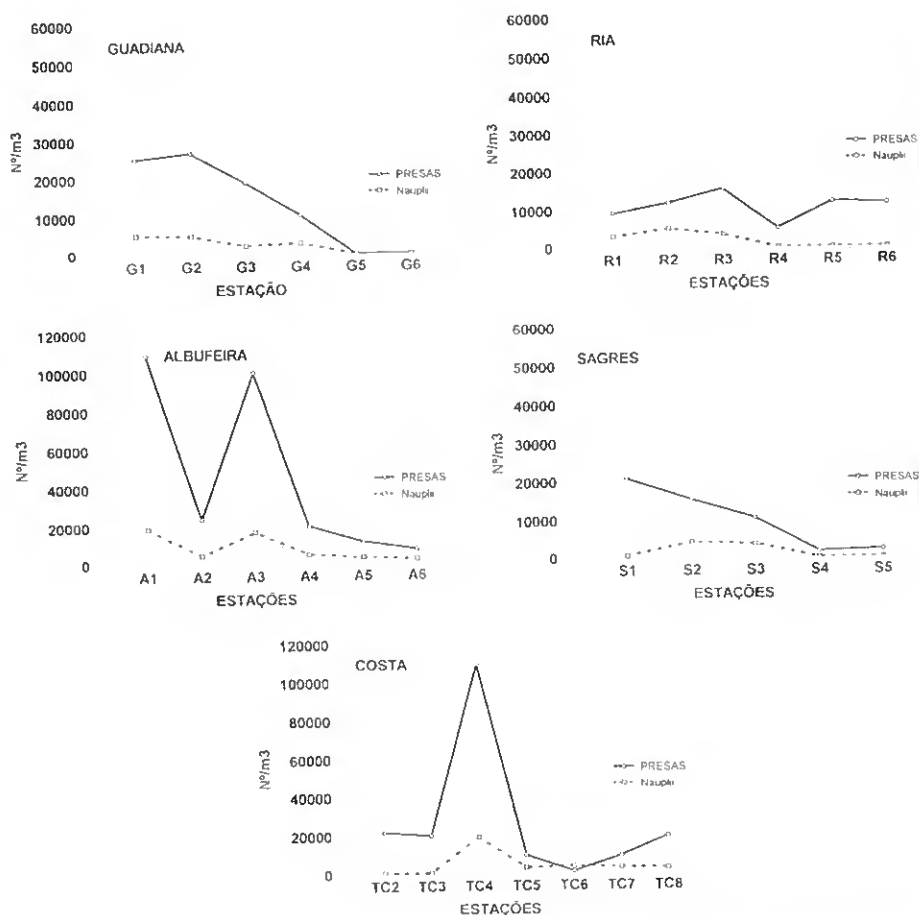


Figura 4.21 - Variação da densidade de presas pelas estações realizadas na costa algarvia durante o cruzeiro entre Abril e Maio de 1992.

Relativamente aos restantes grupos de predadores, embora a percentagem de ocorrência tenha sido menor, a sua densidade foi também por vezes muito elevada, sendo de salientar os sifonóforos e outras hidromedusas, com abundâncias relativas máximas em Sagres de 71.6% e 24.6%, respectivamente (Figura 4.22).

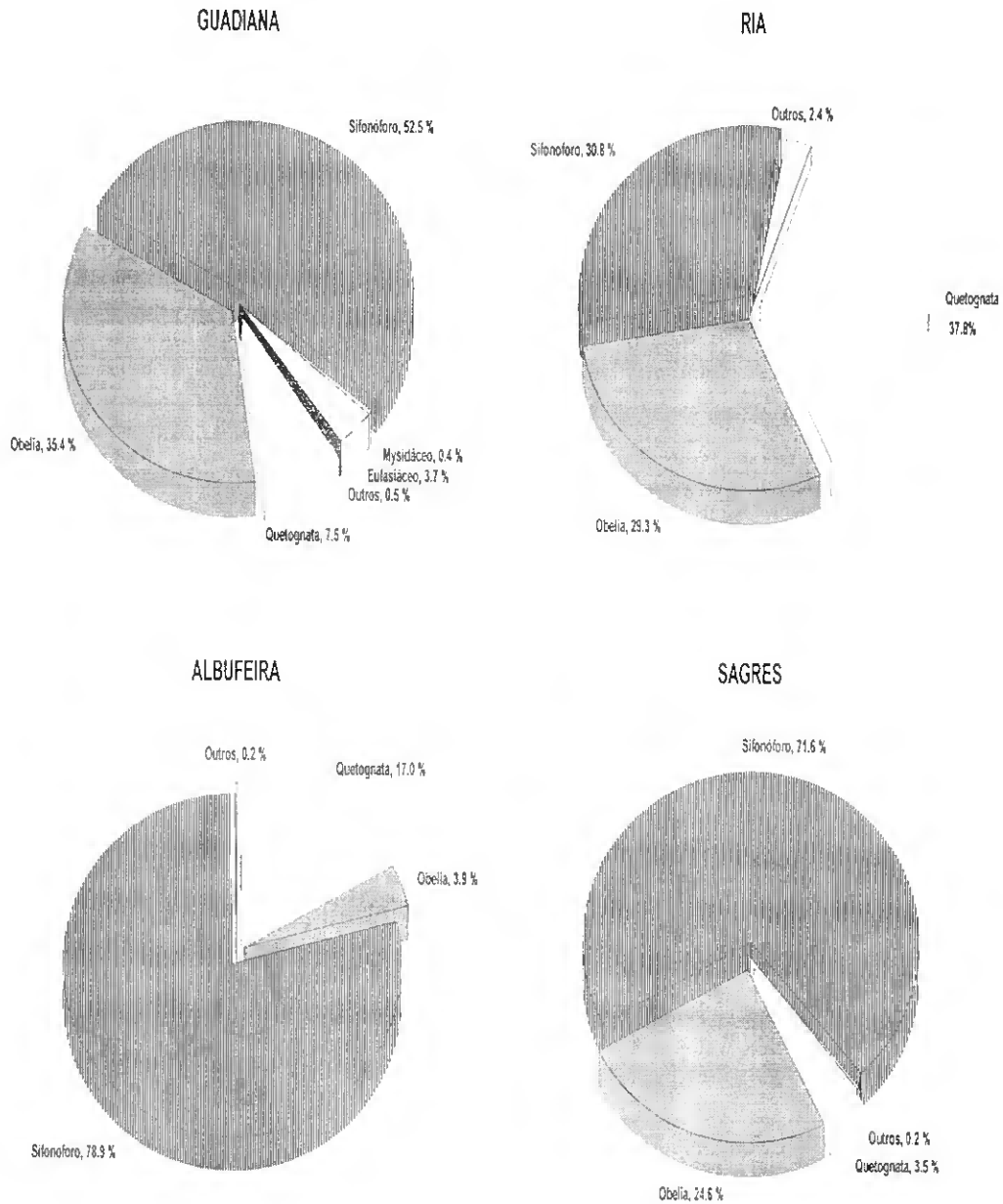


Figura 4.22 - Abundância relativa dos vários grupos taxonómicos de mesozooplâncton, predadores potenciais de larvas de peixe, nos diferentes transectos realizados na costa algarvia.

Os potenciais predadores zooplanctónicos de larvas de peixe atingiram um valor máximo na estação 1 do transecto de Albufeira com 16687.4 indivíduos/100m³ e um mínimo de 13.9 indivíduos por 100m³ na estação 1 do transecto do Guadiana (Figura

4.23). Os valores médios foram bastante superiores no transecto de Albufeira (Figura 4.24). De uma forma geral, registou-se uma densidade mais elevada de predadores nas estações mais próximas da costa, tal como sucedeu com as suas presas potenciais, as larvas de sardinha (LINO, 1992).

Tabela IV.5 - Percentagem de ocorrência dos principais taxa de mesozooplâncton, considerados potenciais predadores de larvas de peixe nas amostras recolhidas na costa algarvia.

<i>Taxa</i>	%
Quetognatas	100
Sifonóforos	69.6
Outras Medusas	65.2
Taliáceos	13
Misidáceos	4.3
Eufasiáceos	4.3

Verificou-se uma grande variabilidade na densidade total dos predadores zooplânctónicos potenciais, quer entre transectos, pelo que não se verificaram diferenças significativas entre eles ($p < 0.337$). No entanto, quando se analisou separadamente a densidade de quetognatas verificou-se que estes diferiam significativamente entre transectos ($p < 0.001$).

3.1.3 - Conteúdo do tubo digestivo

Na amostragem preliminar de Dezembro de 1991 recolheram-se 60 larvas de sardinha, cujo conteúdo digestivo foi analisado detalhadamente. Os principais itens alimentares encontrados no tubo digestivo das larvas de sardinha foram: *nauplii*, copepoditos, ovos de invertebrados, larvas de bivalves, tintinídeos e aglomerados de origem vegetal. Em termos de importância relativa, os *nauplii* e os copepoditos representaram em média 50% do total de presas encontradas, por outro lado, os ovos de invertebrados, as larvas de bivalves e os tintinídeos registaram percentagens de 33.3%, enquanto que os

aglomerados de origem vegetal e outros grupos não identificados representaram 29.2% e 37.5%, respectivamente (Figura 4.25).

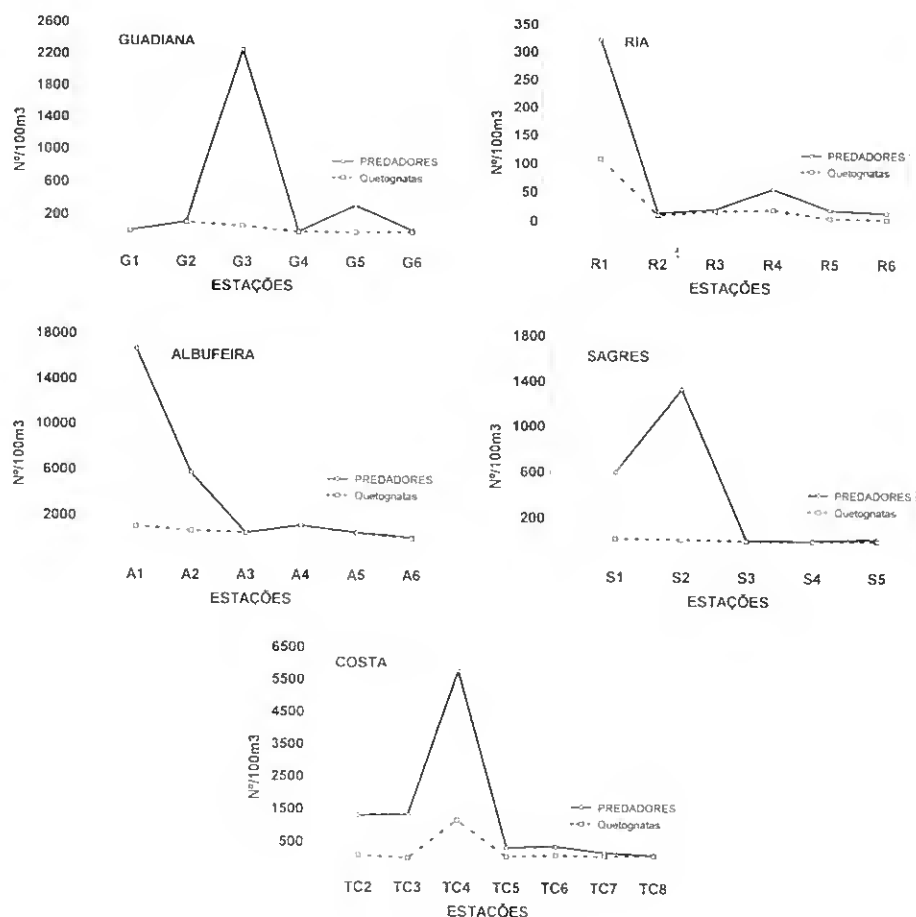


Figura 4.23 - Variação da densidade de mesozoplâncton, considerado potencial predador das larvas de peixe ao longo das estações estudadas durante o cruzeiro realizado na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

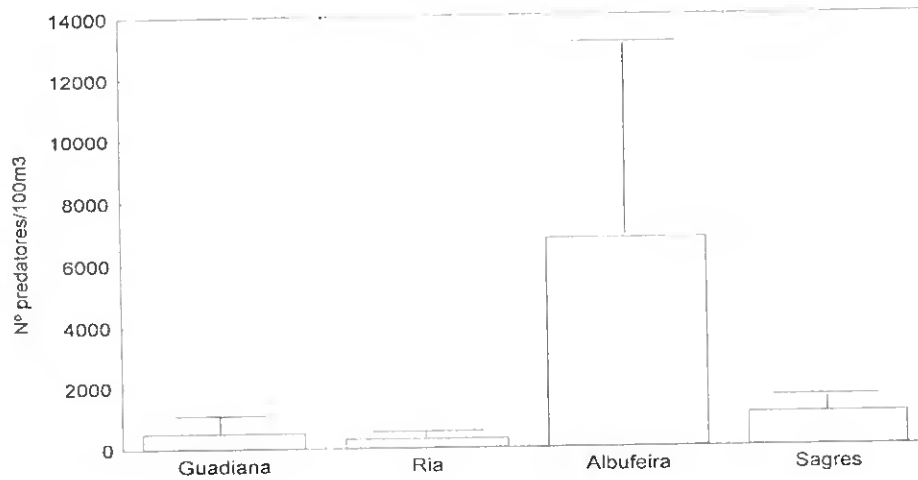


Figura 4.24- Variação da densidade total de predadores nos transectos realizados na costa algarvia durante o cruzeiro de Abril/Maio de 1992.

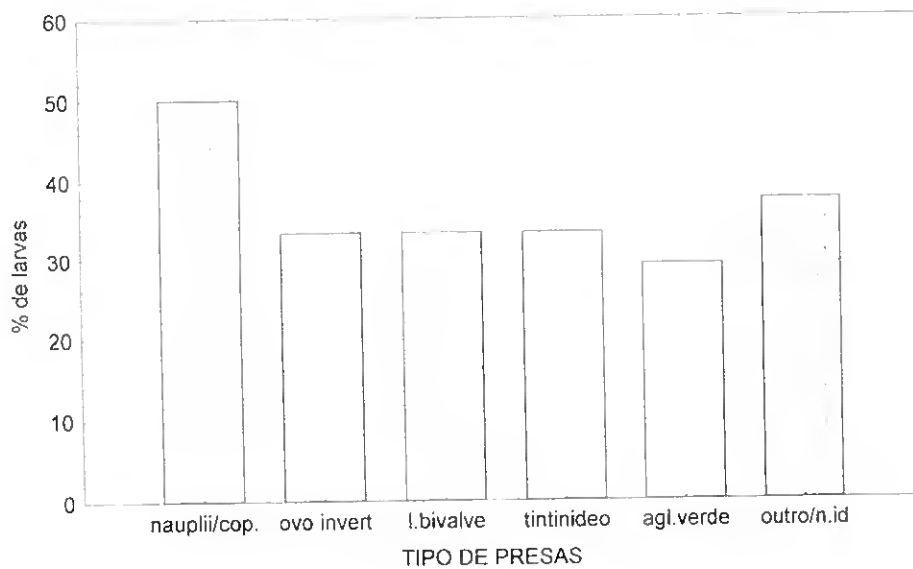
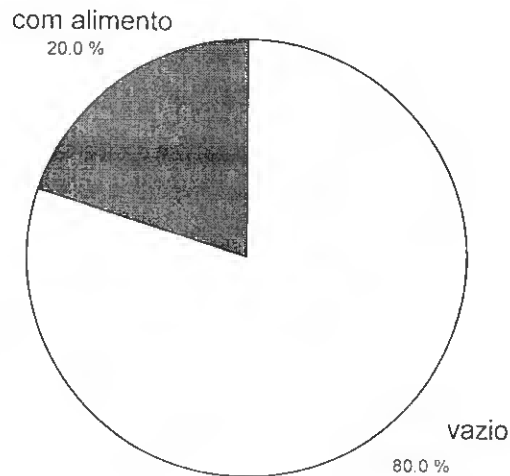


Figura 4.25 - Percentagens de larvas de sardinha que continham o tipo de presas indicado, podendo cada larva conter mais do que um tipo de presas.

A percentagem de repleção do tubo digestivo apresentou grandes flutuações, mas de uma forma geral, os valores registados foram bastantes baixos. Este índice apresentou valores entre 0% e 24% na estação fixa da costa algarvia, com uma média de 16%. Do total de larvas analisadas, cerca de 80% apresentaram o tubo digestivo vazio e apenas 20% continham alimento no seu interior (Figura 4.26).



ESTADO DO TUBO DIGESTIVO

Figura 4.26 - Percentagem de larvas de sardinha com o tubo digestivo vazio e percentagem de larvas de sardinha com alimento.

3.1.4- Morfometria

Os comprimentos das larvas de *S. pilchardus* capturadas durante o mês de Dezembro de 1991 apresentaram uma tendência para aumentar com o decorrer da amostragem. Assim, no dia 20 a média dos comprimentos foi 6.93mm(± 1.11), no dia 23 foi 7.72mm(± 1.21), no dia 27 foi 11.18mm(± 2.86) e no dia 29 foi 13.50mm (± 1.56) (Figura 4.27).

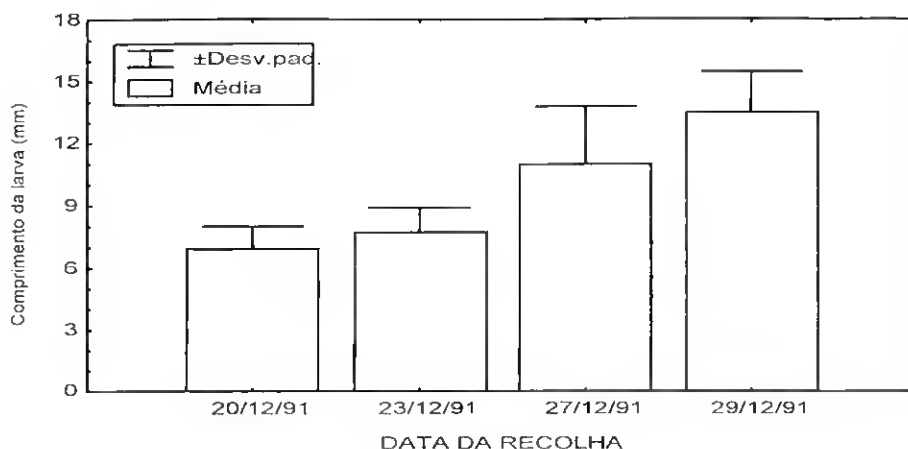


Figura 4.27 - Variação do comprimento das larvas de *S. pilchardus* ao longo dos dias de recolha de Dezembro de 1991.

Relativamente às dimensões das larvas recolhidas no cruzeiro realizado em Abril/Maio de 1992, os menores comprimentos padrão foram registados no transecto da Ria e os maiores nos transectos do Guadiana e de Albufeira (Figura 4.28). A aplicação de uma ANOVA simples com duas entradas e efeitos fixos, não evidenciou a existência de diferenças significativas, nem entre os vários transectos ($p < 0.547$), nem entre as estações do transecto do Guadiana ($p < 0.178$), contrariamente ao que ocorreu entre estações do transecto de Albufeira ($p < 0.378$). Não se registaram diferenças significativas ($p < 0.168$), entre as estações paralelas à costa.

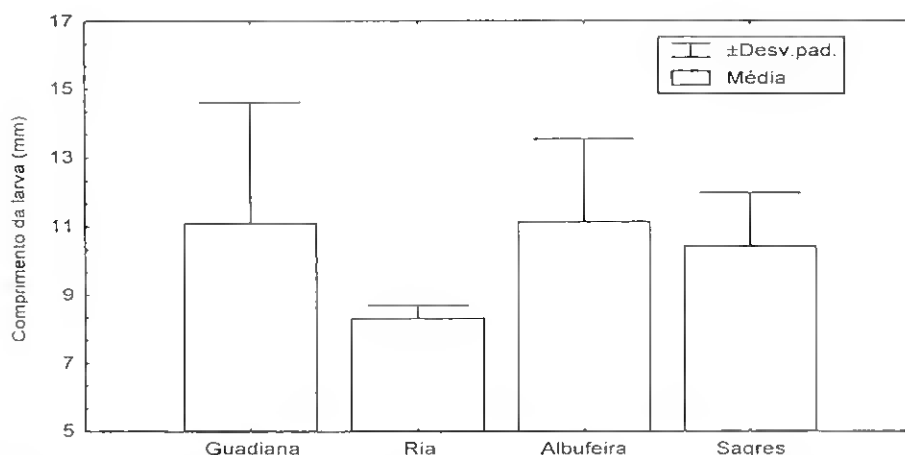


Figura 4.28 - Variação dos comprimentos das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Comparando os comprimentos larvares médios obtidos em Dezembro de 1991 com os de Abril/Maio 1992 verificou-se que nestes meses os valores foram significativamente superiores ($11.09\text{mm} \pm 2.67$) aos de Dezembro ($8.61\text{mm} \pm 2.71$) ($p < 0.05$).

Os transectos do Guadiana e de Albufeira foram analisados mais pormenorizadamente, devido à maior abundância de larvas de sardinha que neles ocorreu (Anexo III, Tabela 2). Desta forma, optou-se por se apresentarem histogramas com as variações dos diferentes parâmetros morfométricos, para as estações incluídas nas zonas referidas, enquanto que nos transectos da Ria e de Sagres se apresentaram apenas os resultados médios, com os respectivos desvios padrões. Na secção seguinte, referente aos índices bioquímicos, seguiu-se o mesmo procedimento.

No que diz respeito às medições morfométricas simples, os resultados apresentaram tendências semelhantes ao comprimento larvar nos diferentes transectos. No caso do diâmetro do olho nos transectos do Guadiana, Ria, Albufeira e Sagres os valores médios e seus desvios padrões foram, respectivamente, os seguintes (Figura 4.29): $386.1\mu\text{m} (\pm 92.0)$; $349.5\mu\text{m} (\pm 0.7)$; $388\mu\text{m} (\pm 71.1)$ e $379.3\mu\text{m} (\pm 1.2)$.

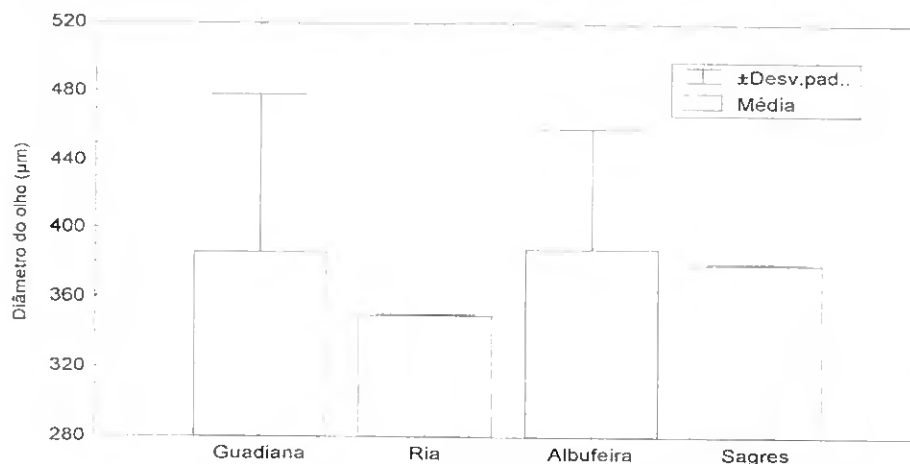


Figura 4.29- Variação do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

As medições médias e correspondentes desvios padrões da altura da cabeça registaram os valores seguintes (Figura 4.30): $825.1\mu\text{m}(\pm 235.1)$, $740.37\mu\text{m}(\pm 0.5)$, $769.9\mu\text{m}(\pm 137.8)$, e $776.1\mu\text{m}(\pm 1)$, respectivamente nos transectos do Guadiana, Ria, Albufeira e Sagres. Por fim, as medições médias da altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral foram, nos respectivos transectos, de: $667.8\mu\text{m}(\pm 224)$ (Guadiana); $596.3\mu\text{m}(\pm 6.1)$ (Ria); $610\mu\text{m}(\pm 124.7)$ (Albufeira) e $597\mu\text{m}(\pm 4.3)$ (Sagres) (Figura 4.31).

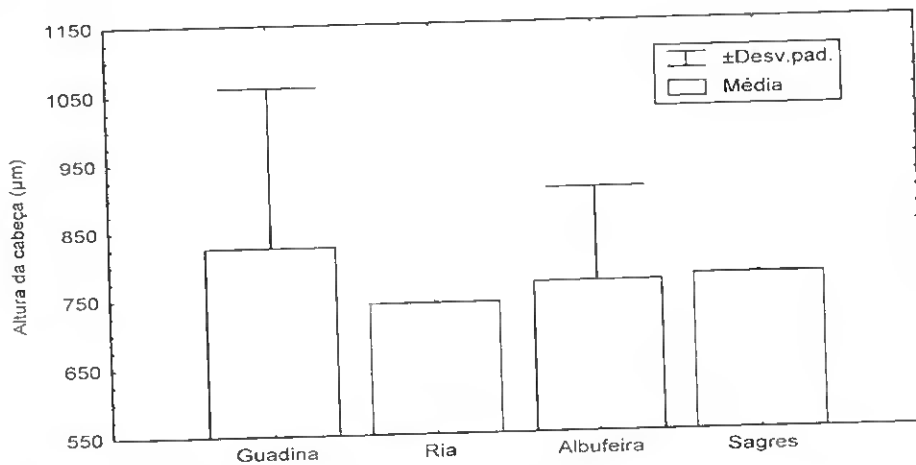


Figura 4.30 - Variação da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

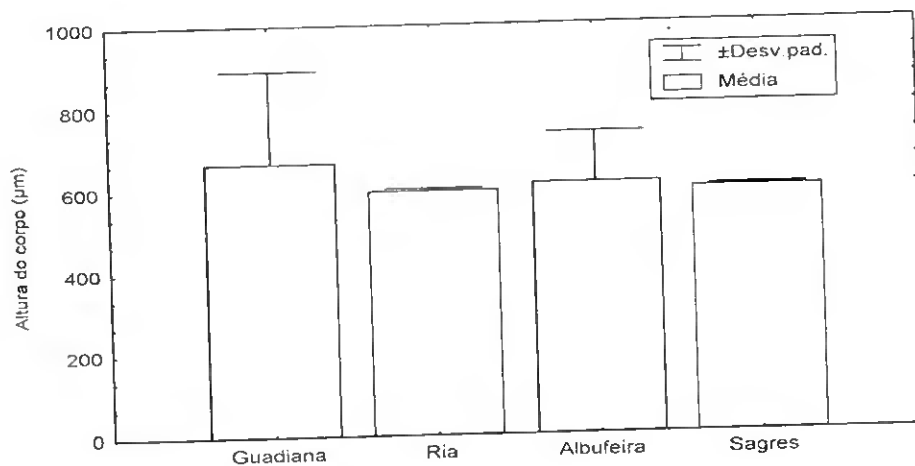


Figura 4.31 - Variação da altura do corpo na zona de inserção das barbatanas peitorais das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

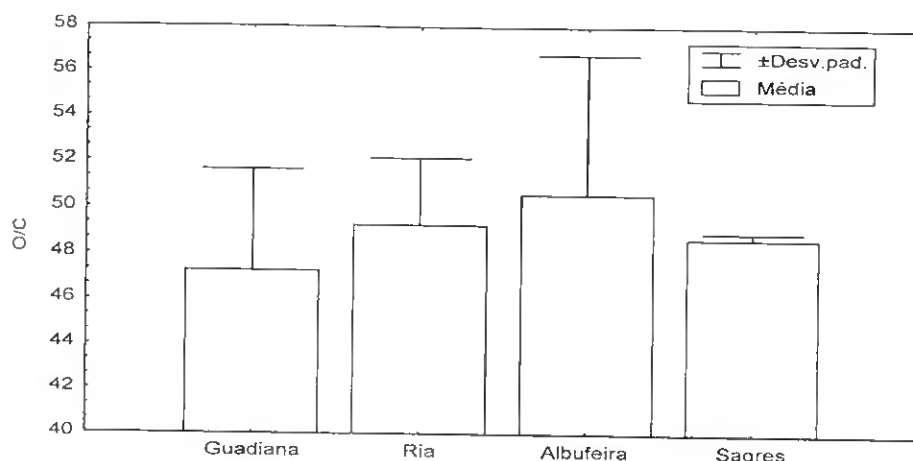


Figura 4.32 - Variação da relação diâmetro do olho/altura da cabeça (O/C) das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Os valores médios e correspondentes desvios padrões do índice O/P foram de 59.3%(±8.5); 61.3%(±3,3); 64.3%(±8.3) e 63.3%(±0.3) nos transectos do Guadiana, Ria, Albufeira e Sagres, respectivamente (Figura 4.32). No caso do índice O/C os valores médios registados nos diferentes transectos foram: 47.3%(±4.3) (Guadiana); 49.2%(±2.9) (Ria); 50.6%(±6.1) (Albufeira) e 48.7% (±0.3)(Sagres) (Figura 4.33).

As medições relativas ao diâmetro do olho, à altura da cabeça e à altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral, também à semelhança do comprimento larvar, não diferiram significativamente, entre transectos. Tal constatou-se através da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, uma vez a distribuição destas medições não se aproximou de uma distribuição do tipo normal. Obtiveram-se os seguintes valores entre transectos: $p=0.3$ para o diâmetro do olho, $p=0.667$ para a altura da cabeça e $p=0.53$ para a altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral.

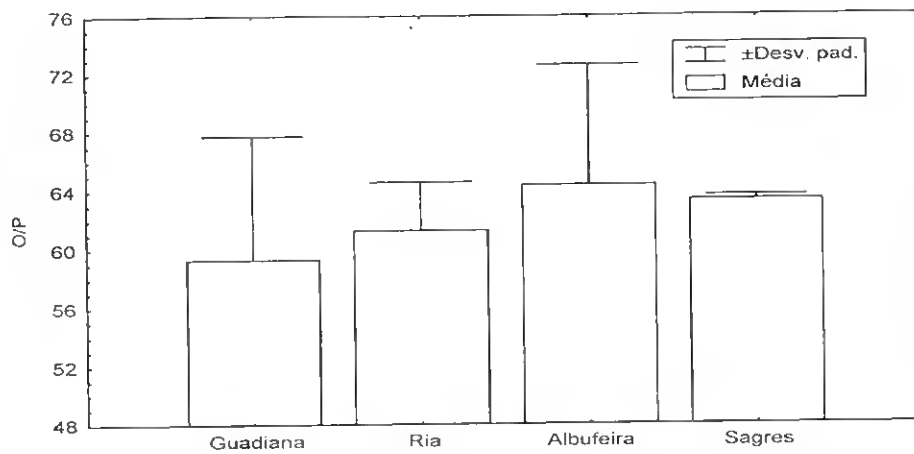


Figura 4.33 - Variação da razão diâmetro do olho/altura do corpo peitoral na zona de inserção das peitorais (O/P) nas larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992.

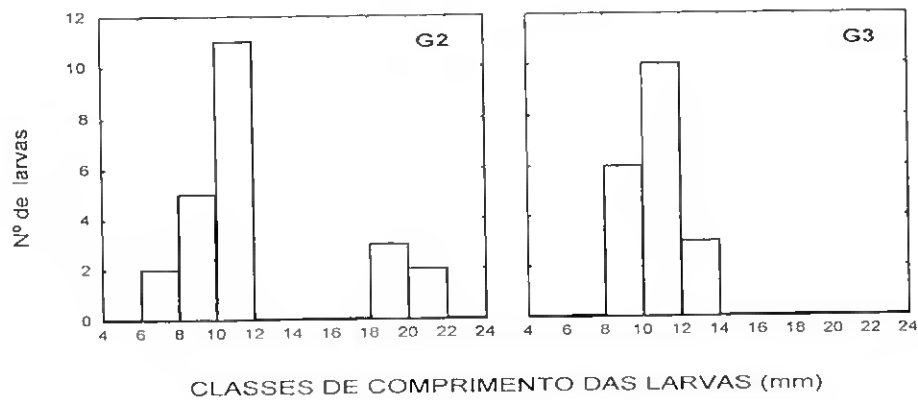


Figura 4.34 - Distribuição de frequência de comprimento, das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

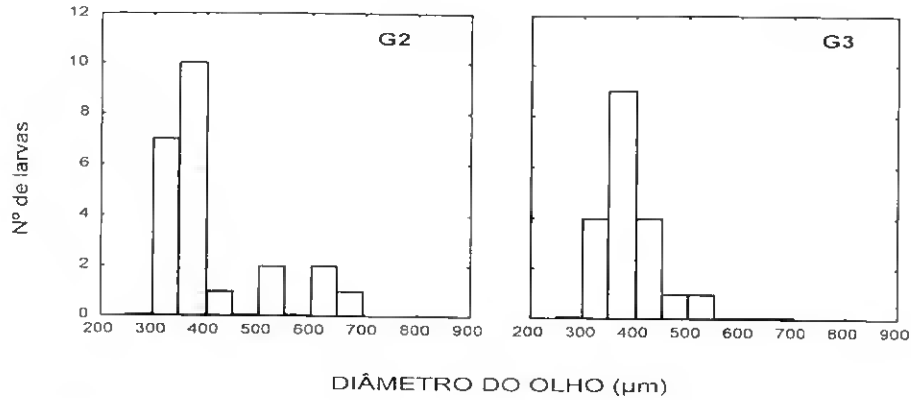


Figura 4.35- Distribuição de frequências de diâmetro do olho, das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

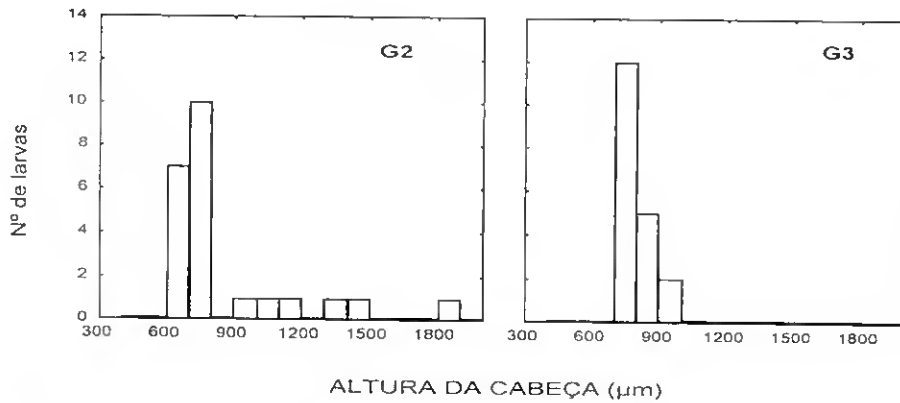


Figura 4.36 - Distribuição de frequências de altura da cabeça, das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

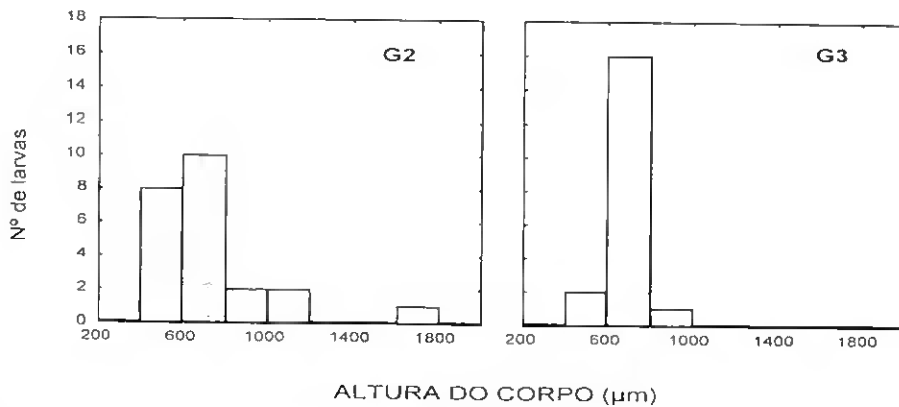


Figura 4.37- Distribuição de frequências de altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral, das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

Relativamente às estações realizadas paralelamente à costa, registaram-se valores de p iguais a 0.3, a 0.667 e a 0.53 para o diâmetro do olho, altura da cabeça e altura do corpo nas peitorais, respectivamente.

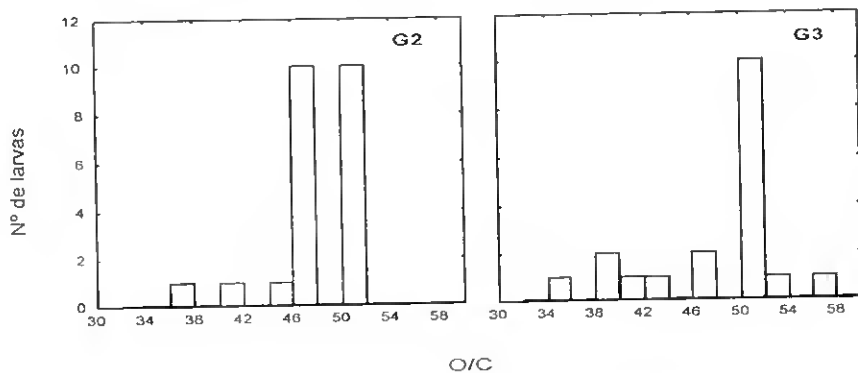


Figura 4.38 - Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura da cabeça (O/C), das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

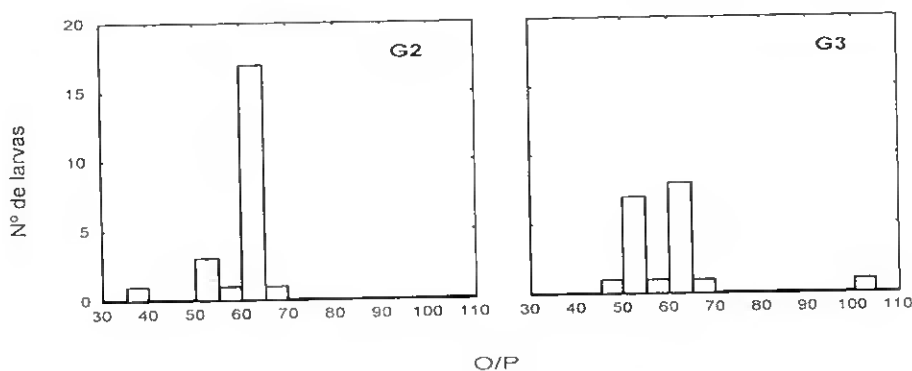


Figura 4.39- Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura na barbatana peitoral (O/P), das larvas de *S. pilchardus*, nas estações do transecto do Guadiana.

Apesar de as medições simples não terem revelado diferenças entre zonas amostradas através da aplicação de uma ANOVA, os resultados do cálculo dos índices morfométricos, que relacionaram duas medições, evidenciaram diferenças significativas entre transectos. A relação entre o diâmetro do olho e a altura do corpo na zona de inserção das barbatanas peitorais (O/P) obteve-se um valor de p de 0.002 e, para a relação entre o diâmetro do olho e altura da cabeça (O/C) obteve-se um valor de p de 0.016. De forma a averiguar quais os transectos que se distinguiam entre si aplicou-se o teste de Tukey e para as relações morfométricas indicadas, O/P e O/C, os

resultados indicam diferenças significativas entre os transectos do Guadiana e de Albufeira ($p < 0.05$).

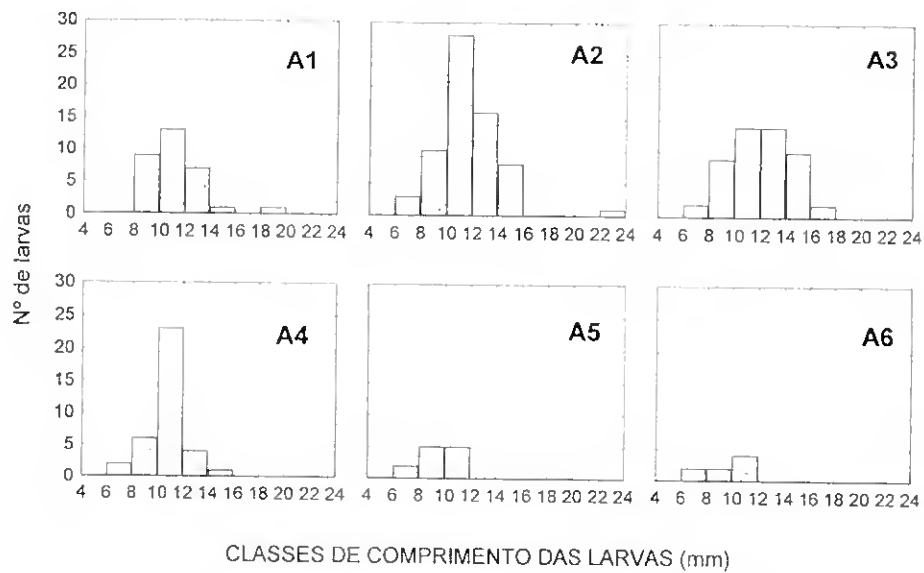


Figura 4.40- Distribuição de frequências de comprimento das larvas de sardinha, nas estações do transecto do Albufeira.

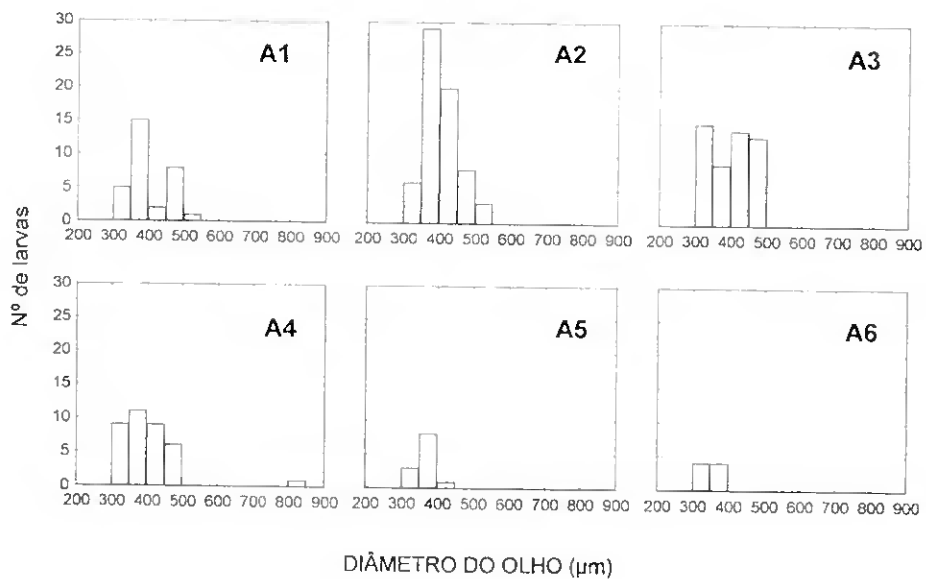


Figura 4.41- Distribuição de frequências de diâmetro do olho das larvas de sardinha, nas estações do transecto do Albufeira.

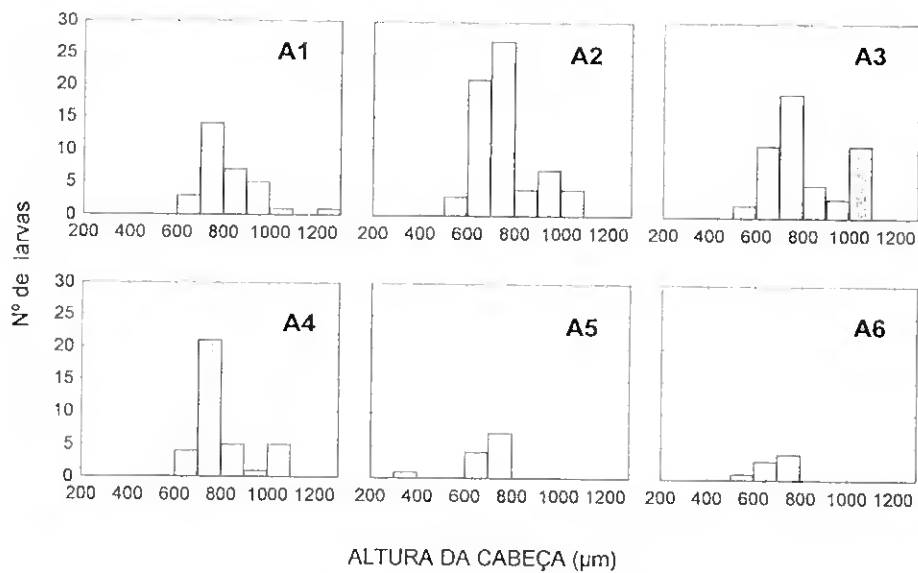


Figura 4.42- Distribuição de frequência da altura da cabeça das larvas de sardinha, nas estações do transecto de Albufeira.

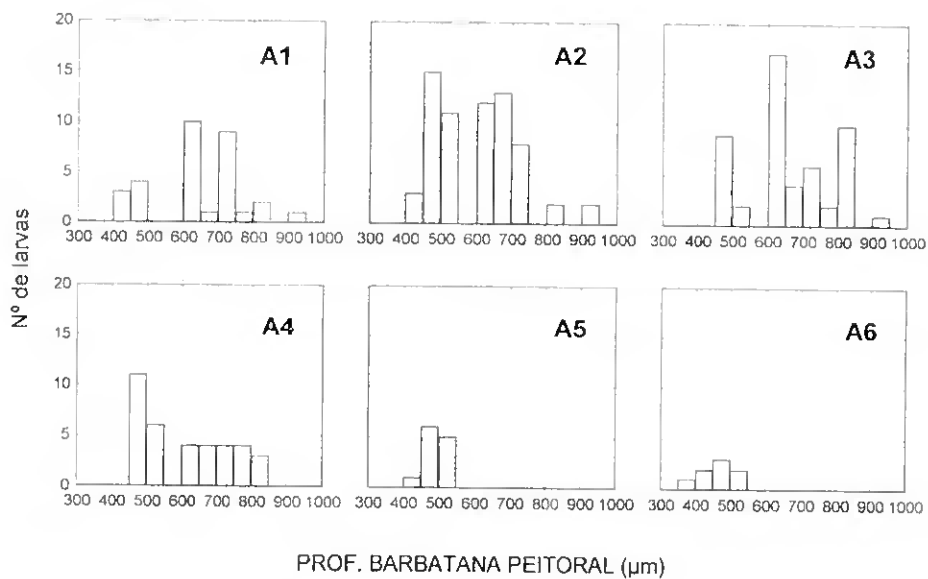


Figura 4.43 - Distribuição de frequência da altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral das larvas de sardinha, nas estações do transecto do Albufeira.

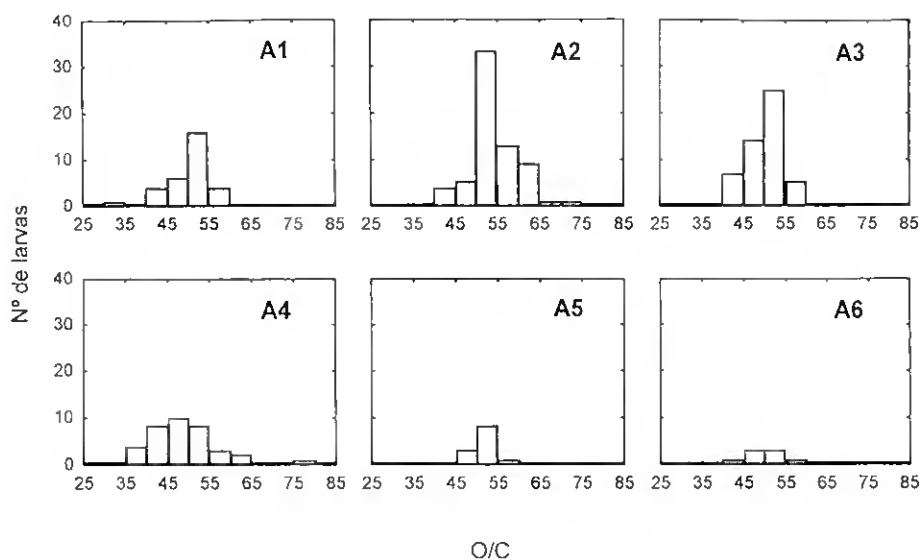


Figura 4.44 - Distribuição de frequência da relação diâmetro do olho/altura da cabeça (O/C) das larvas de sardinha, no transecto de Albufeira.

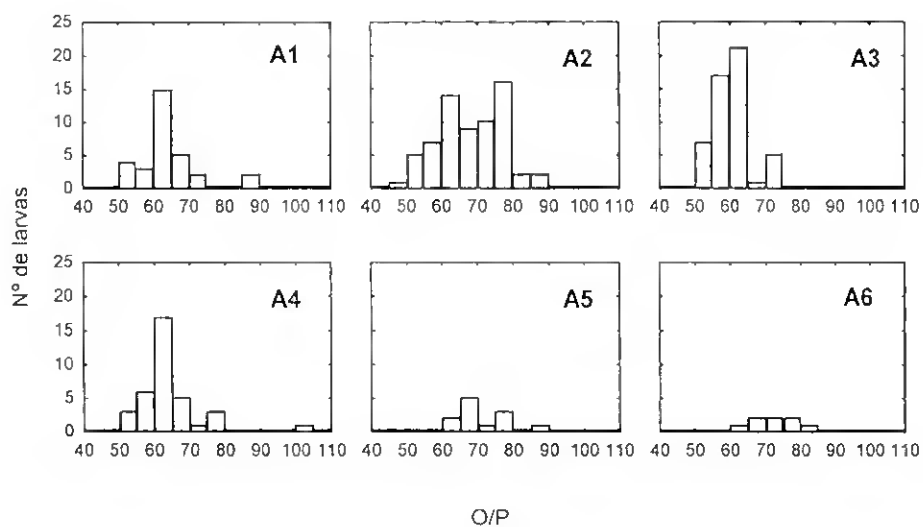


Figura 4.45 - Distribuição de frequência de diâmetro do olho/altura do corpo na barbatana peitoral (O/P) das larvas de sardinha, nas estações do transecto de Albufeira.

A análise dos histogramas, por estação, a nível das características morfométricas, revelou uma dispersão relativamente acentuada das medições entre larvas. De facto, numa mesma estação encontraram-se larvas de comprimentos diferentes, o que se reflectiu mais ou menos acentuadamente, na variação das medições de diferentes partes do corpo (Figuras 4.34 a 4.45). Na estação G2 onde se encontraram as larvas com maiores comprimentos, foi também aquela onde se registaram os maiores diâmetros de olho, altura da cabeça e profundidade do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral.

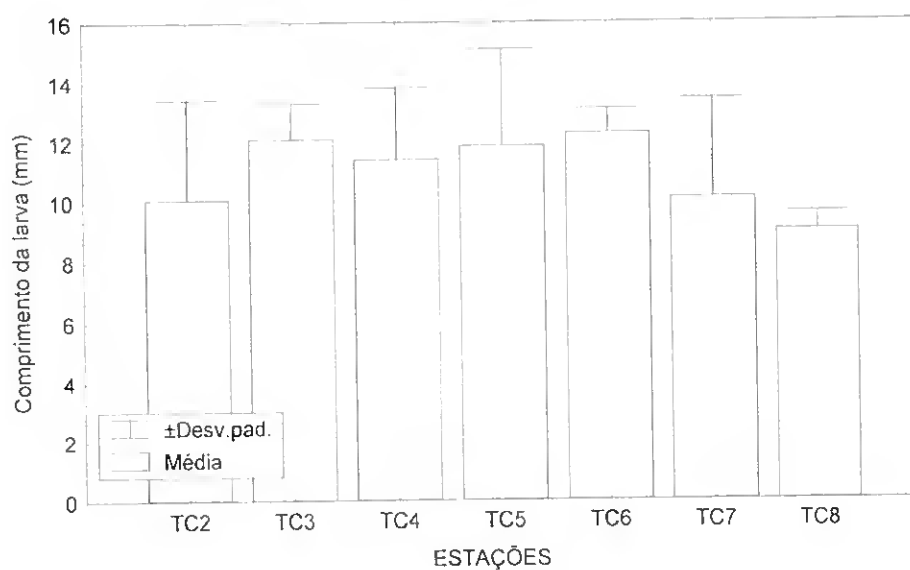


Figura 4.46- Variação dos comprimentos das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

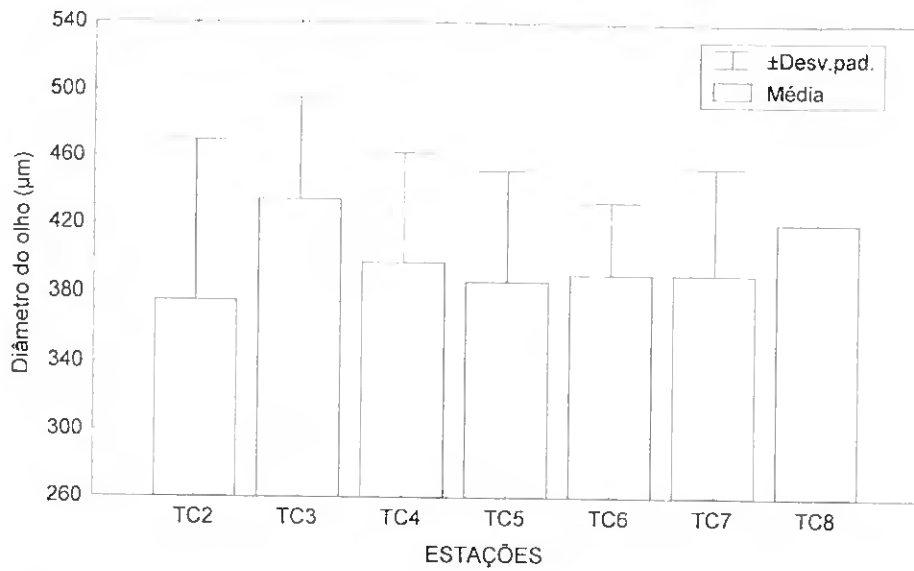


Figura 4.47- Variação do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

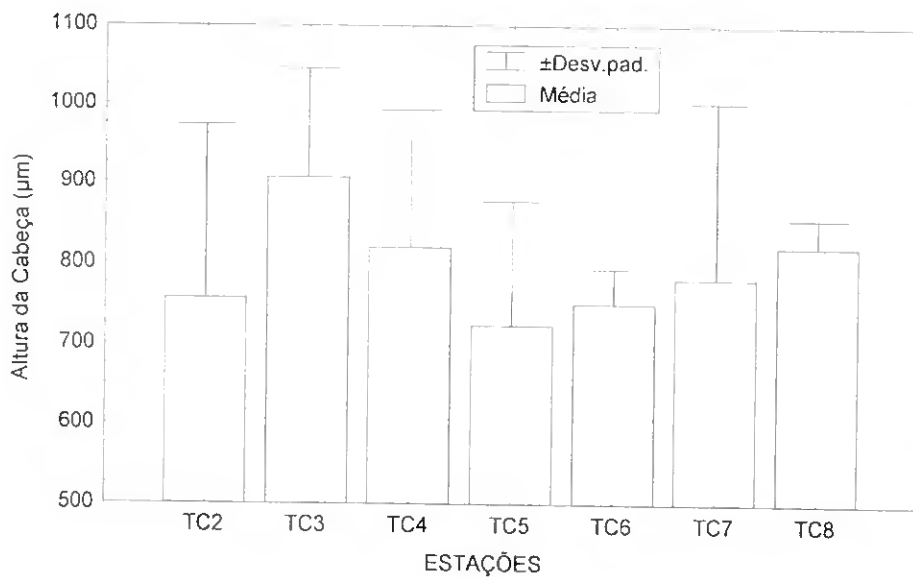


Figura 4.48- Variação da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

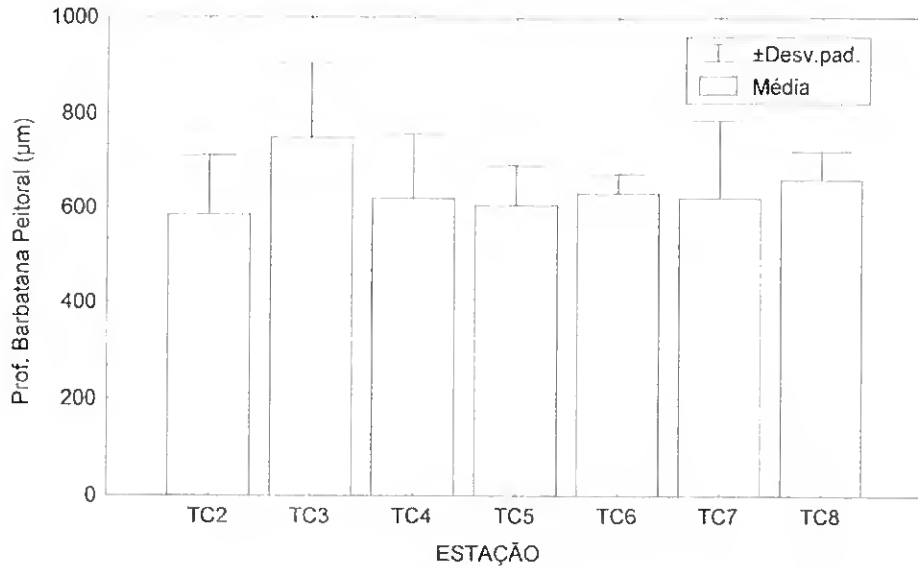


Figura 4.49 - Variação da altura do corpo na zona de inserção das barbatanas peitorais das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

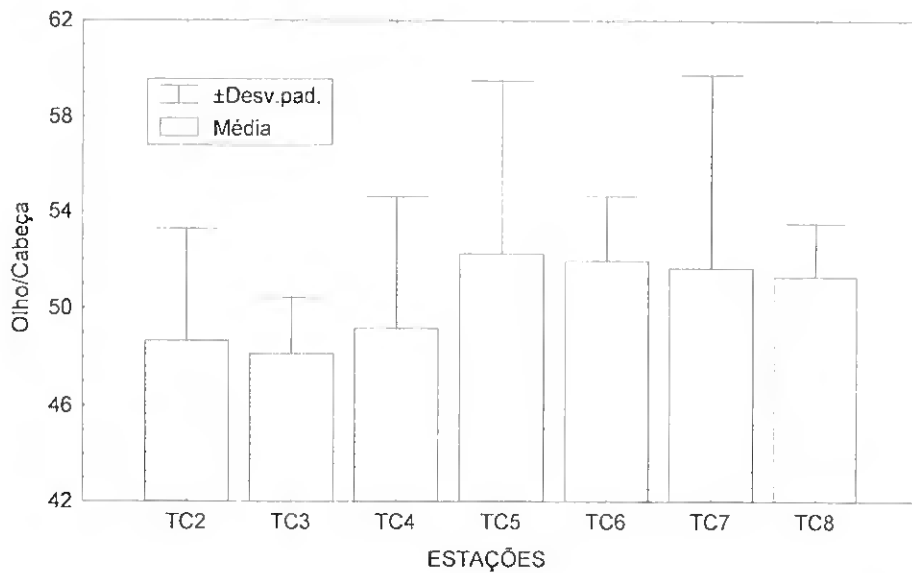


Figura 4.50- Variação da razão diâmetro do olho/altura da cabeça (O/C) das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

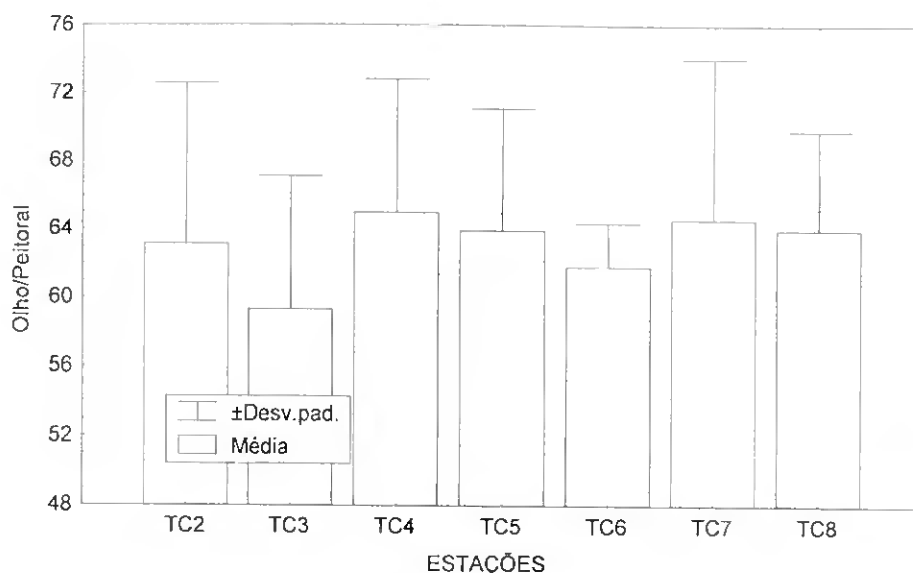


Figura 4.51- Variação da relação diâmetro do olho/altura do corpo (O/P) das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Apesar das diferenças encontradas entre os índices morfométricos entre transectos, não se registaram diferenças significativas entre as estações realizadas paralelamente à costa já que os valores de p foram 0.345 e 0.212, para a relação O/C e O/P, respectivamente.

A relação entre o diâmetro do olho, a altura da cabeça e a altura do corpo nas peitorais e o comprimento padrão das larvas (Figuras 4.52 e 4.53) e exprimiu-se através das seguintes equações, sendo os todos os coeficientes indicados significativos ($p < 0.05$):

- diâmetro do olho *versus* comprimento da larva

$$y = e^{((5,4219)+(0,04834)*x)} \quad (r=0.728; \text{variação explicada}=53.03\%; n=414)$$

- altura da cabeça *versus* comprimento da larva

$$y = e^{((5,9840)+(0,0597)*x)} \quad (r=0.765; \text{variação explicada}=58.48\%; n=414)$$

- altura na zona de inserção das barbatanas peitorais *versus* comprimento da larva

$$y = e^{((5,6988)+(0,0642)*x)} \quad (r=0.756; \text{variação explicada}=57.09\%; n=414)$$

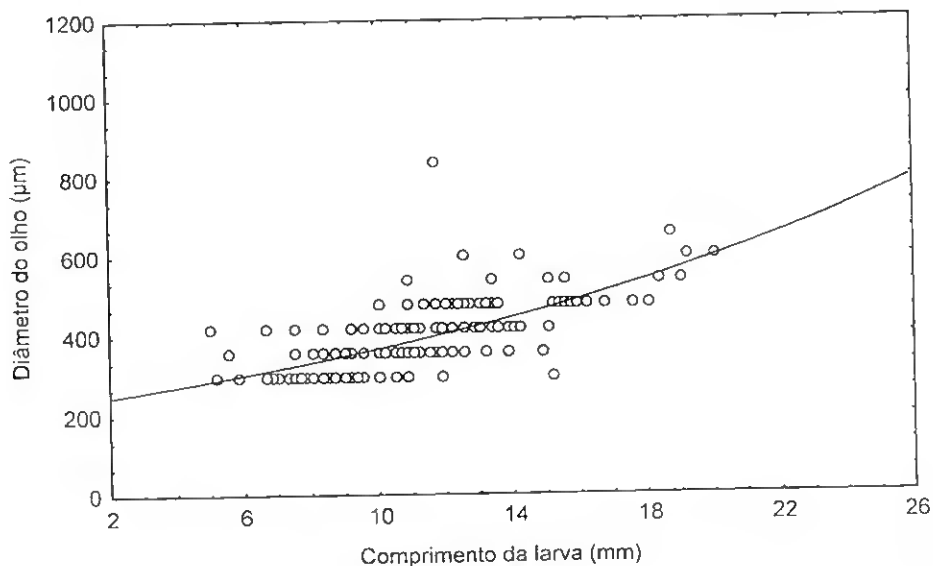
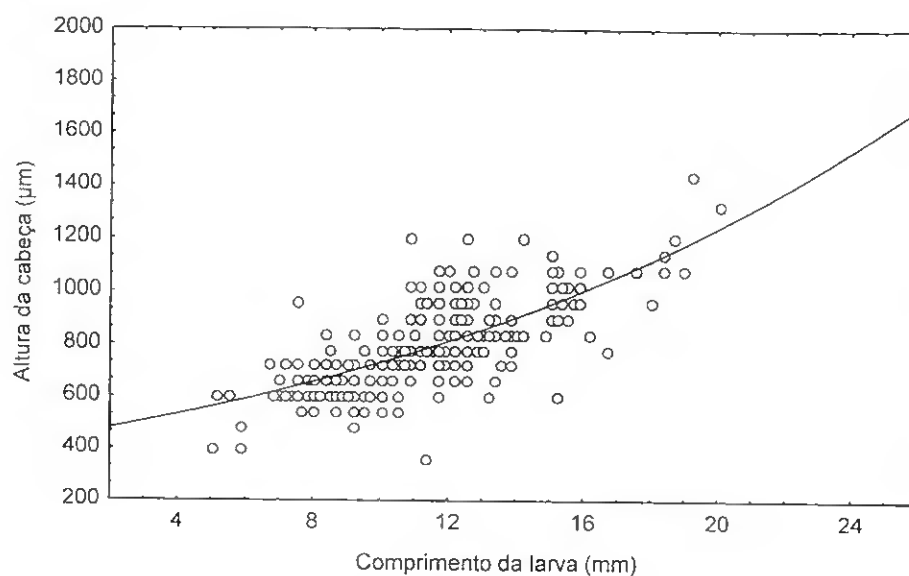


Figura 4.52 - Relação entre o diâmetro do olho e o comprimento da larva em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Registou-se uma fraca, e não significativa ($p < 0.05$), correlação entre os índices morfométricos referidos e os índices bioquímicos, como se pode observar na tabela geral das correlações no anexo IV.

Enquanto que entre as variáveis anteriores se estabeleceu uma relação exponencial, entre o comprimento da larva e as razões Olho/Cabeça ou Olho/Peitoral não se estabeleceu nenhuma relação particular, como se pode observar pela Figura 4.54, bem como pelos coeficientes de correlação não significativos ($p < 0.05$) (Anexo IV).

A.



B.

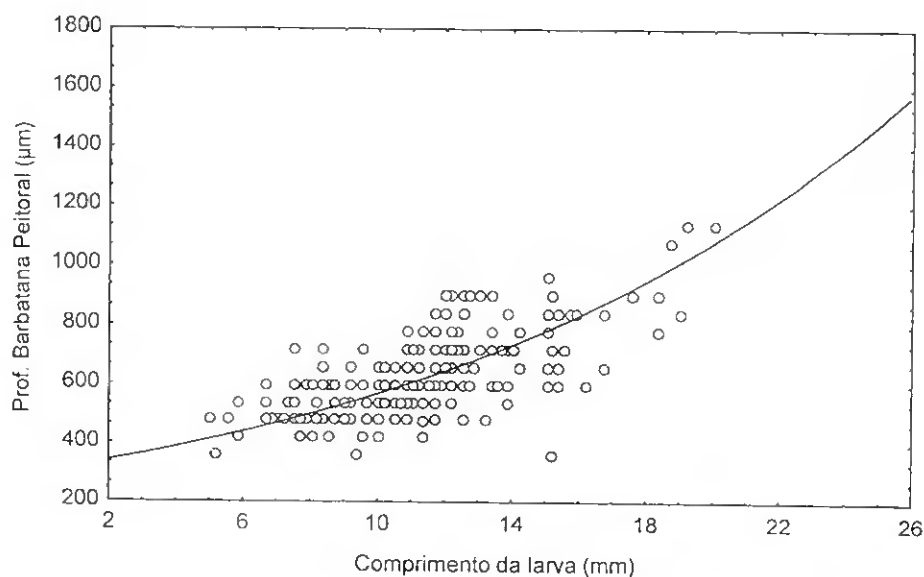
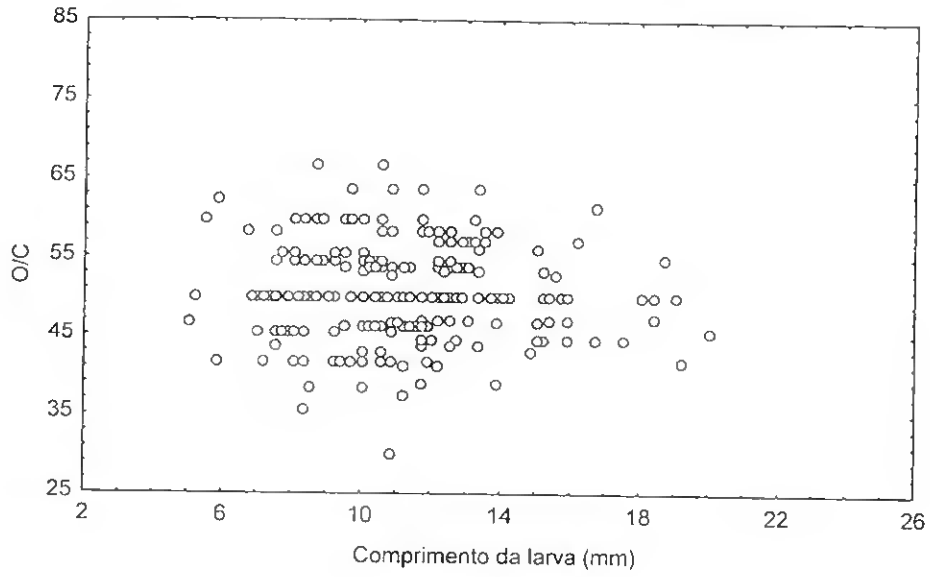


Figura 4.53 - **A.** Relação entre a altura da cabeça e o comprimento das larvas de *S. pilchardus*. **B.** Relação entre a altura do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral e o comprimento das larvas de *S. pilchardus*, recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

A.



B.

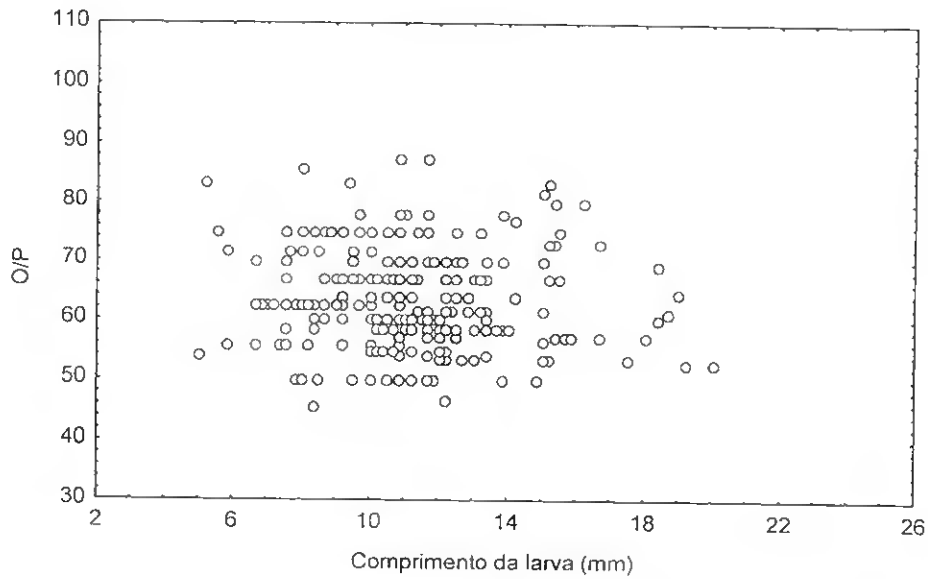


Figura 4.54- Relação entre: **A.** o índice O/C e o comprimento das larvas de *S. pilchardus*, **B.** o índice O/P e o comprimento das larvas de *S. pilchardus*, recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

3.1.5- Índices bioquímicos na costa algarvia

De entre os índices bioquímicos, a razão RNA/DNA evidenciou-se através da experiência de validação (Capítulo III) como o indicador mais adequado da condição larvar. Por esse motivo, os resultados obtidos por este índice são apresentados com mais detalhe relativamente aos restantes.

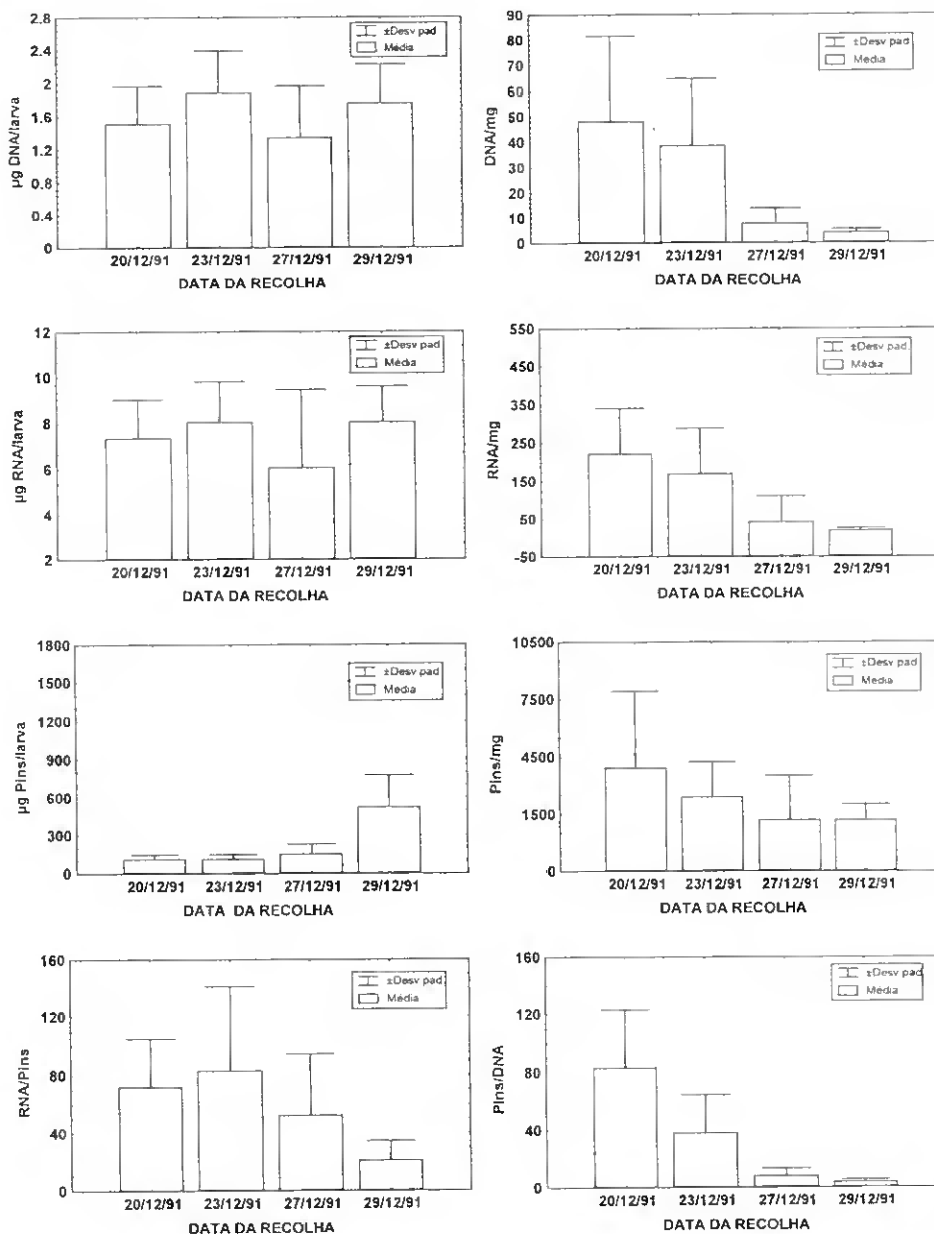


Figura 4.55 - Variação de diferentes parâmetros analisados nas larvas de sardinha recolhidas em Dezembro de 1991 na costa algarvia.

Os resultados, do mês de Dezembro de 1991, revelaram índices RNA/DNA relativamente elevados entre as larvas capturadas. Em média, a razão RNA/DNA apresentou o valor de $4.94(\pm 1.92)$ e não diferiu significativamente entre dias de recolha ($p=0.643$), contrastando com o que ocorreu com os restantes índices (Anexo III) (Figuras 4.55 e 4.56).

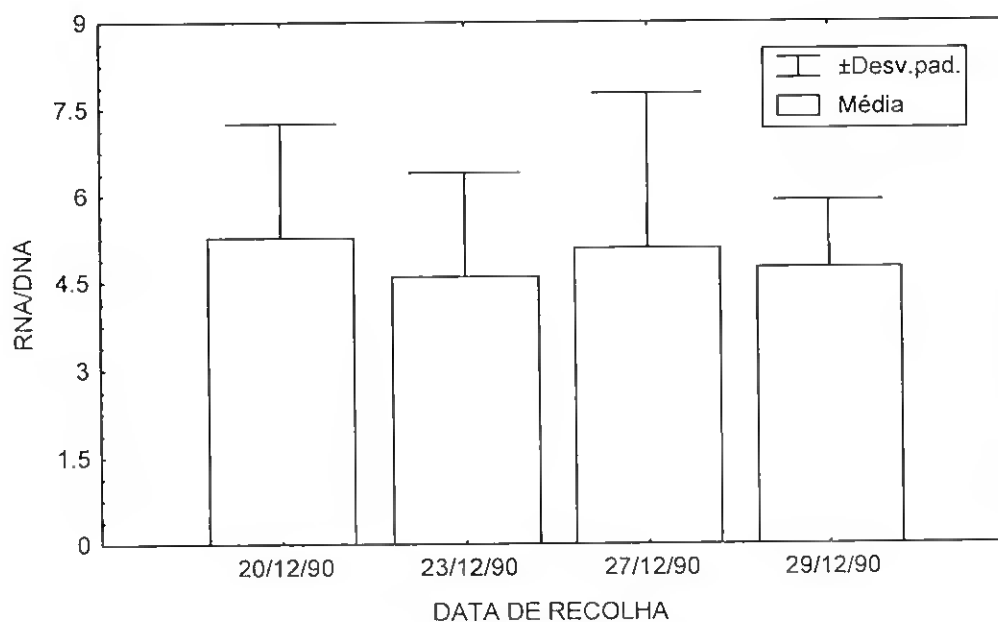


Figura 4.56 - Variação da razão RNA/DNA nas larvas de sardinha recolhidas em Dezembro de 1991.

A aplicação da análise hierárquica, utilizando os índices bioquímicos resultantes do cruzeiro realizado entre Abril e Maio, diferenciou três grupos de estações. O primeiro deles mostrou-se essencialmente formado por estações do transecto de Albufeira e por estações paralelas à costa, mas próximas geograficamente do referido transecto. O segundo e terceiro grupos mostraram-se constituídos pelas restantes estações paralelas à costa e também pelas estações do transecto do Guadiana (Figura 4.57).

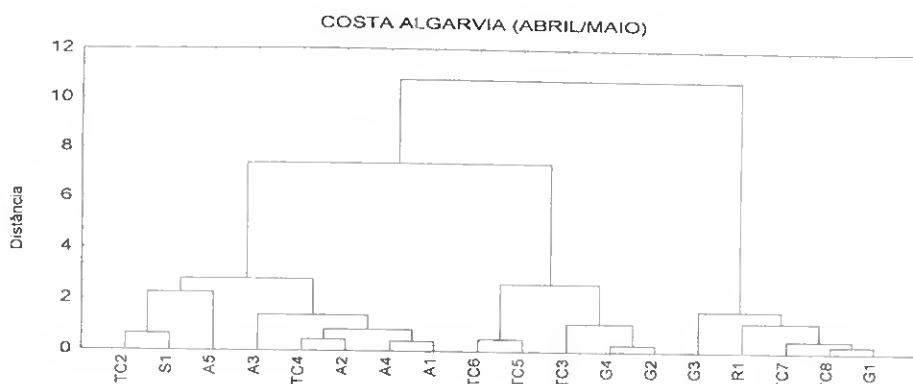


Figura 4.57 - Dendrograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa algarvia (Abril/Maio 1992) com base nos índices bioquímicos das larvas de sardinha recolhidas.

No transecto de Sagres a densidade de larvas recolhidas foi muito baixa. No transecto da Ria as larvas capturadas apresentavam dimensões muito reduzidas. Estes aspectos determinaram o número limitado de larvas analisado nesses locais, comparativamente aos transectos do Guadiana e Albufeira.

A aplicação de uma ANOVA, aos resultados dos índices bioquímicos obtidos, revelou a existência de diferenças significativas entre as larvas dos diferentes transectos efectuados ao longo da costa algarvia, nomeadamente a nível de DNA/mg, RNA/Pins ($p < 0.002$), Pins/DNA ($p < 0.001$) e de RNA/DNA ($p < 0.0001$) (Figura 4.58).

Relativamente à razão RNA/DNA, o teste de Tukey indicou que os transectos de Albufeira e de Guadiana diferiram de forma significativa entre si ($p < 0.0001$). De facto, enquanto nas estações deste último transecto, o RNA/DNA revelou o valor médio mais baixo (2.26 ± 0.41), em Albufeira atingiu-se o valor médio mais elevado (4.77 ± 1.79) (Figura 4.59). Foram as estações mais afastadas da costa que apresentaram os valores de RNA/DNA superiores, nomeadamente em A5 (5.41 ± 0.58) e A6 (5.55 ± 1.49) (Figura 4.75). Nos restantes transectos ocorreram valores intermédios, nomeadamente de 2.90 ± 0.22 para a Ria e de 2.83 ± 0.37 em Sagres. Nas estações efectuadas paralelamente à costa, o valor mais elevado de RNA/DNA registou-se na estação TC4 (4.66 ± 2.72), a mais próxima geograficamente das estações que integraram o transecto de Albufeira (Figura 4.60-4.61).

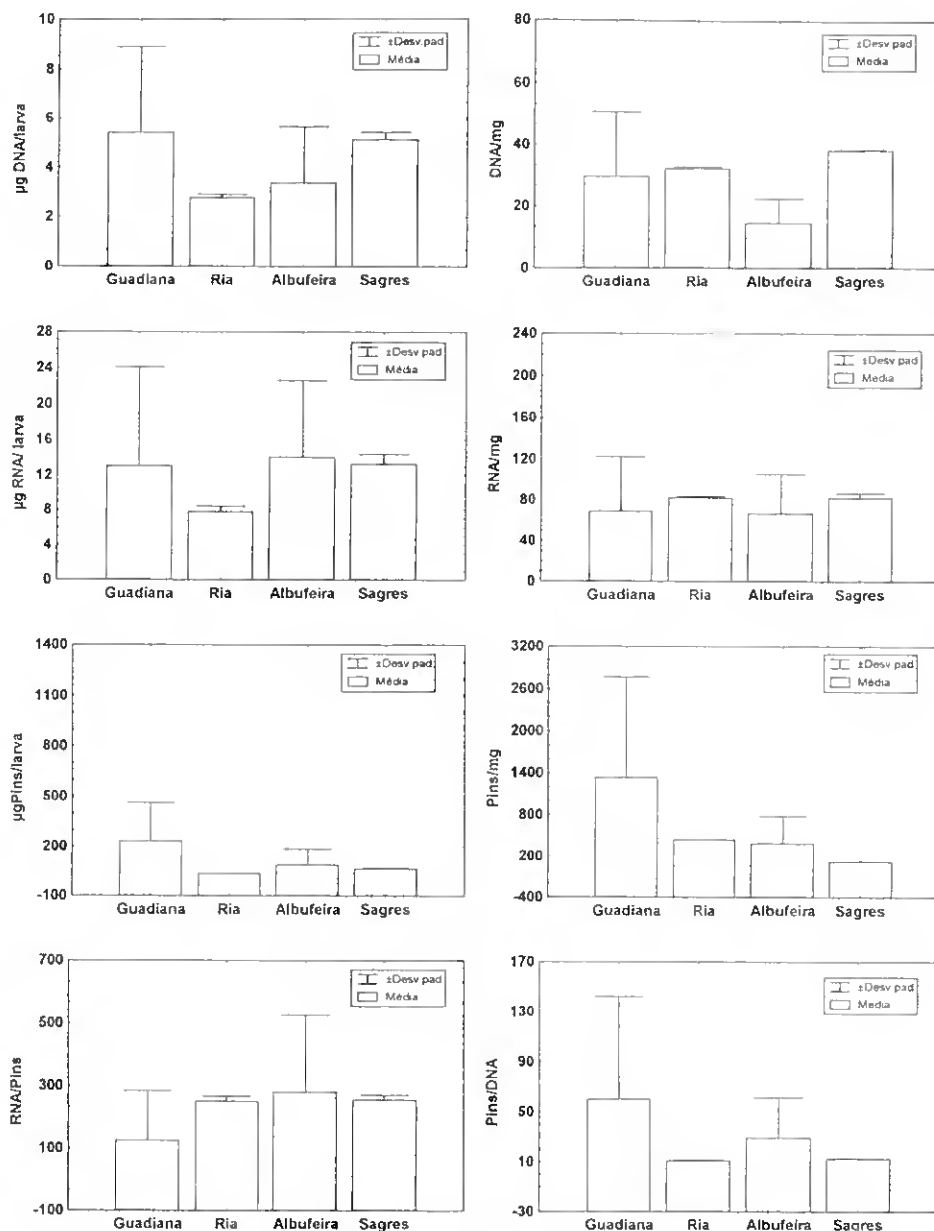


Figura 4.58 - Variação dos diferentes parâmetros analisados em larvas de *S. pilchardus* provenientes dos vários transectos realizados entre Abril e Maio de 1992.

Os maiores valores do índice referido, no transecto de Albufeira, estão associados ao valor médio mais elevado de RNA, nomeadamente 14.1 µg/larva e um dos mais baixos valores de DNA, ou seja 3.39 µg/larva (Figura 4.58). De forma inversa, foi no transecto do Guadiana que se verificou o valor médio mais elevado de DNA/larva, ou seja 5.42 µg e um dos mais baixos de RNA/larva, 13 µg.

O teste de Tukey também revelou diferenças significativas entre os transectos do Guadiana e de Albufeira a nível da concentração de DNA expressa por mg de peso seco ($p < 0.0001$). O valor médio mais reduzido ocorreu no transecto de Albufeira ($14.49\mu\text{g}/\text{mg} \pm 7.87$) e o máximo em Sagres ($37.93\mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.40$) (Figura 4.58). Nas estações efectuadas paralelamente à costa os valores mais elevados encontraram-se nas estações de sotavento, concretamente em TC7 ($41.39\mu\text{g}/\text{mg} \pm 15.44$) e TC8 ($40.2\mu\text{g}/\text{mg} \pm 12.01$) (Figura 4.60).

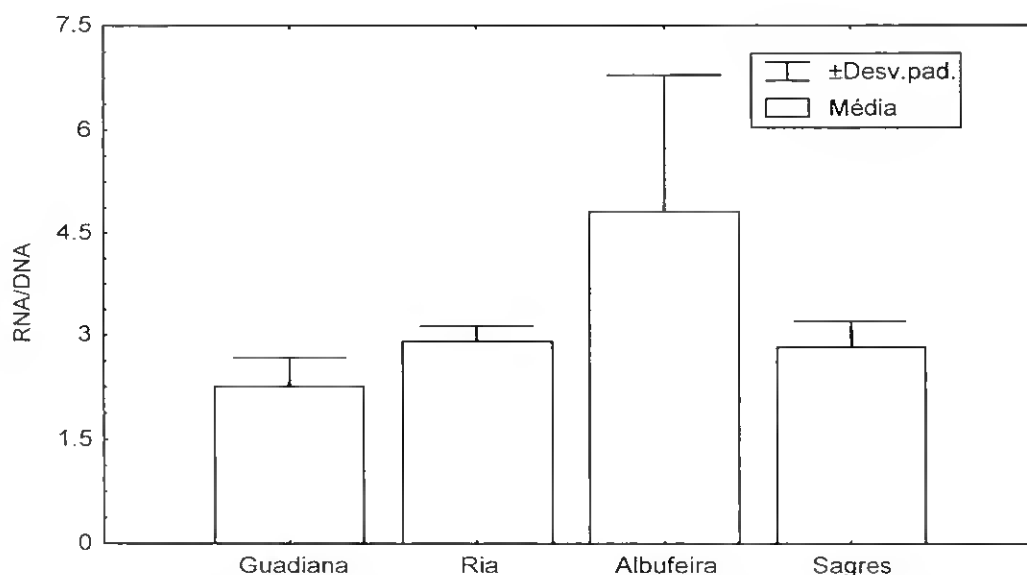


Figura 4.59 - Variação da razão RNA/DNA analisada em larvas de *S. pilchardus* provenientes dos diferentes transectos realizados entre Abril e Maio de 1992.

Da mesma forma, a razão RNA/Pins diferiu significativamente entre os transectos referidos (Anexo III - Tabela 10) ($p < 0.013$). Foi no transecto de Albufeira que se registou a média mais elevada, nomeadamente com $279.73 (\pm 245.61)$, enquanto que no do Guadiana calculou-se o seu valor mais baixo, $126.39 (\pm 159.03)$.

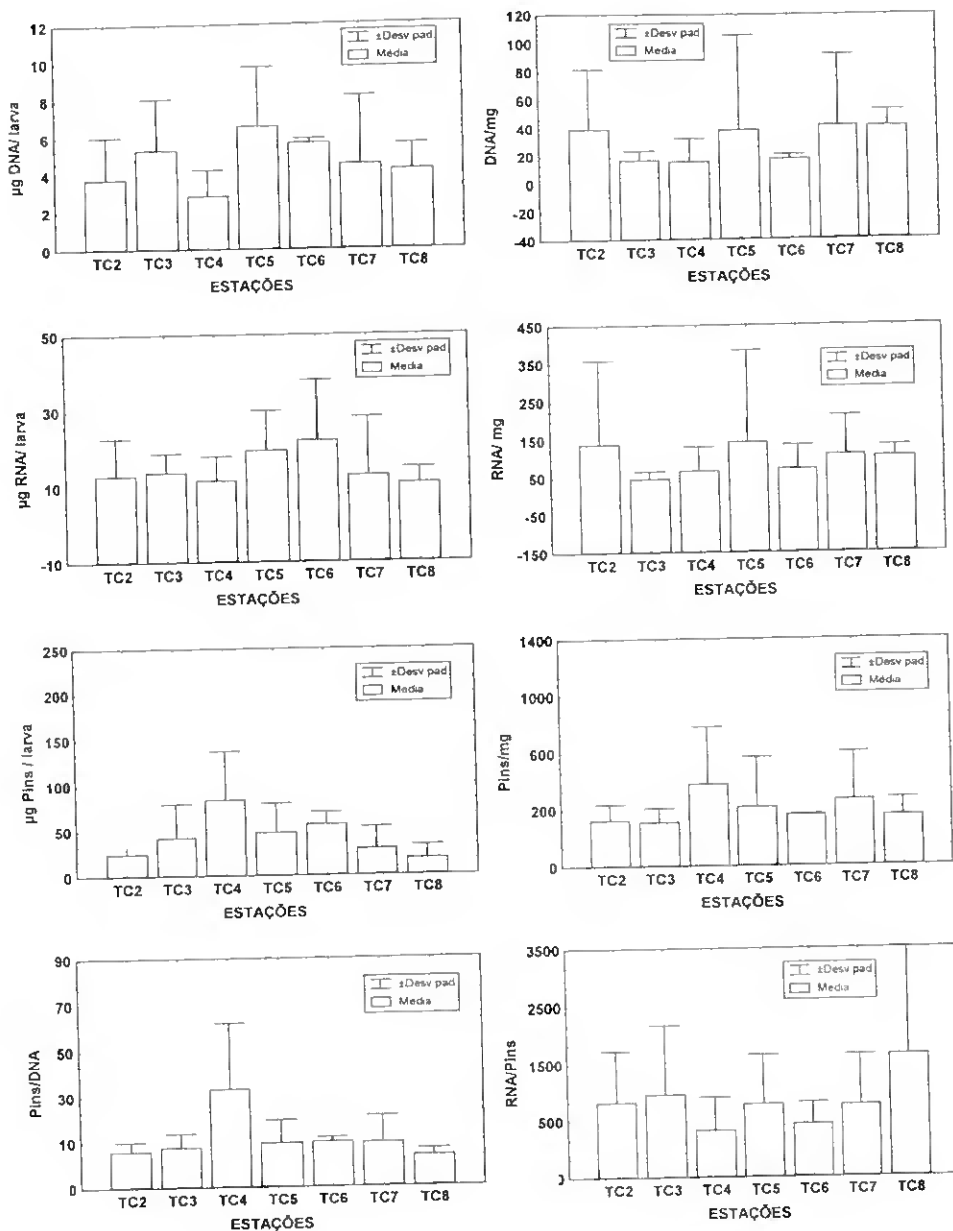


Figura 4.60 - Variação de distintos parâmetros analisados em larvas de *S. pilchardus* provenientes das diferentes estações realizadas paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Também relativamente ao índice Pins/DNA, se verificaram diferenças significativas entre os transectos do Guadiana e de Albufeira ($p=0.011$) (Anexo III - Tabela 11), tendo o valor médio mais elevado sido registado no Guadiana (60 ± 82.33) e o mais inferior na Ria Formosa (11.27 ± 0.42) (Figura 4.58).

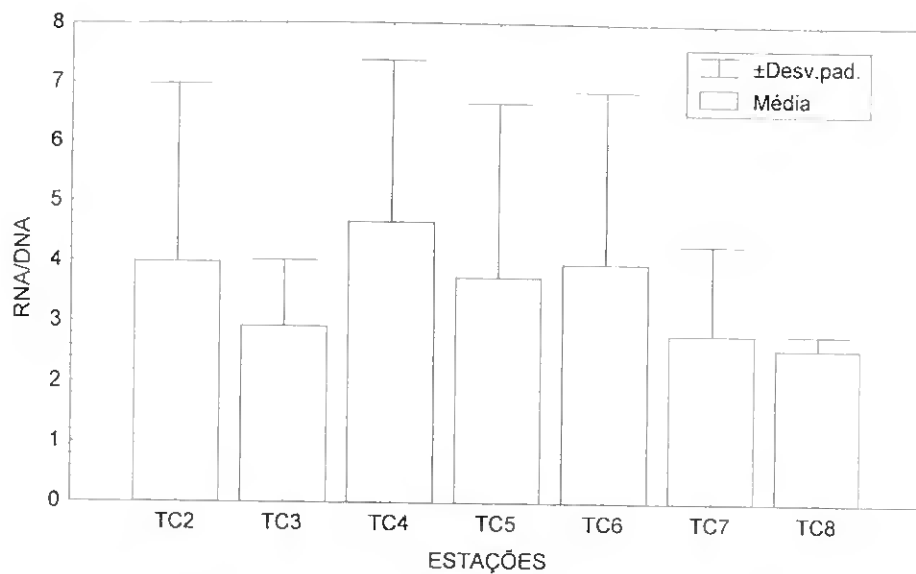


Figura 4.61 - Variação da razão RNA/DNA analisada em larvas de *S. pilchardus* provenientes das diferentes estações realizados paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Em função da maior abundância de larvas nos transectos do Guadiana e de Albufeira, tal como se referiu anteriormente, só se construíram os histogramas dos índices bioquímicos por estação, nesses transectos.

Na estação G2, no transecto do Guadiana, capturaram-se larvas de distintas dimensões, incluindo indivíduos de comprimento bastante reduzido, pelo que se registaram também alguns teores relativamente baixos das principais macromoléculas analisadas, DNA, RNA e Proteína insolúvel (Figuras 4.62, 4.64, 4.65, 4.67).

Por outro lado, para a estação G2, nas larvas aí recolhidas determinaram-se razões RNA/DNA muito baixas, enquanto que o índice DNA/mg revelou valores bastante elevados, um comportamento inverso ao observado na estação G3 (Figuras 4.63 e 4.66). Em relação à razão Pins/DNA foi na estação G2 que se capturaram as larvas com os valores mais elevados deste índice, sendo que os valores mais elevados de Pins/larva também se registaram em larvas recolhidas nesse local (Figura 4.67 a 4.70).

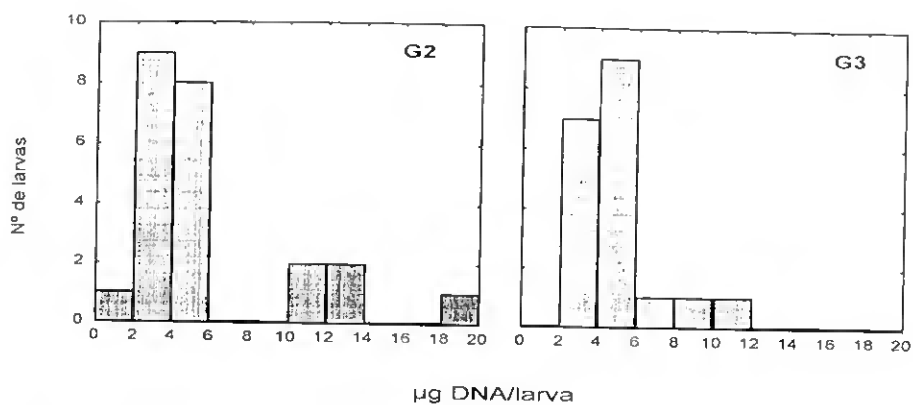


Figura 4.62 - Distribuição de frequências de $\mu\text{g DNA/larva}$ em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

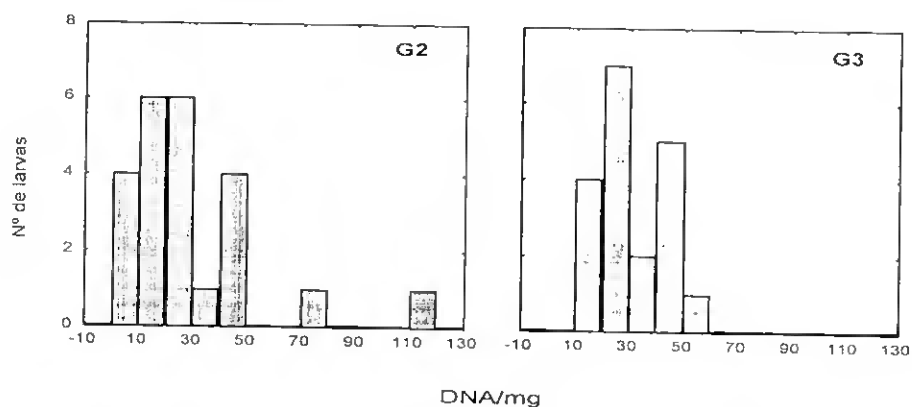


Figura 4.63 - Distribuição de frequências de DNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

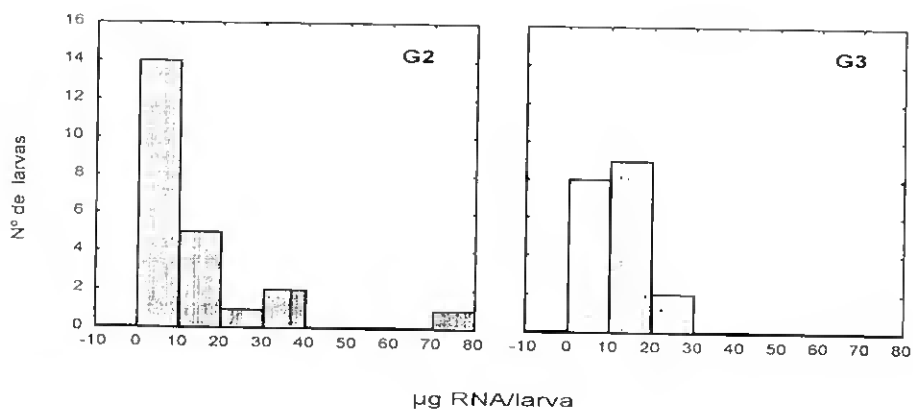


Figura 4.64 - Distribuição de frequências de $\mu\text{g RNA/larva}$ em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

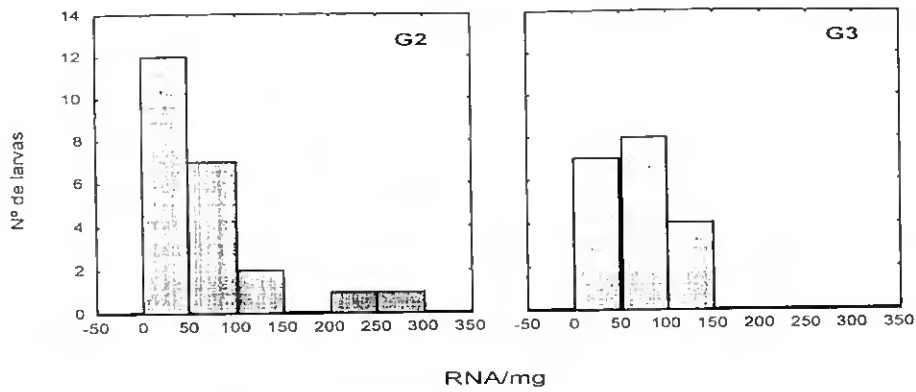


Figura 4.65- Distribuição de frequências de RNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

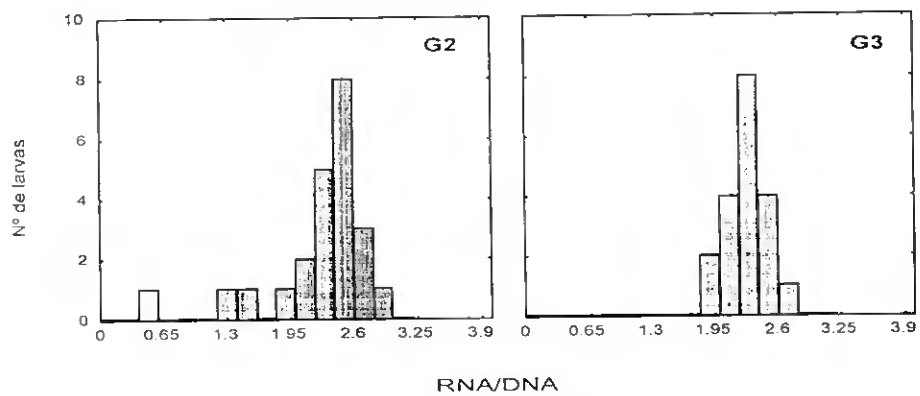


Figura 4.66 - Distribuição de frequências de RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

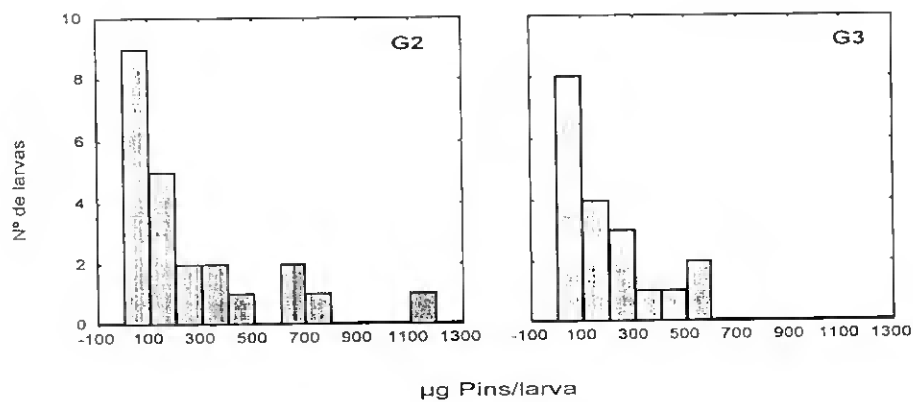


Figura 4.67 - Distribuição de frequências de µg Pins/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

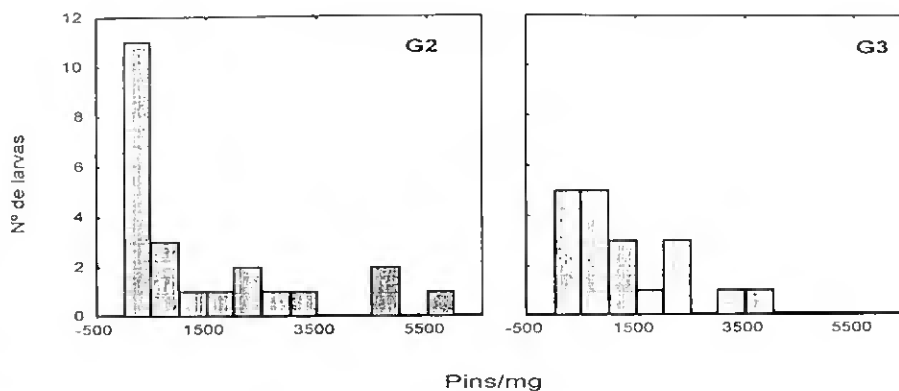


Figura 4.68 - Distribuição de frequências de Pins/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

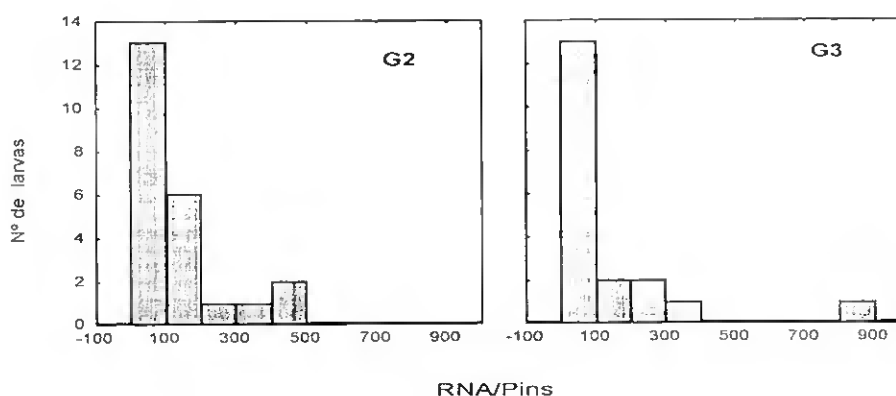


Figura 4.69 - Distribuição de frequências de RNA/Pins em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

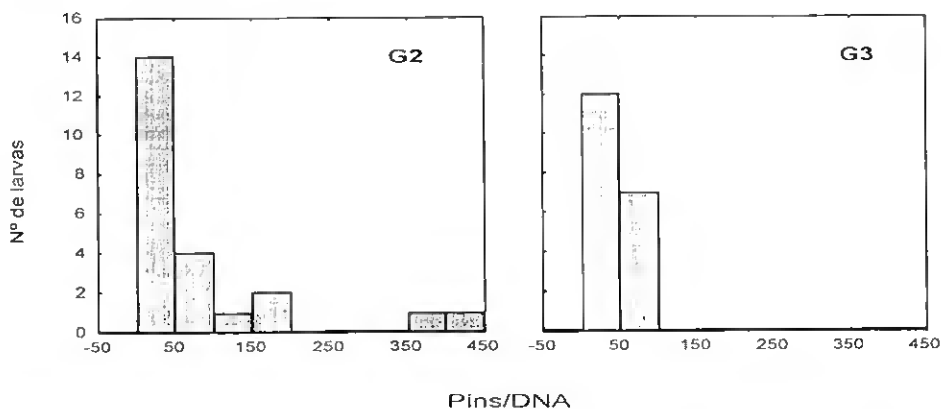


Figura 4.70 - Distribuição de frequências de Pins/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.

Nas estações do transecto de Albufeira verificou-se uma maior variabilidade dos índices bioquímicos analisados, comparativamente ao transecto do Guadiana (Figuras

4.71 a 4.79). Numa mesma estação, como por exemplo a A3, existiram larvas que apresentaram dos valores mais baixos de RNA/DNA do transecto enquanto que outros indivíduos evidenciaram valores bastante elevados (Figura 4.75).

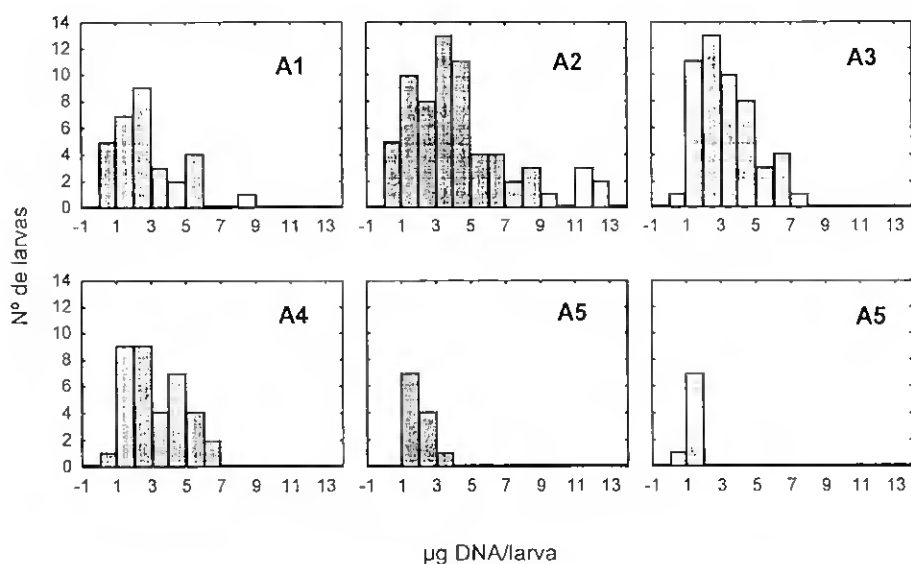


Figura 4.71 - Distribuição de frequências de $\mu\text{g DNA/larva}$ em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

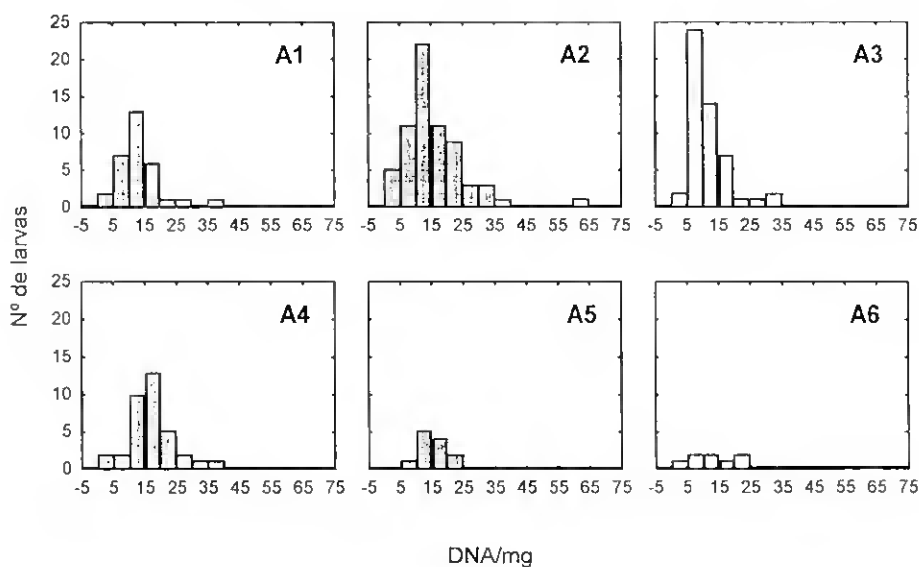


Figura 4.72 - Distribuição de frequências de DNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

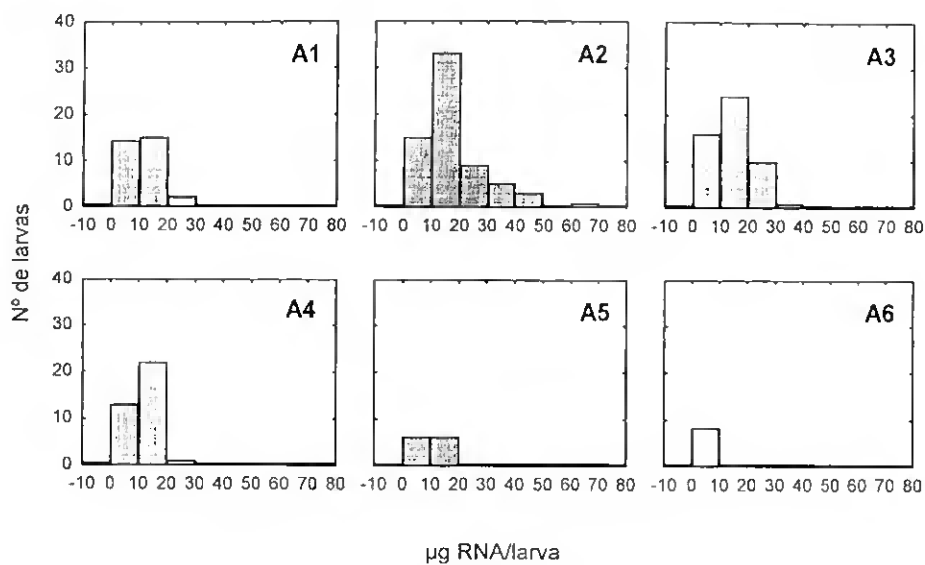


Figura 4.73 - Distribuição de frequências de $\mu\text{g RNA/larva}$ em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

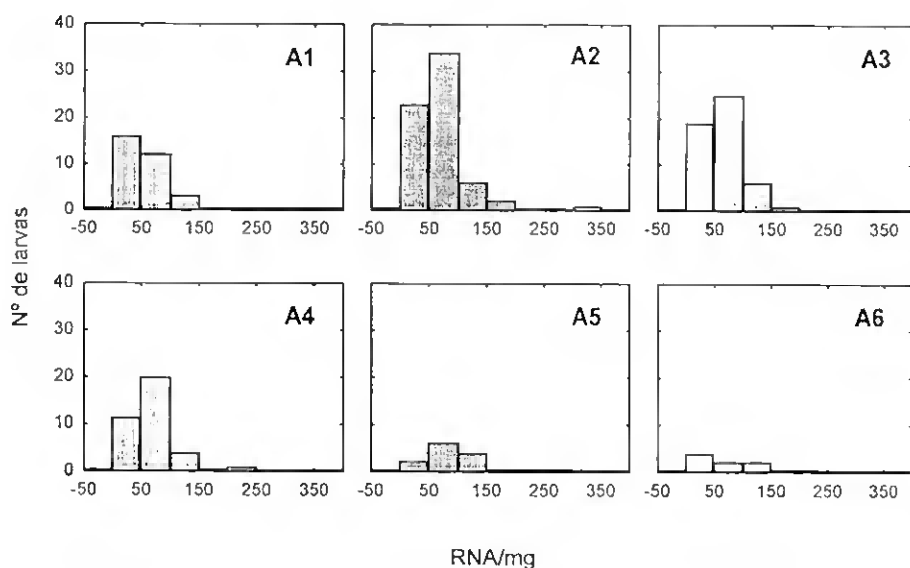


Figura 4.74 - Distribuição de frequências de RNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

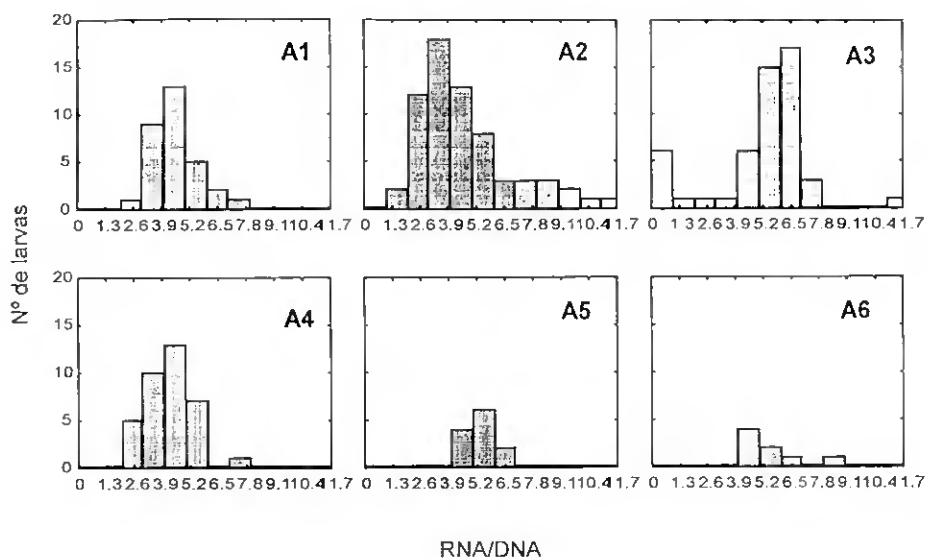


Figura 4.75 - Distribuição de frequências de RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

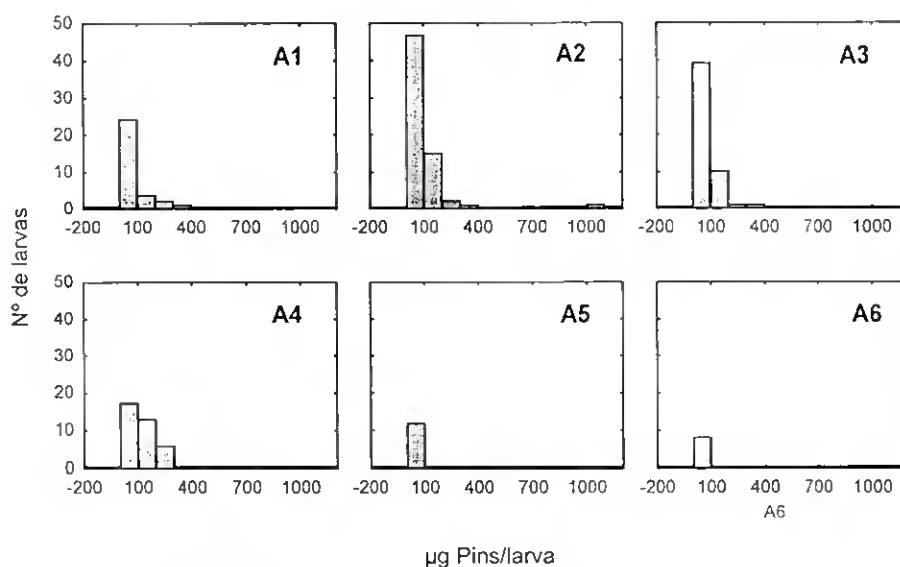


Figura 4.76 - Distribuição de frequências de µg Pins/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

As correlações determinadas entre os índices analisados e os parâmetros ambientais apresentam-se no Anexo IV. Salienta-se o número superior de correlações significativas que se estabeleceu entre a razão RNA/DNA e as variáveis bióticas e abióticas estudadas, comparativamente aos outros índices.

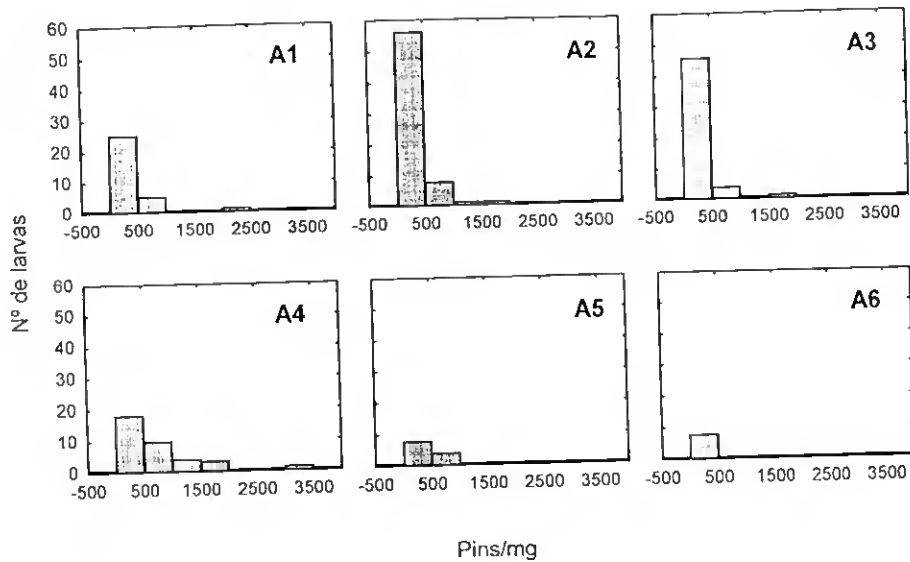


Figura 4.77 - Distribuição de frequências de Pins/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

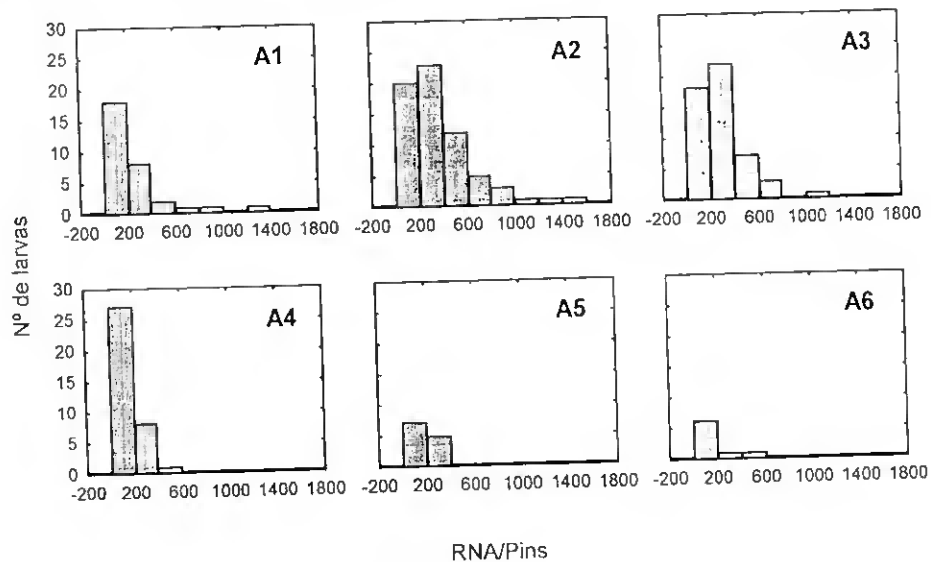


Figura 4.78 - Distribuição de frequências de RNA/Pins em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

A utilização da análise por componentes principais permitiu avaliar a relação entre os diferentes índices, tendo sido notada, por um lado, uma associação entre RNA/larva, DNA/larva e comprimento e por outro entre RNA/DNA, RNA/mg, DNA/mg, RNA/Pins, O/P e O/C (Figura 4.80 e Tabela IV.6).

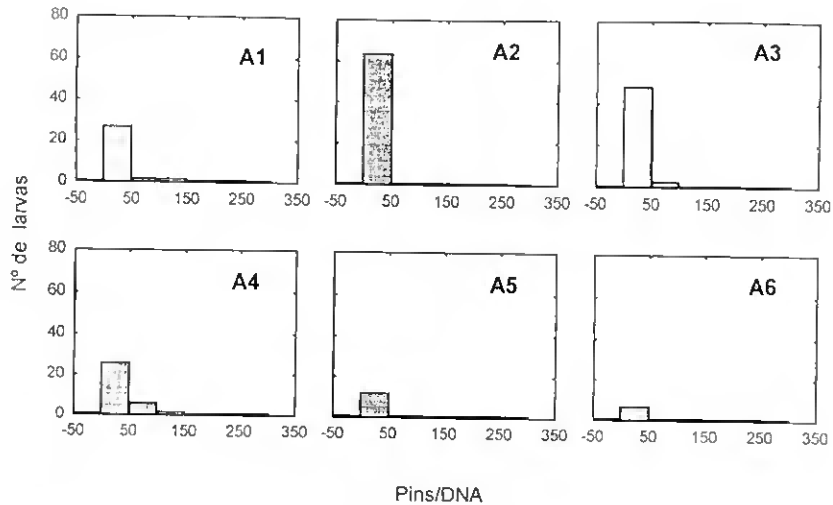


Figura 4.79 - Distribuição de frequências de Pins/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

Por outro lado, este tipo de análise, comparativamente aos restantes índices, revelou uma associação preferencial da razão RNA/DNA com os parâmetros abióticos e bióticos estudados (Figura 4.81 e Tabela IV.7).

Tabela IV.6 - Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos e morfométricos.

EIXOS	VALOR PRÓPRIO	%TOTAL VARIÂNCIA	V.PRÓPRIO ACUMULADO	%VARIÂNCIA ACUMULADA
1	3.116	25.974	3.116	25.974
2	2.386	19.883	5.502	45.858
3	1.873	15.615	7.376	61.474
4	1.462	12.18	8.839	73.660
5	1.187	9.894	10.02	83.554

Tabela IV.7 - Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos e morfométricos e os dados bióticos e abióticos.

EIXOS	VALOR PRÓPRIO	%TOTAL VARIÂNCIA	V.PRÓPRIO ACUMULADO	%VARIÂNCIA ACUMULADA
1	5.997	26.075	5.997	26.075
2	4.360	18.9587	10.357	45.033
3	2.895	12.589	13.253	57.622
4	2.348	10.212	15.602	67.835
5	1.773	7.712	17.376	75.548
6	1.239	5.389	18.615	80.937

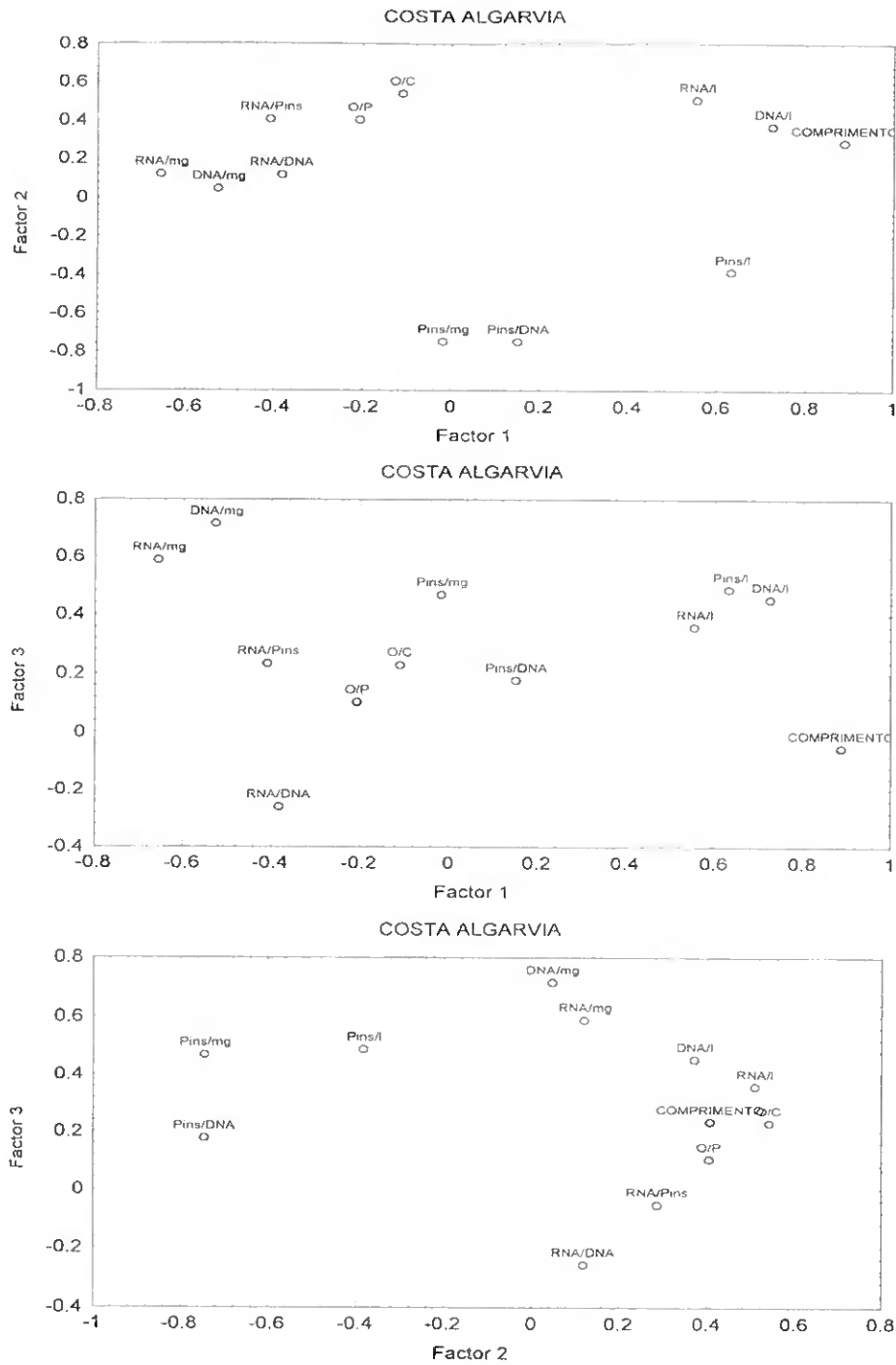


Figura 4.80 - Análise por componentes principais dos dados bioquímicos e do comprimento em larvas de *S. pilchardus* provenientes da costa algarvia. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.

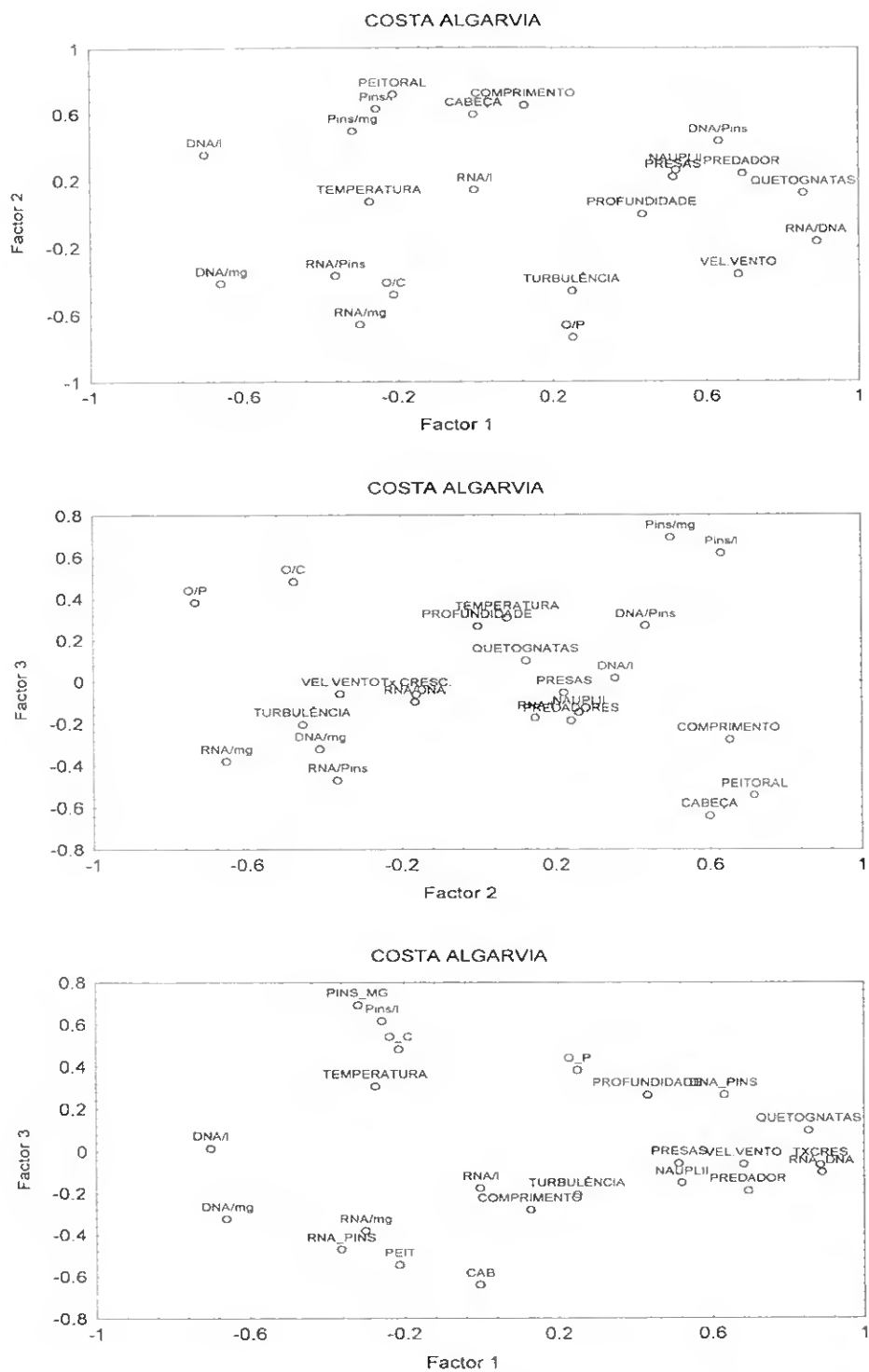


Figura 4.81 - Análise por componentes principais dos parâmetros bioquímicos em larvas de *S. pilchardus*, dos dados bióticos e abióticos, na costa algarvia. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.

Com base nos resultados da análise multivariada e dos coeficientes de correlação entre as diferentes variáveis estudadas (Anexo IV), tentou-se obter um modelo de regressão que explicasse a variabilidade da razão RNA/DNA, nos vários locais amostrados na costa algarvia, através dos parâmetros abióticos e bióticos. Assim, para cada estação calculou-se a média das razões RNA/DNA das larvas analisadas, o que se associou aos parâmetros abióticos e bióticos que mais se relacionaram com este índice, nomeadamente a temperatura da água, a velocidade do vento, a densidade de *nauplii* e de quetognatas.

Nesta perspectiva, numa primeira análise determinou-se qual a variação explicada por cada um dos vários parâmetros abióticos e bióticos estudados, e posteriormente experimentaram-se diferentes associações entre eles.

Desta forma, verificou-se que a densidade de quetognatas (**Q**) explicava 56.02% da variação de RNA/DNA:

$$\text{RNA / DNA} = 2.956 + 0.002\text{Q} \quad (r=0.749, n=17, p<0.001)$$

enquanto que a velocidade do vento (**V**) explicou 37.2% da variação:

$$\text{RNA / DNA} = 0.996 + 0.626\text{V} \quad (r=0.610, n=17, p<0.007)$$

e a densidade de *nauplii*, (**N**) explicou 18.5% da variação:

$$\text{RNA / DNA} = 3.403 + 0.0002\text{N} \quad (r=0.430, n=17, p<0.074)$$

e a temperatura (**T**) foi responsável apenas por 11.44% da variação:

$$\text{RNA / DNA} = 11,851 - 0,513\text{T} \quad (r=-0.338, n=17, p<0.17)$$

Por outro lado, ao adicionarmos a variável densidade de quetognatas à velocidade do vento, a variação explicada aumentou para 60.23% (Tabela IV. 8):

$$\text{RNA / DNA} = 1.650 + 0.3448V + 0.015Q$$

Tabela IV.8 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: velocidade do vento, densidade de quetognatas.

R= 0.806 R ² = 0.649 R ² ajustado =0.602 n=17					
F(2,15)=13.873 p<0.001 Erro padrão da estimativa: 0.699					
	t(15)	correlação parcial	B	Erro padrão de B	p
Intercepção	2.346		1.65	0.703	0.033
Vel. vento	1.948	0.449	0.345	0.177	0.050
Quetognata	3.442	0.664	0.002	0.001	0.004

Contudo, a análise dos resíduos mostrou que estes apresentavam um comportamento curvilíneo, pelo que foi necessário a introdução de um termo quadrático ou de grau superior, transformando a regressão linear em polinomial. Assim, após várias tentativas, verificou-se que a introdução do termo quetognatas ao cubo, (Quetognata)³ aumentava a variação explicada e diminuía o problema anterior verificado na análise de resíduos.

Assim, a adição do termo quetognatas elevado ao cubo (Q³), aumentou a variação explicada para 69.87% pelo que se chegou ao modelo (que se resume na Tabela IV.9):

$$\text{RNA / DNA} = 2.065 + 0.167V + 0.004Q - 10^{-7} Q^3$$

No entanto, com esta conjugação o coeficiente da variável velocidade do vento deixou de ser significativo (p<0.344) (Tabela IV.9), ou seja, através do teste t de student (t) não se rejeitou a H₀, que refere que este coeficiente não é significativamente diferente de zero.

Tabela IV.9 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: velocidade do vento, densidade de quetognatas e (quetognatas) ³.

R= 0.867 R ² = 0.752 R ² ajustado= 0.699 n=17					
F(3,15)=14.138 p<0.001 Erro padrão da estimativa: 0.609					
	t(15)	correlação parcial	B	Erro padrão de B	p
Intercepção	3.247		2.065	0.636	0.006
Vel. vento	0.98	0.253	0.167	0.179	0.344
Quetognata	3.599	0.693	0.004	0.001	0.001
(Quetognata) ³	-2.408	-0.541	-10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	0.003

Por outro lado verificou-se que a introdução da variável temperatura da água, em substituição da velocidade do vento, aumentou a variância explicada e o seu coeficiente passou a ser significativo. Por esse motivo o modelo final proposto é o seguinte (Figura 4.82 e Tabela IV.10):

$$\text{RNA / DNA} = 9.24 - 0.409T + 0.005Q - 2 * 10^{-9} Q^3$$

Convém referir que não ocorreu qualquer aumento da variação explicada, dada pelo R² ajustado, com a introdução de mais variáveis independentes, nomeadamente com a densidade de *nauplii*. A adição de um número considerável de variáveis independentes não é muito aconselhável no caso de amostras pequenas, como a deste estudo.

A adição de novas variáveis independentes com alto grau de correlação com alguma das variáveis independentes já existentes pareceu não contribuir para explicar a variância. Com efeito, o termo *nauplii* correlacionou-se significativamente com os quetognatas (r=0.613) (Anexo V).

Tabela IV.10 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: temperatura, densidade de quetognatas e (densidade de quetognatas)³.

R= 0.898 R ² = .807 R ² ajustado= 0.7654 n=17					
F(3,15)=19.483 p<0.001 Erro padrão da estimativa: 0.537					
	t(15)	correlação parcial	B	Erro padrão de B	p
Intercepção	3.196		9.24	2.891	0.007
Temperatura	-0.228	-0.517	-.0409	0.179	0.039
Quetognata	5.531	0.783	0.005	0.001	0.001
(Quetognata) ³	-3.577	-0.683	-2x10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	0.003

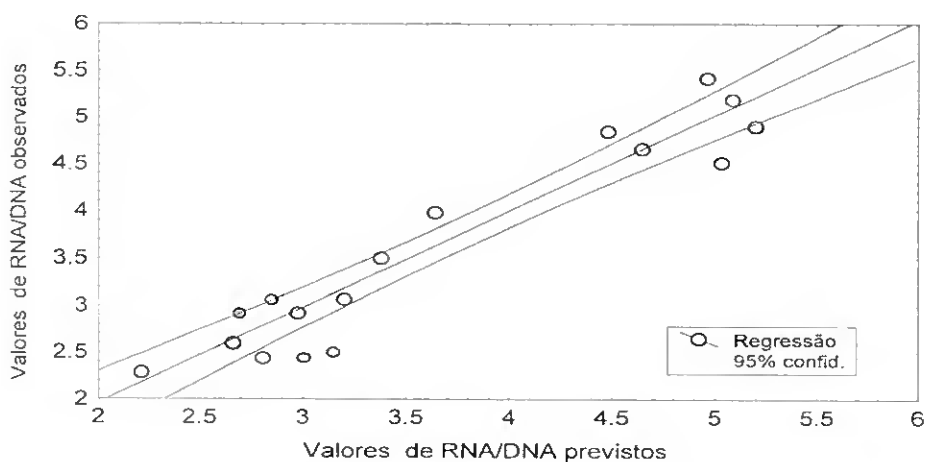


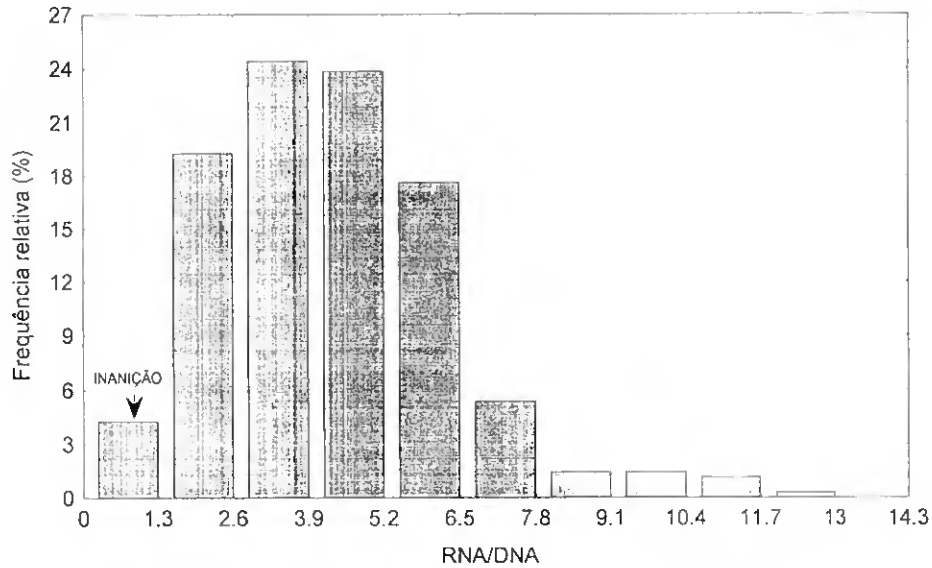
Figura 4.82- Relação entre os valores médios de RNA/DNA observados, para as larvas de sardinha recolhidas na costa algarvia, e os valores previstos pela regressão múltipla.

3.1.6 - Percentagem de larvas em inanição (RNA/DNA<1.3)

De acordo com a experiência de validação (Capítulo III) a percentagem total de larvas com o índice RNA/DNA inferior a 1.3 ("nível crítico"), foi de 0% em Dezembro de 1991 e de 4.6% entre Abril e Maio de 1992 (Figura 4.83). Relativamente aos resultados por estação, verificou-se que na maioria das estações não se encontraram larvas em inanição, com excepção das estações 2 e 3 do transecto de Albufeira, da estação 2 do transecto do Guadiana, e da estação 1 do transecto de Sagres, onde a

percentagem de larvas em nessa situação foi de 1.45%, 12.39% e 8.7% e 12.5% respectivamente.

A.



B.

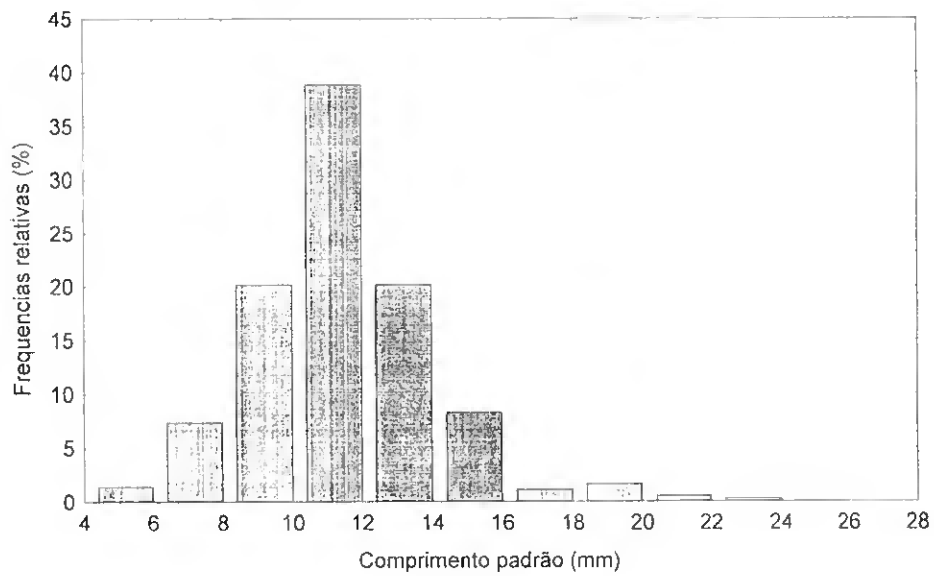


Figura 4.83 - Frequências relativas da (A). razão RNA/DNA e do (B). comprimento em função dos dados globais referentes às larvas de sardinha analisadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992 (n=414).

Os resultados relativos à percentagem de inanição por classe de comprimento evidenciaram que a classe com o valor mais elevado foi entre os 8 e 16 mm, enquanto que o intervalo de comprimento inferior a 8 mm, no qual se inserem as larvas no período de transição apresentou percentagens de larvas em inanição relativamente baixas, o mesmo acontecendo para a classe de maiores dimensões, ou seja entre 16 e 24 mm (Tabela IV.11 a IV.13)

Tabela IV.11 - Percentagens de inanição das larvas de sardinha, recolhidas em 1992 na costa algarvia, por transecto e por classe de comprimento

Comprimento	Guadiana	Ria	Albufeira	Sagres	Total
<8 mm	0	0	0	8.33% (2/24)	0.66% (2/302)
8-16 mm	0	4.17% (1/24)	2.83% (6/212)	4.17% (1/24)	2.6% (8/302)
16-24 mm	2.38% (1/42)	0	0.94% (2/212)	0	1% (3/302)
Total	2.38% (1/42)	4.17% (1/24)	3.77% (8/212)	12.5% (3/24)	4.3% (13/302)

3.1.7 - Taxa de crescimento proteico

A taxa de crescimento proteico variou entre valores negativos, -2.46%/dia até valores de 76.29 %/dia (Figura 4.84). Quando se compararam os vários transectos realizados na costa algarvia relativamente à taxa de crescimento proteico, verificaram-se diferenças significativas entre eles, sendo o de Albufeira o que mais contribuiu para a existência dessas diferenças, uma vez que diferiu de todos os outros, como foi demonstrado pelo teste de Tukey ($p=0.001$). De facto, foi neste transecto que se determinaram as taxas de crescimento proteico mais elevadas, sendo a média dos valores de todas as estações de 19.8%/dia (± 9.59). No transecto do Guadiana registaram-se os valores mais baixos, com uma média de 7.48%/dia (± 1.99), enquanto

que no transecto da Ria a média foi de 11.28%/dia (± 0.85) e no de Sagres 12.26%/dia (± 1.19) (Figura 4.86).

Tabela IV.12- Percentagens de inanição das larvas de sardinha, recolhidas em 1992 na costa algarvia nas estações paralelas à costa, por classe de comprimento.

Comprimento	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6	TC7	TC8	Total
<8 mm	7.4% (2/27)	0	0	0	0	0	0	1.79% (2/112)
8-16 mm	3.7% (1/27)	0	4.17% (1/34)	7.14% (1/14)	0	10% (1/10)	0	3.57% (4/112)
16-24 mm	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	11.1% (3/27)	0	4.17% (1/34)	7.14% (1/14)	0	10% (1/10)	0	5.36% (6/112)

Tabela IV.13- Percentagens de inanição das larvas de sardinha, recolhidas em 1992 na costa algarvia nas estações do transecto de Albufeira, por classe de comprimento.

Comprimento	A1	A2	A3	A4	A5	A6
<8 mm	0	0	0	0	0	0
8-16 mm	0	1.45% (1/69)	8.88% (5/57)	0	0	0
16-24 mm	0	0	3.51% (2/57)	0	0	0
Total	0	1.45% (1/69)	12.39% (7/57)	0	0	0

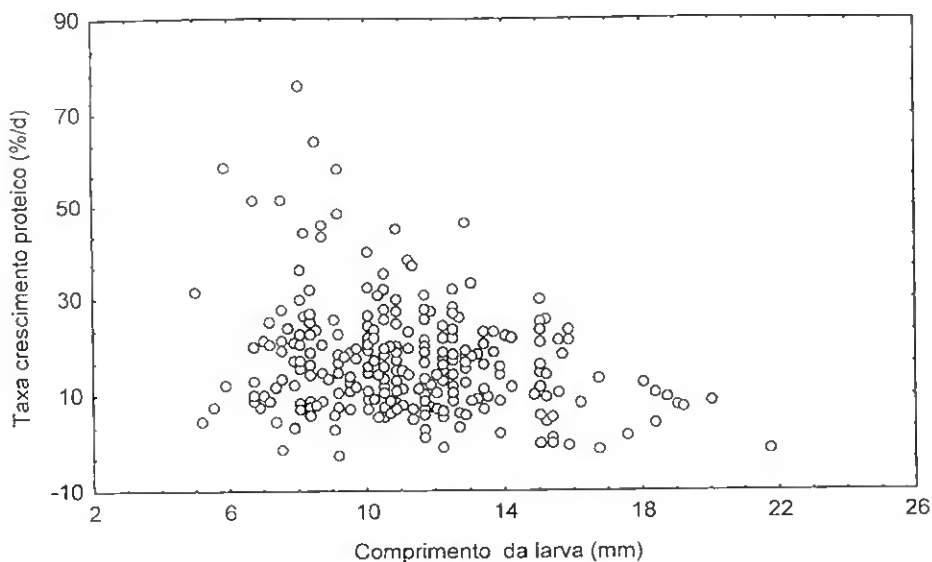


Figura 4.84 - Variação geral da taxa de crescimento proteico (%/dia) com o comprimento das larvas de sardinha capturadas na costa algarvia.

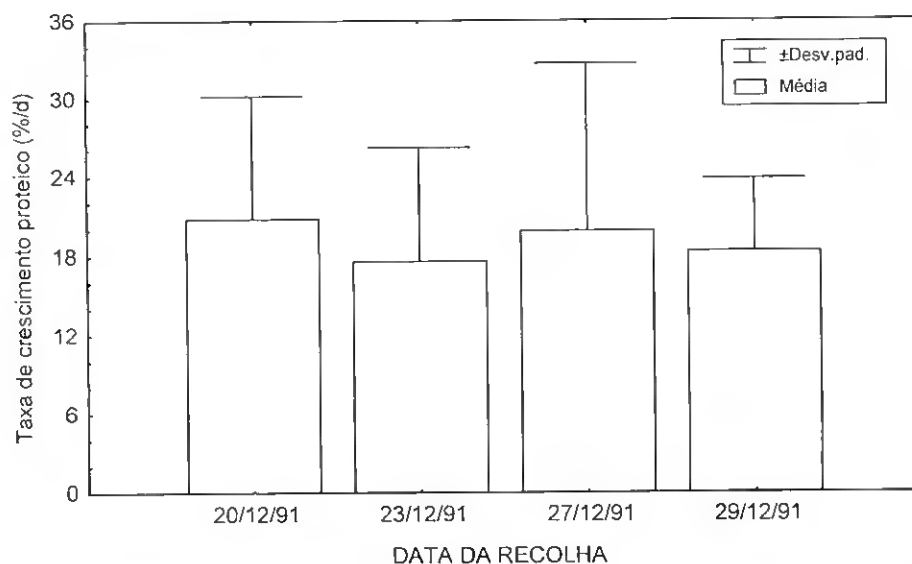


Figura 4.85 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia em Dezembro de 1991.

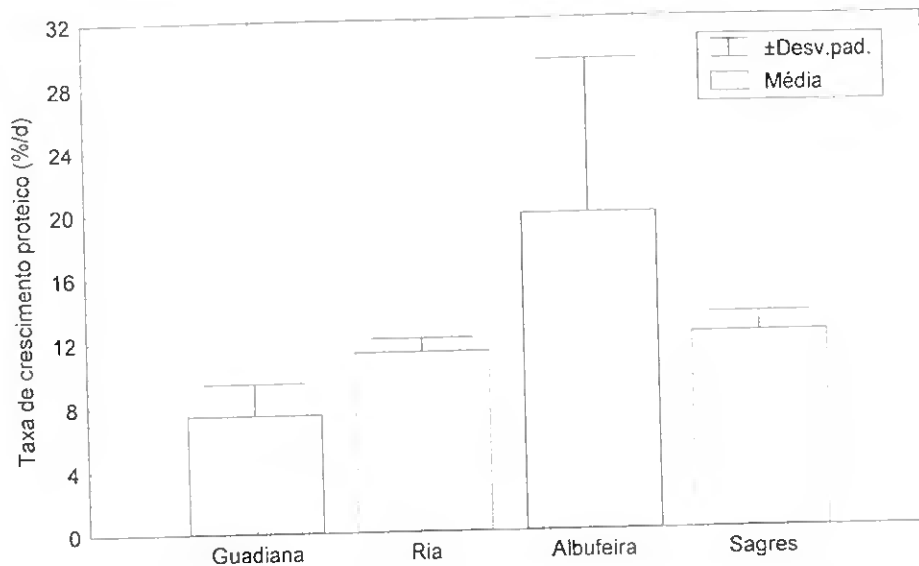


Figura 4.86 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Também foi na zona de Albufeira (estação TC4), nas estações amostradas paralelamente à costa, que se registou a média mais elevada da taxa de crescimento proteico 18.73%/d(±12.90) (Figura 4.89), à semelhança do que se verificou com a razão RNA/DNA.

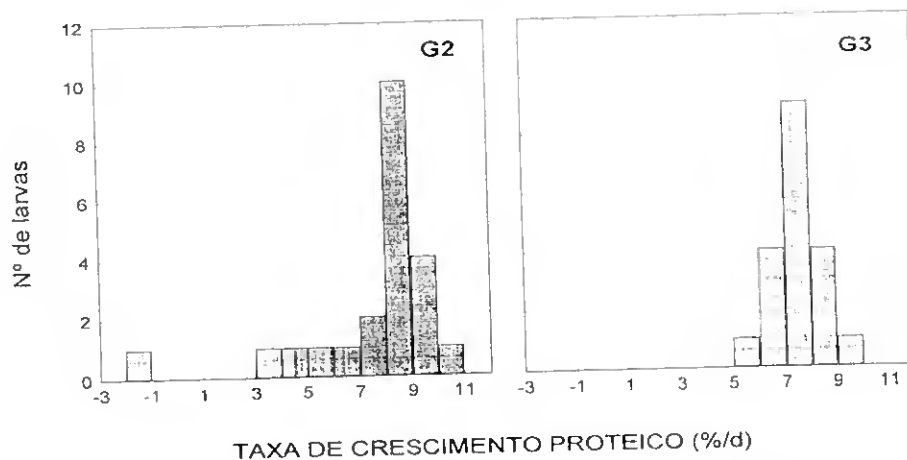


Figura 4.87 - Distribuição das larvas de *S. pilchardus*, recolhidas nas estações do transecto do Guadiana, pelas classes de taxa de crescimento proteico (%/dia), entre Abril e Maio de 1992.

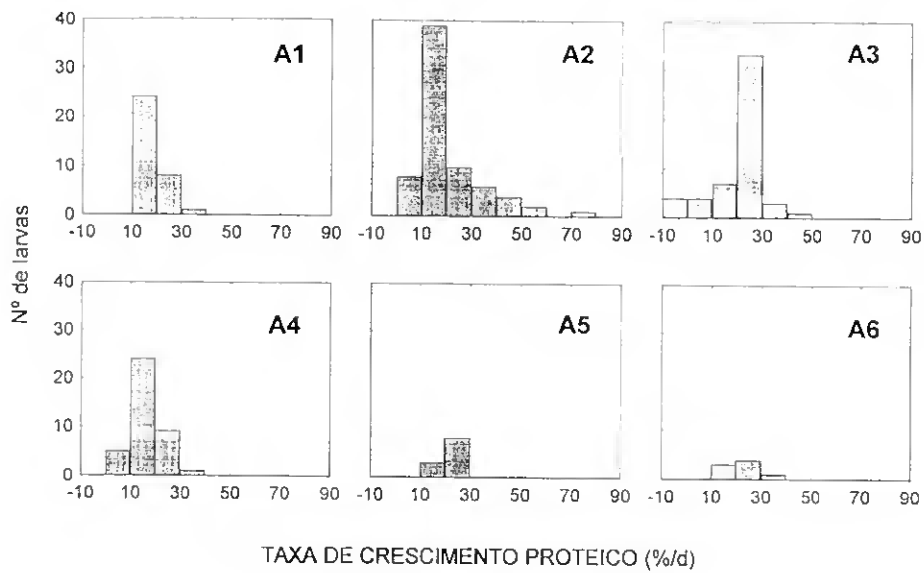


Figura 4.88-Distribuição das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira, pelas classes de taxa de crescimento proteico (%/dia), entre Abril e Maio de 1992.

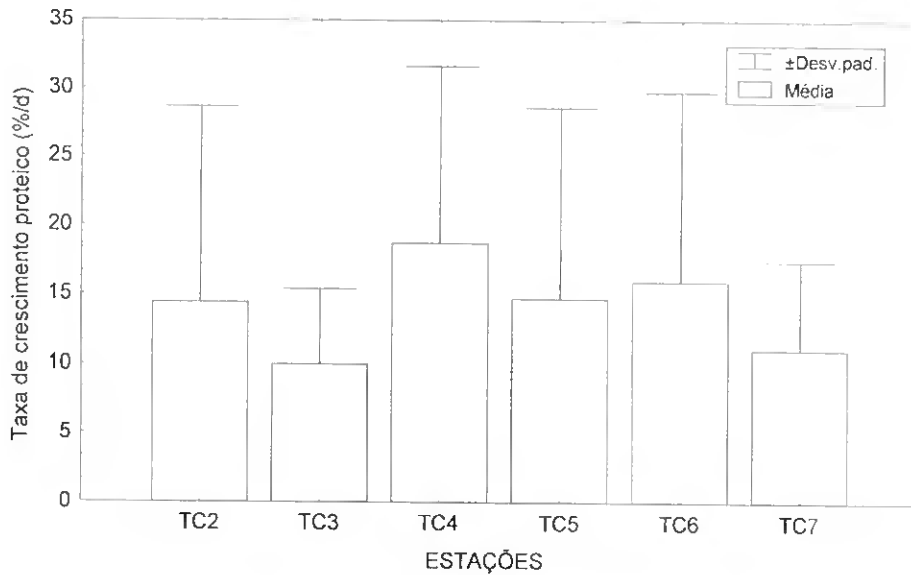


Figura 4.89 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus*, nas recolhas realizadas paralelamente à costa algarvia, entre Abril e Maio de 1992

3.1.8 - Padrão geral de variação das concentrações dos ácidos nucleicos e proteína insolúvel com o comprimento

As relações entre os ácidos nucleicos e as proteínas insolúveis o comprimento das larvas, recolhidas em 1991 e 1992 na costa algarvia, foram exponenciais e as equações que exprimem essas relações são as seguintes (todos os coeficientes indicados são significativos, $p < 0.05$):

- $\mu\text{g DNA/larva}$ versus comprimento da larva (mm) (Figura 4.90)

$$y = e^{((-0.379) + (0.149) \cdot x)} \quad (r=0.716; \text{variação explicada}=51.3\%; n= 510)$$

- $\mu\text{g RNA/larva}$ versus comprimento da larva (mm) (Figura 4.91)

$$y = e^{((1.185) + (0.1245) \cdot x)} \quad (r=0.624; \text{variação explicada}=38.95\%; n= 510)$$

- $\mu\text{g Pins/larva}$ versus comprimento da larva (mm) (Figura 4.92)

$$y = e^{((1.168) + (0.23) \cdot x)} \quad (r=0.602; \text{variação explicada}=36.3\%; n= 510)$$

A variação geral da concentração de DNA com o comprimento das larvas apresentou apenas ligeiras flutuações no âmbito total dos dados. A quantidade de DNA por larva parece apresentar variações pequenas, ultrapassando raras vezes o nível de $5\mu\text{g}$ de DNA, até ao comprimento de 10mm. No entanto, a partir desse comprimento verifica-se um incremento mais acentuado da quantidade de DNA por larva, podendo atingir valores da ordem dos $20\mu\text{g}$ em larvas com comprimentos de 22mm. A evolução da quantidade de RNA e de proteína insolúvel por larva relativamente ao comprimento, apesar de revelar uma tendência para um comportamento semelhante ao DNA, apresenta uma maior variabilidade. No que respeita à razão RNA/DNA, esta mostrou-

se relativamente independente do comprimento (Figura 4.93), obtendo-se um valor de r não significativo ($p > 0.3$).

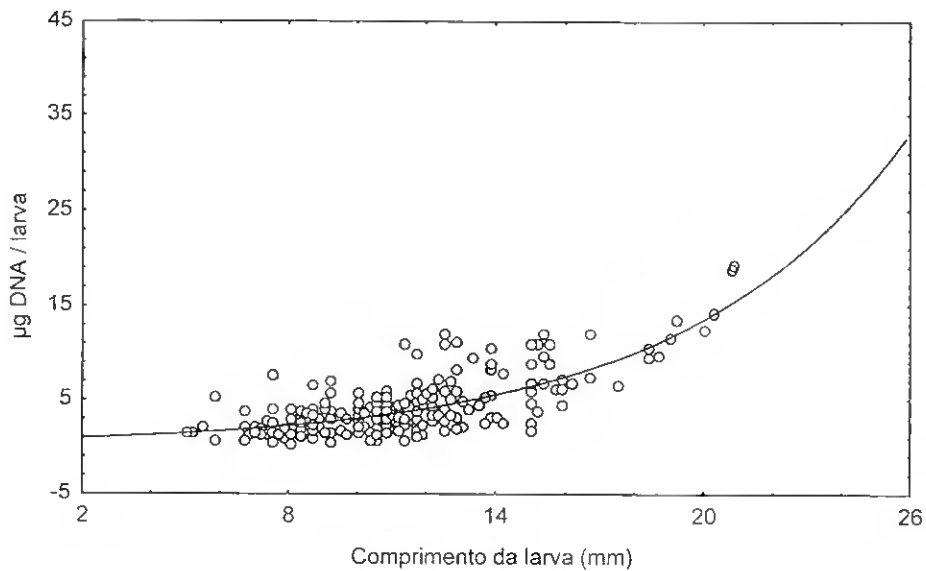


Figura 4.90 - Relação exponencial entre μg de DNA/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.

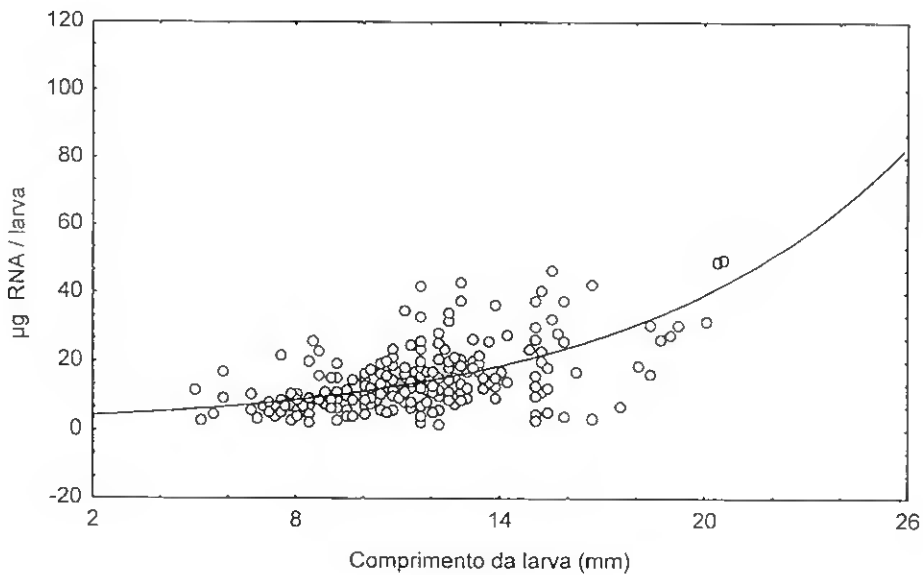


Figura 4.91 - Relação exponencial entre μg de RNA/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.

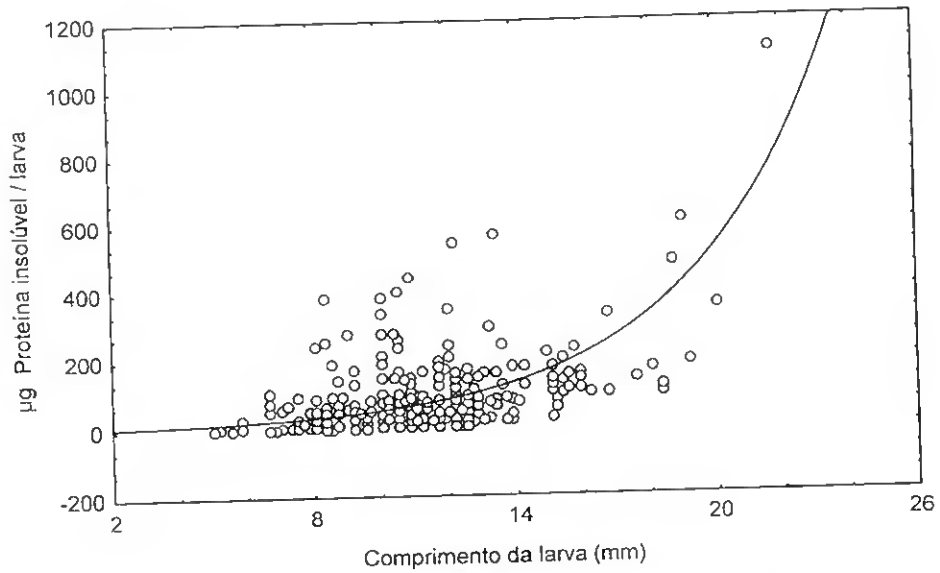


Figura 4.92- Relação exponencial entre μg de Pins/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.

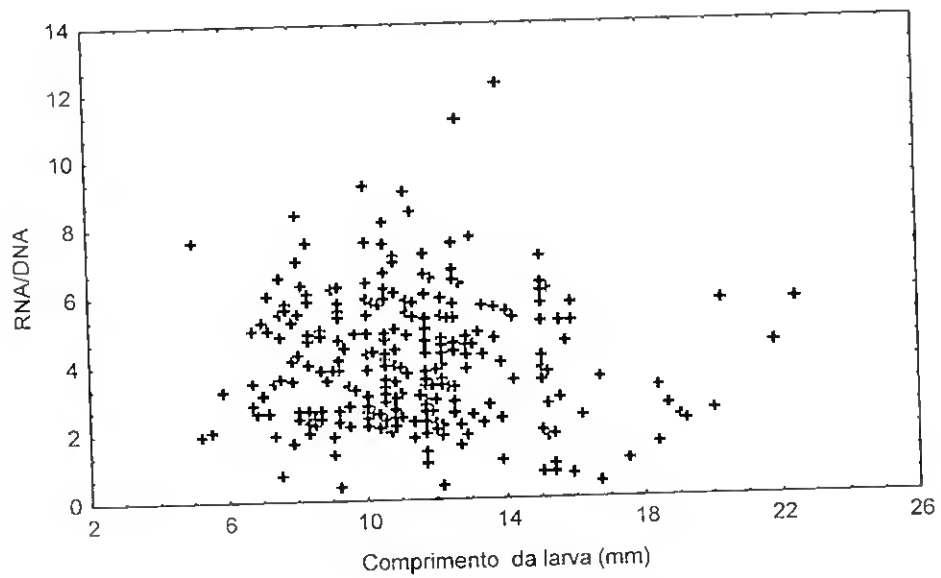


Figura 4.93 - Relação entre a razão RNA/DNA e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.

3.2- Costa espanhola

3.2.1- Parâmetros abióticos

Durante o cruzeiro realizado entre Abril e Maio de 1991 as temperaturas da água superficial mais elevadas registaram-se ao largo de San Sebastian (área 1) com valores superiores a 12.6 °C. As temperaturas mais baixas (11.9°C) ocorreram nas áreas 2 e 3. Esta distribuição da temperatura resultou da presença de uma massa de água fria ao longo da costa Noroeste na secção Cabo Finisterra/Ortegal e um núcleo de água mais quente a Este. De acordo com o relatório preliminar realizado sobre este cruzeiro, as águas mais frias encontraram-se em zonas onde ocorreu afloramento (LOPEZ-JAMAR *et al*, 1991).

Relativamente ao ano 1992, no mês de Março, as temperaturas mais baixas da água superficial verificaram-se na área 1 (>12.0°C). Neste mês registou-se um nítido aumento das temperaturas superficiais de Este para Oeste. No mês de Abril, esta tendência manteve-se. Durante o mês de Maio registaram-se temperaturas relativamente altas em quase todas as áreas estudadas, mas os valores mais elevados (>15.7°C) encontraram-se na área 1. A zona entre Gijon e Cabo Ortegal encontrava-se, de acordo com o relatório desse cruzeiro (NELLEN, 1992), provavelmente sob a influência de afloramento como sugerem as temperaturas superficiais mais baixas. Durante o cruzeiro seguinte, no fim de Maio e princípio de Junho, as temperaturas superficiais mais elevadas registavam-se a Oeste de Bilbao (>17.5°C). Uma zona de água mais fria (<15°C) estendia-se desde La Coruna e envolvia o Cabo Ortegal (COOMBS, 1992).

Por outro lado, e analisando a temperatura de água superficial apenas, nas estações onde foram recolhidas larvas para análise bioquímica verificou-se a existência de diferenças significativas a nível da temperatura entre os anos de 1991 e 1992 ($p < 0.009$) e entre os meses de 1992 ($p < 0.001$).

A temperatura superficial da água medida no ano de 1991 foi, em média, inferior ($12.4^{\circ}\text{C} \pm 0.3$) à registada no ano de 1992 ($14.8^{\circ}\text{C} \pm 1.8$). Deve-se salientar, no entanto, que em 1991 se amostrou apenas em Maio, enquanto que a amostragem em 1992 se realizou desde Março a Junho. No ano de 1992, verificou-se uma subida gradual da temperatura média da água com o decorrer dos meses (Figura 4.94). Assim em Março a temperatura média da água, nas estações onde se recolheram larvas para análise bioquímica, foi de $12.5^{\circ}\text{C} (\pm 0.3)$, em Abril foi de $12.3^{\circ}\text{C} (\pm 0.1)$, em Maio foi de $15^{\circ}\text{C} (\pm 0.5)$ e em Junho foi de $17.9^{\circ}\text{C} (\pm 0.5)$.

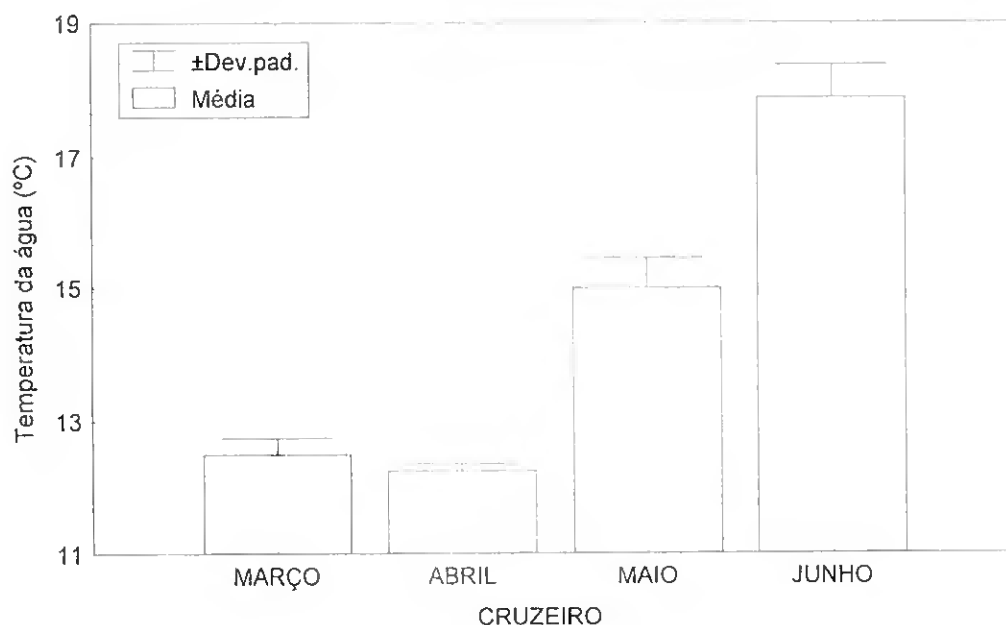


Figura 4.94 - Variação da temperatura da água superficial ao longo dos meses em 1992 na costa espanhola, apenas nas estações onde se recolheram larvas de sardinha.

3.2.2- Distribuição das larvas

A distribuição geral das larvas de sardinha, obtida durante o cruzeiro de 1991, descrita no relatório preliminar do projecto SARP (LOPEZ-JAMAR, *et al.* 1991), revelou abundâncias mais elevadas ao longo da costa Norte. As larvas foram relativamente escassas na zona circundante do Cabo Ortegal e na zona Sudoeste e Sul até Vigo. As abundâncias mais elevadas foram registadas na área 2, ou seja para Oeste de Santander.

Relativamente ao ano de 1992, e de acordo com os relatório de cruzeiro (COOMBS, 1992; NELLEN, 1992) o padrão da distribuição das larvas foi similar ao ano anterior, ou seja, as maiores densidades ocorreram na costa Norte. Em Março as abundâncias mais elevadas (>200 larvas/m²) foram registadas a Este do Cabo Ortegal, embora agregados pequenos, de densidade elevada, também estivessem presentes junto à costa de Santander e Bilbao. Durante o mês de Abril as densidades mais elevadas (>200 larvas/m²) registaram-se junto a Santander. A abundância larvar foi, de uma forma geral, muito mais elevada durante este mês do que em Março e verificou-se também uma distribuição mais uniforme, sem a existência de um número tão elevado de agregados. Em Maio esta tendência manteve-se e os valores mais elevados (100-150 larvas/m²) registaram-se na área entre Gijon e o Cabo Ortegal, zona provavelmente sob a influência de afloramento como se referiu. No fim de Maio e princípio de Junho, a densidade de larvas de sardinha decresceu, a distribuição encontrou-se mais dispersa, mas manteve a tendência para valores mais elevados na costa Norte (50-100 larvas/m²) e mais reduzidos para Sul.

3.2.3 - Conteúdo do tubo digestivo

No ano de 1991 não se recolheram larvas nas quais se tivesse detectado alimento no tubo digestivo e o mesmo ocorreu durante os meses de Março e Abril de 1992. Em

Maio e Junho de 1992 as respectivas percentagem de incidência alimentar foram de 3.6% e 7.1%. De facto, como se pode observar nas Figuras 4.95 e 4.96, o número de larvas sem alimento no tubo digestivo é normalmente bastante elevado.

Através da observação do tubo digestivo das larvas à transparência, verificou-se que, qualitativamente, o seu conteúdo era formado por aglomerados vegetais, ovos de invertebrados, *nauplii* e copepoditos.

3.2.4 - Comprimento das larvas e índices bioquímicos

A aplicação da análise hierárquica aos parâmetros em causa, para o ano de 1991, revelou a existência de 3 grupos de estações, um primeiro formado pelas estações E2, E4, E5, E6, E8 da área 2 e um segundo e terceiro formados por estações da área 3, ou seja pelas estações E19, E30, E31, E33, E35, E41, E42 (Figura 4.97).

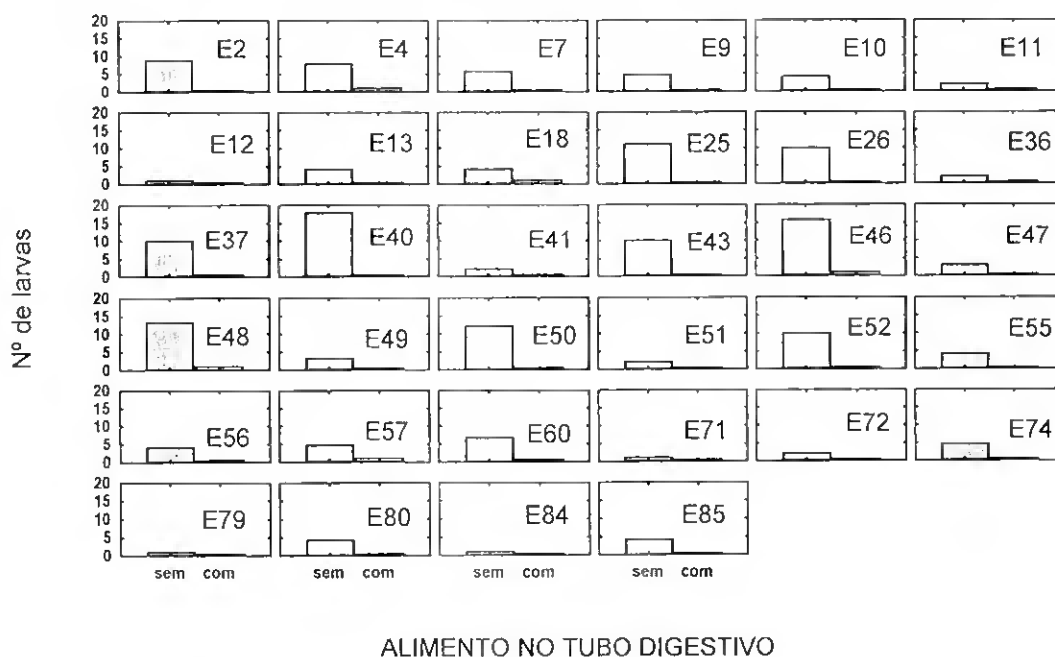


Figura 4.95 - Comparação entre o número de larvas de sardinha com e sem alimento no tubo digestivo nas diferentes estações analisadas (E2 a E85) durante o mês de Maio de 1992 na costa espanhola.



Figura 4.96 - Comparação entre o número de larvas de sardinha com e sem alimento no tubo digestivo nas diferentes estações analisadas (E5 a E62) durante o mês de Junho de 1992 na costa espanhola.

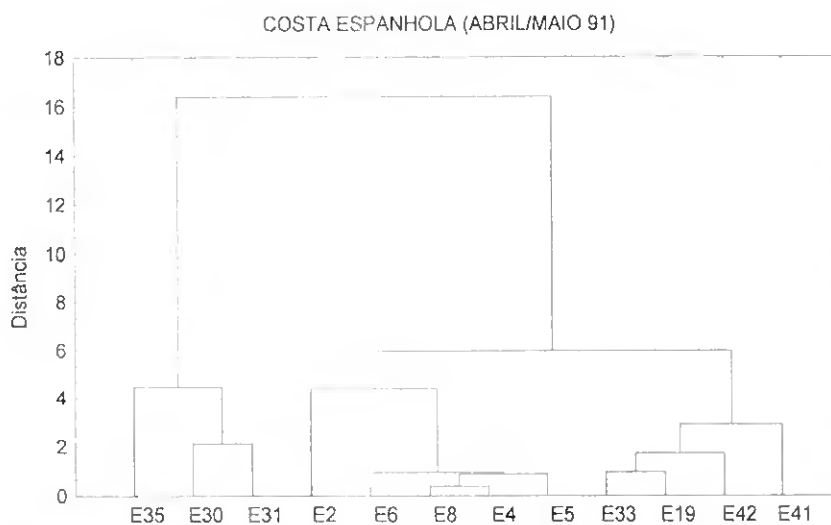


Figura 4.97 - Dendrograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991 em função dos parâmetros analisados.

A maioria dos índices bioquímicos analisados não revelaram diferenças significativas, entre as áreas estudadas, nomeadamente DNA/mg ($p=0.307$), RNA/Pins ($p=0.477$) e Pins/DNA ($p=0.935$). A média de DNA/mg na área 2 foi de $14.16(\pm 6.65)$ e na área 3 de $13.70(\pm 7.98)$. Relativamente à razão RNA/Pins, na área 3 a média foi de

255.08(\pm 95.73) e na área 2 de 212.88(\pm 95.64). No que respeita ao índice Pins/DNA a média foi de 21.13(\pm 18.73) na área 3 e de 19.11(\pm 9.93) na área 2 (Figura 4.98).

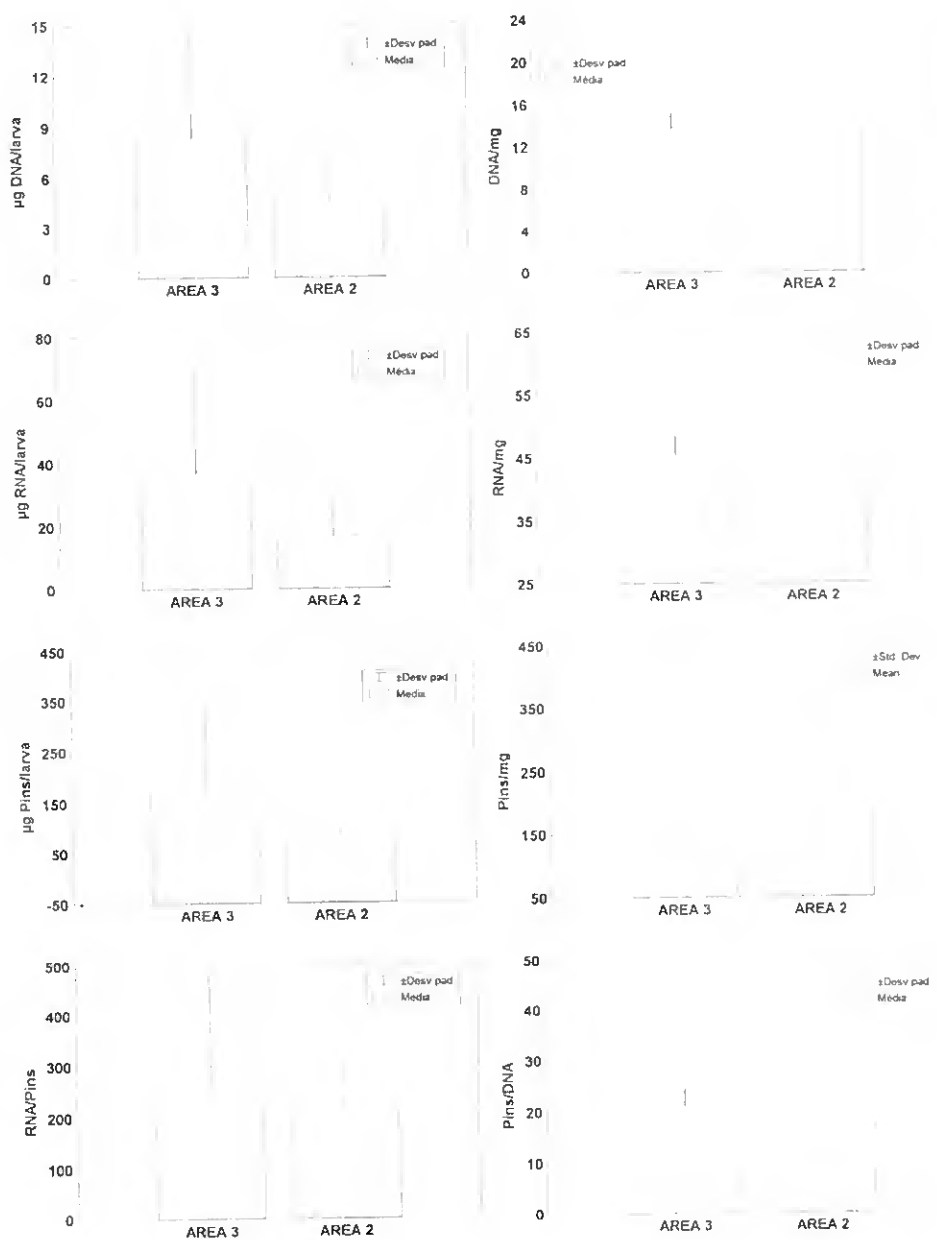


Figura 4.98 - Variação de distintos índices bioquímicos analisados nas larvas de sardinha capturadas nas áreas 1 e 2 da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991.

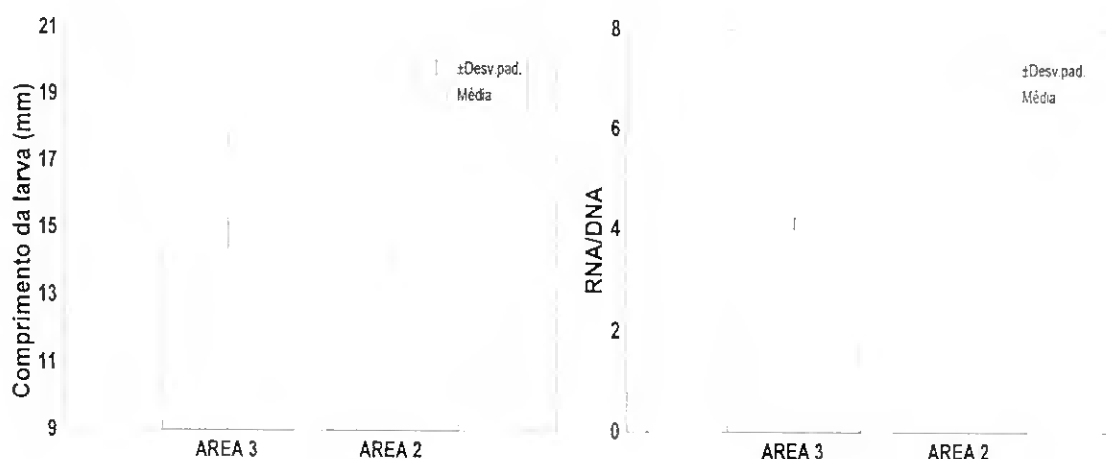


Figura 4.99 - Variação do comprimento e razão RNA/DNA nas larvas de sardinha capturadas em diferentes áreas da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991.

A utilização do teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas na Primavera de 1991, a nível do comprimento da larva ($p=0.001$) e da razão RNA/DNA ($p=0.041$), entre a costa Norte (Gijon-area2) e a costa Noroeste (Coruña-area3). Na costa Norte a razão RNA/DNA apresentou um valor médio de $3.53(\pm 1.33)$ e na costa Noroeste de $4.01(\pm 1.42)$. Relativamente aos comprimentos, a média na área 3 (Coruña) foi de $14.43\text{mm}(\pm 4.21)$ enquanto que na área 2 (Gijon) foi de $12.27\text{mm}(\pm 2.28)$ (Figura 4.99).

Os histogramas quer do comprimento quer dos índices bioquímicos mostram uma certa variabilidade entre larvas capturadas numa mesma estação. De qualquer forma, tal como os valores médios indicaram, as estações mais a Oeste como E35 e E41 apresentaram larvas de maiores dimensões, verificando o oposto para a área 2 (a Este) (Figura 4.100).

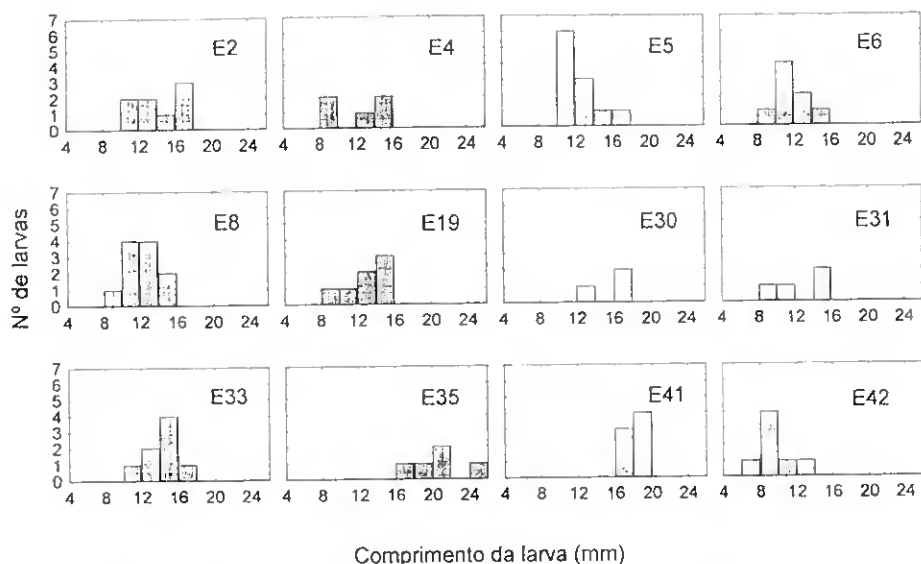


Figura 4.100 - Distribuição de frequências de comprimento das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

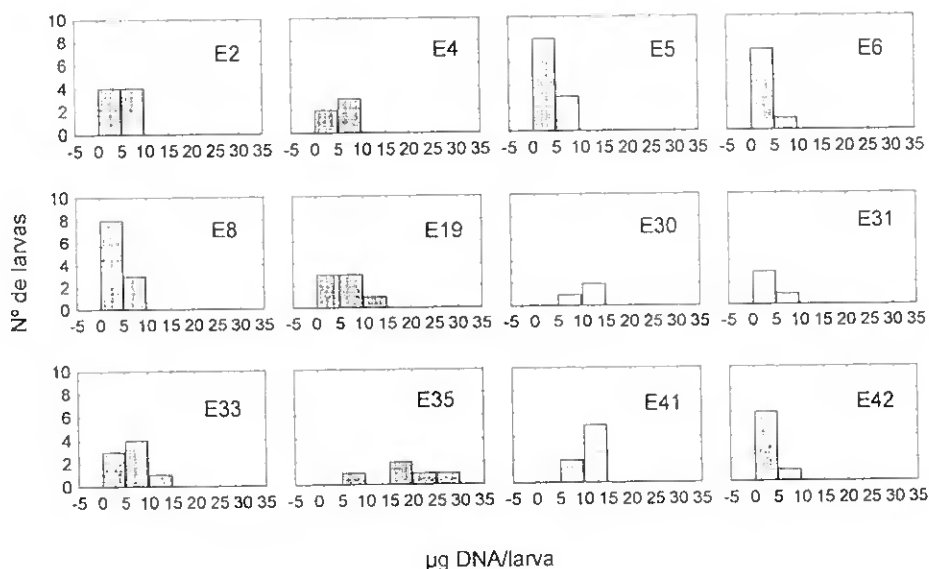


Figura 4.101 - Distribuição de frequências de µgDNA/larva das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

As maiores dimensões das larvas nessas estações revelaram valores superiores a nível de DNA/larva, RNA/larva e Pins/larva (Figuras 4.101, 4.103 e 4.106). Por outro lado, os valores de DNA/mg distribuíram-se preferencialmente pelas classes mais

baixas (Figura 4.102), mesmo nas estações como na E8, em que se registaram larvas relativamente pequenas (Figura 4.100).

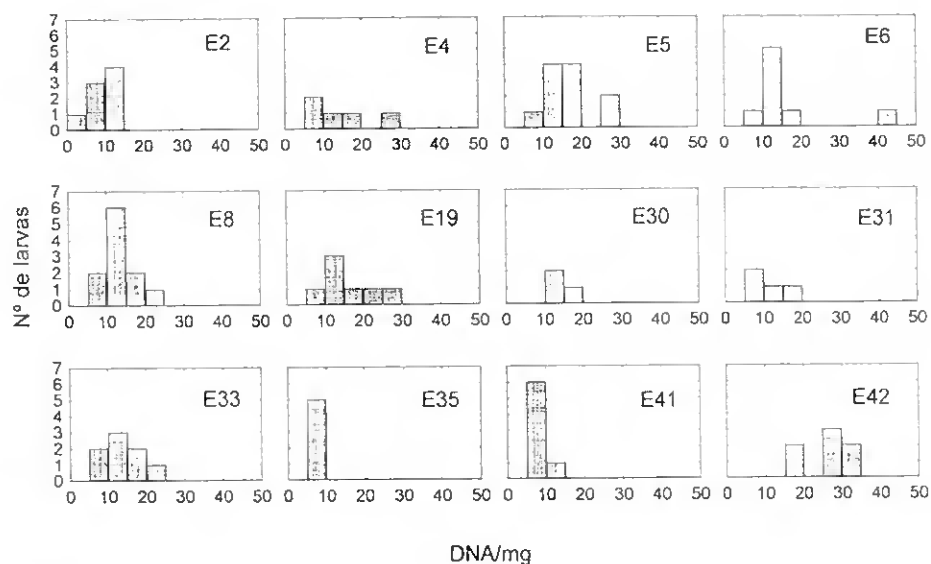


Figura 4.102 - Distribuição de frequências de DNA/mg das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

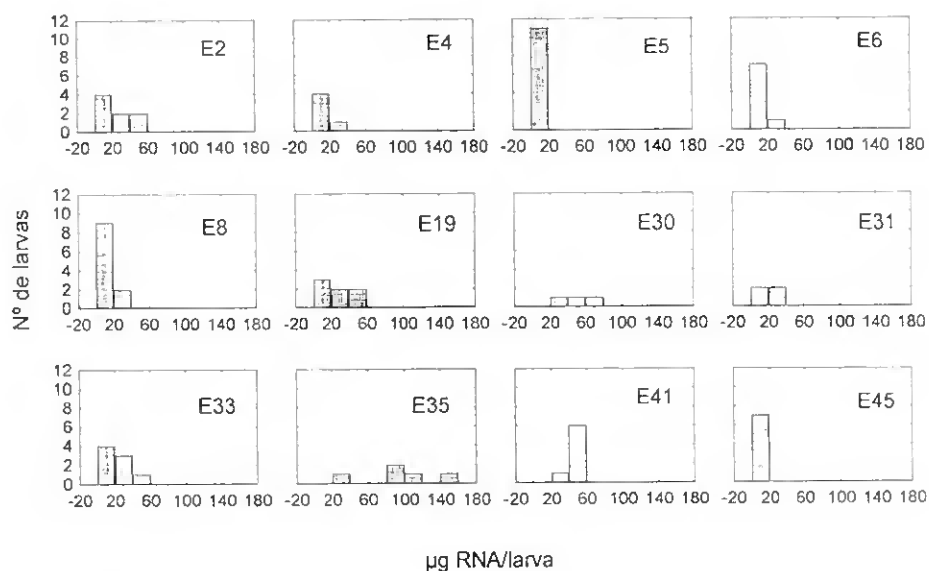


Figura 4.103 - Distribuição de frequências de µgRNA/larva das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

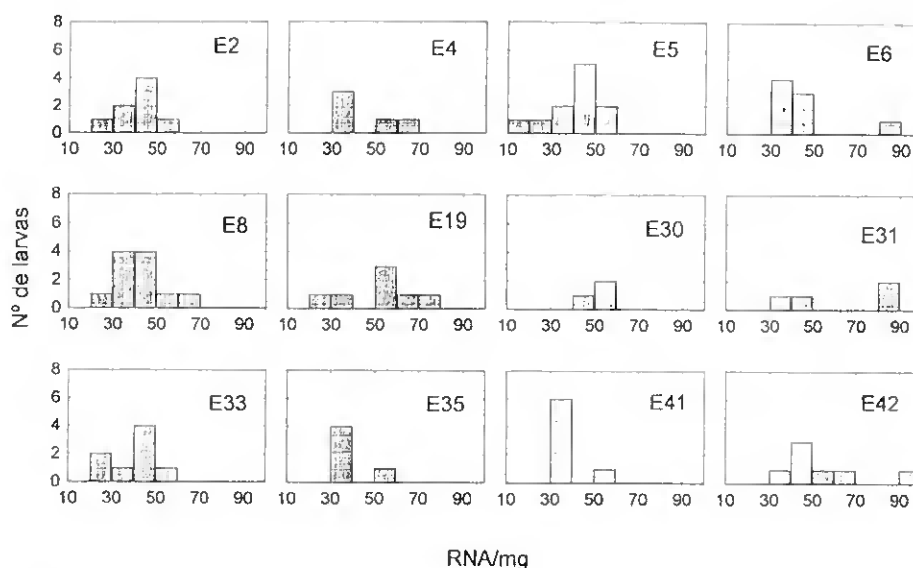


Figura 4.104 - Distribuição de frequências de RNA/mg das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

À tendência descrita, anteriormente, relativa aos valores mais reduzidos de DNA/mg se encontrarem em estações onde se recolheram, predominantemente, larvas pequenas encontraram-se algumas exceções. De facto, nas estações E6 da área 2 e E42 da área 3, onde coincidiram larvas de dimensões reduzidas com valores elevados de DNA/mg.

Por outro lado, a estação E42, apesar de se encontrar na área 3, onde a média da razão RNA/DNA foi superior, apresentou valores bastantes reduzidos entre as larvas recolhidas (Figura 4.105).

Foram também encontrados vários casos, em que a variabilidade individual revelou diferenças acentuadas relativamente ao comportamento geral dos valores na amostra (Figuras 4.106 a 4.108). Por exemplo, a estação E6 da área 2, onde a razão Pins/DNA foi em média inferior, apresentou indivíduos com os valores mais elevados registados neste índice (Figura 4.109).

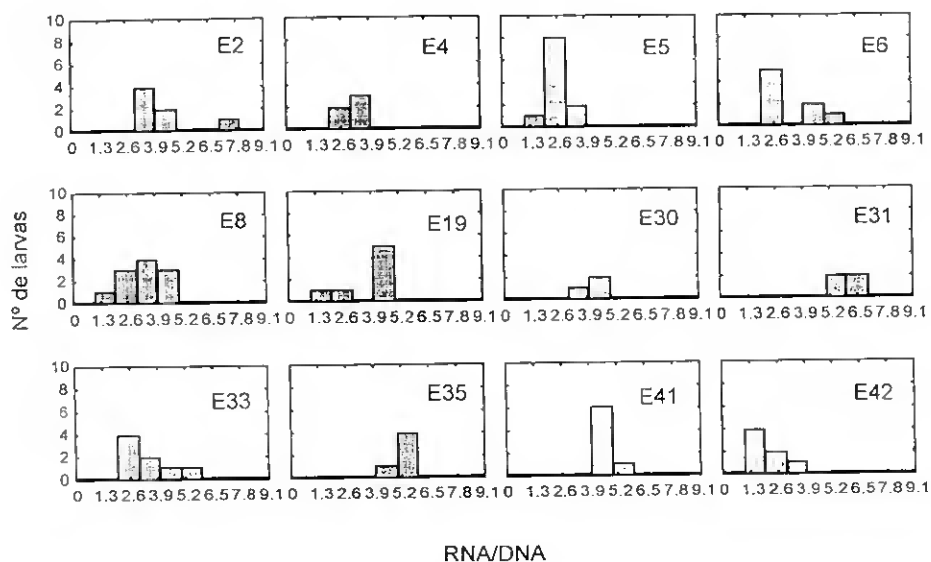


Figura 4.105 - Distribuição de frequências de RNA/DNA das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

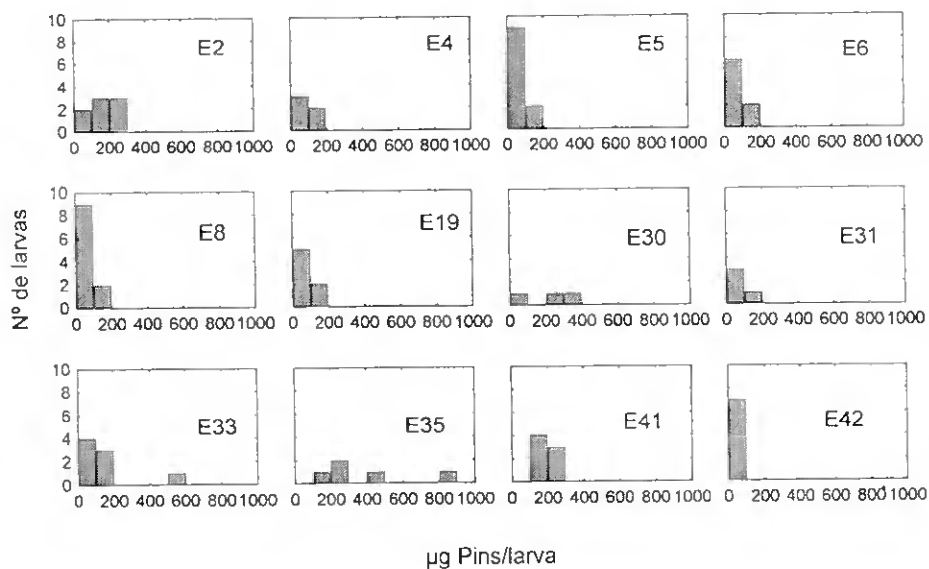


Figura 4.106 - Distribuição de frequências de µgPins/larva das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

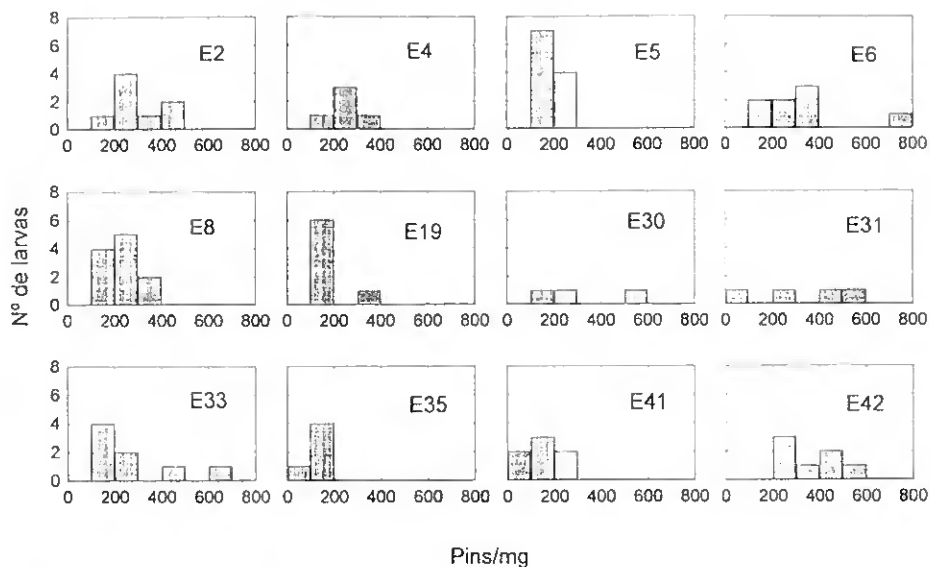


Figura 4.107 - Distribuição de frequências Pins/mg das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

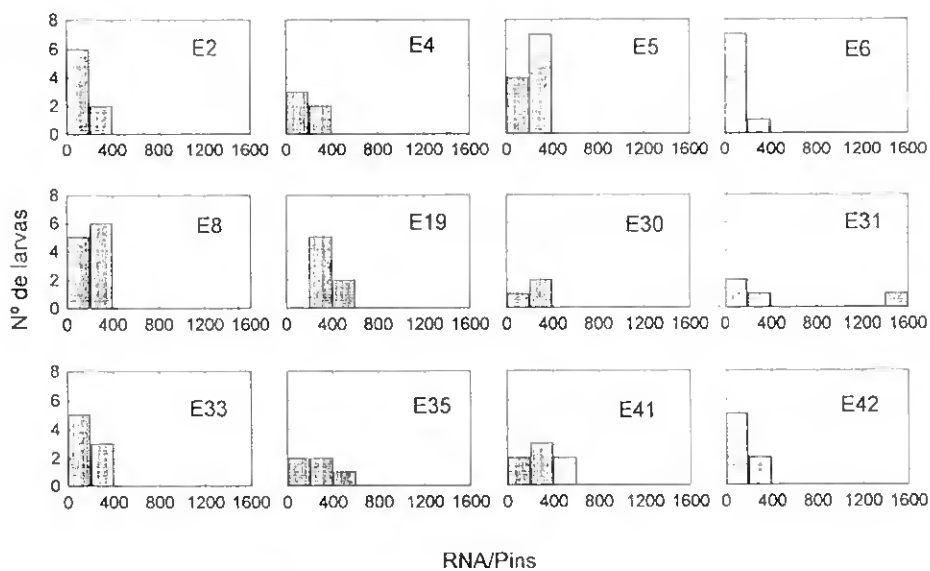


Figura 4.108 - Distribuição de frequências de RNA/Pins das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

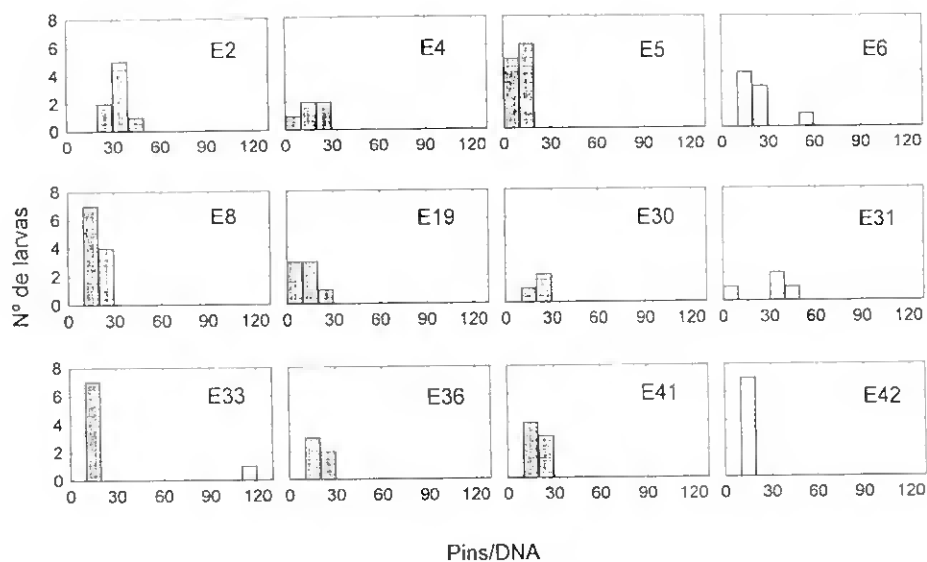


Figura 4.109 - Distribuição de frequências de Pins/DNA das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações amostradas, na costa espanhola, entre Abril e Maio 1991.

A análise dos dendogramas para o ano de 1992 não associou grupos de estações com significado geográfico, contrariamente ao que ocorreu no ano anterior (Figura 4.110 e 4.111).

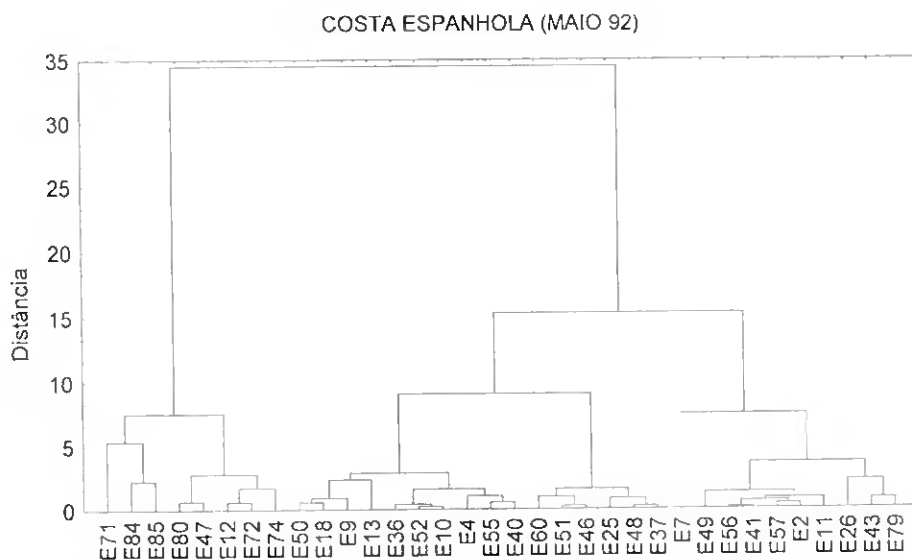


Figura 4.110 - Dendrograma por classificação (análise hierárquica) das estações amostradas na costa espanhola, em Maio de 1992.

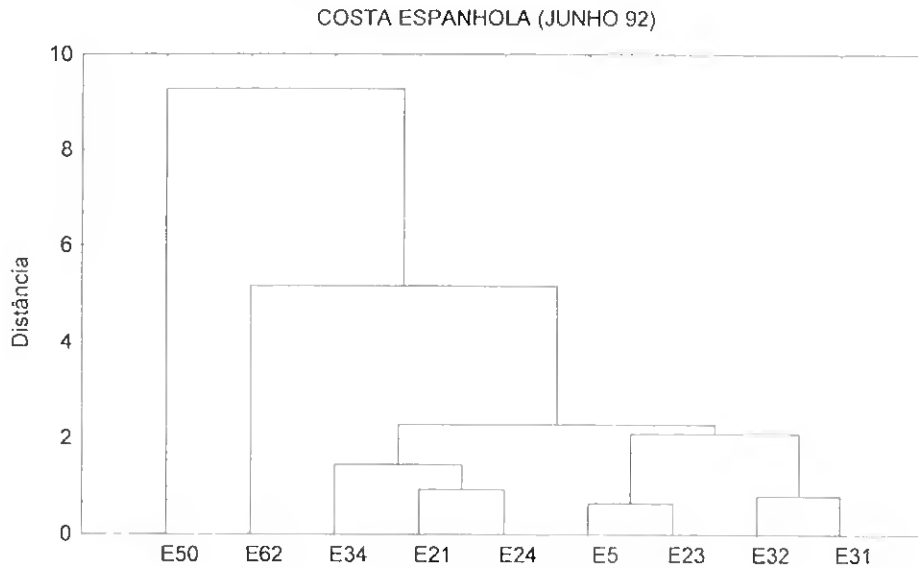


Figura 4.111 - Dendrograma por classificação (análise hierárquica) das estações amostradas, na costa espanhola, em Junho de 1992.

Relativamente ao ano de 1992, existiram diferenças significativas entre os meses estudados no que respeita ao comprimento ($p=0.001$), sendo o valor médio mais elevado em Março com $14.73\text{mm}(\pm 3.27)$, registando-se $12.02\text{mm}(\pm 3.48)$ em Abril, $11.17\text{mm}(\pm 3.50)$ em Maio e $12.06\text{mm}(\pm 2.98)$ em Junho. A razão RNA/DNA não apresentou diferenças significativas ($p=0.319$), bem como os restantes índices, entre meses, mas o valor máximo também se registou em Março com $3.81(\pm 1.63)$, sendo em Abril de $3.20(\pm 1.10)$, em Maio de $3.49(\pm 1.37)$ e em Junho de $3.31(\pm 1.16)$.

No entanto, em cada mês ocorreram diferenças significativas entre áreas, nomeadamente a nível da razão RNA/DNA, sendo que os valores na área 2 e 3 foram normalmente superiores à área 1. O mesmo se verificou relativamente aos comprimentos das larvas.

Assim, em Março na área 1, a média e respectivo desvio padrão da razão RNA/DNA foram de $2.85(\pm 1.02)$ e na área 2, de $5.48(\pm 1.01)$, e o comprimento médio foi de $14.68\text{mm}(\pm 3.85)$ na área 1 e de $14.82\text{mm}(\pm 2.14)$ na área 2 (Figura 4.112). Na Figura 4.113 pode observar-se que os valores reduzidos da razão RNA/DNA na área 1, associam-se a valores mais baixos de RNA e não a mais elevados de DNA. Verifica-se o inverso para a área 2.

No mês de Abril, a média e correspondente desvio padrão da razão RNA/DNA foram de $2.71(\pm 0.69)$ na área 1 e de $4.15(\pm 1.13)$, na área 2, tendo o comprimento médio da área 1 sido de $10.33\text{mm}(\pm 1.96)$ e na área 2, de $15.40\text{mm}(\pm 3.42)$ (Figura 4.114).

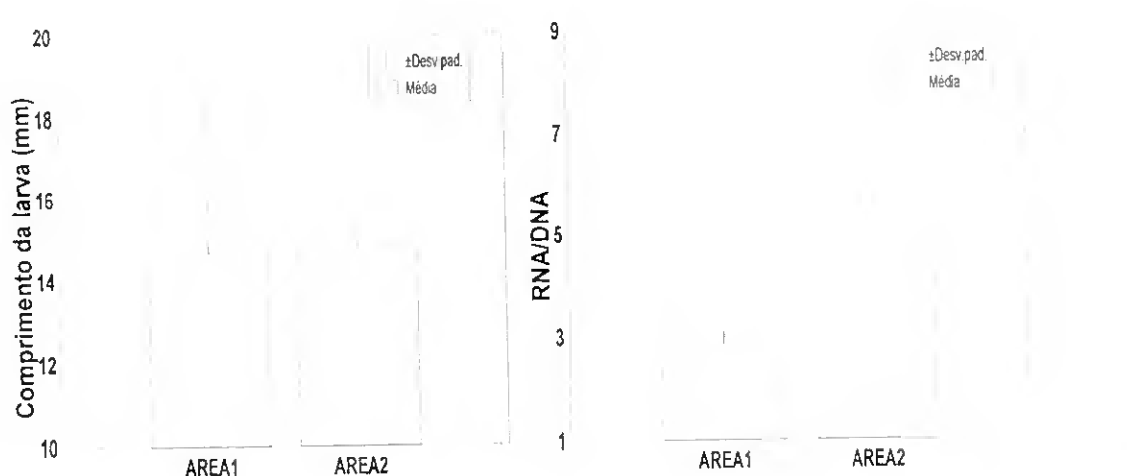


Figura 4.112 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA nas larvas de *S. pilchardus* capturadas, em diferentes áreas da costa espanhola, em Março 1992.

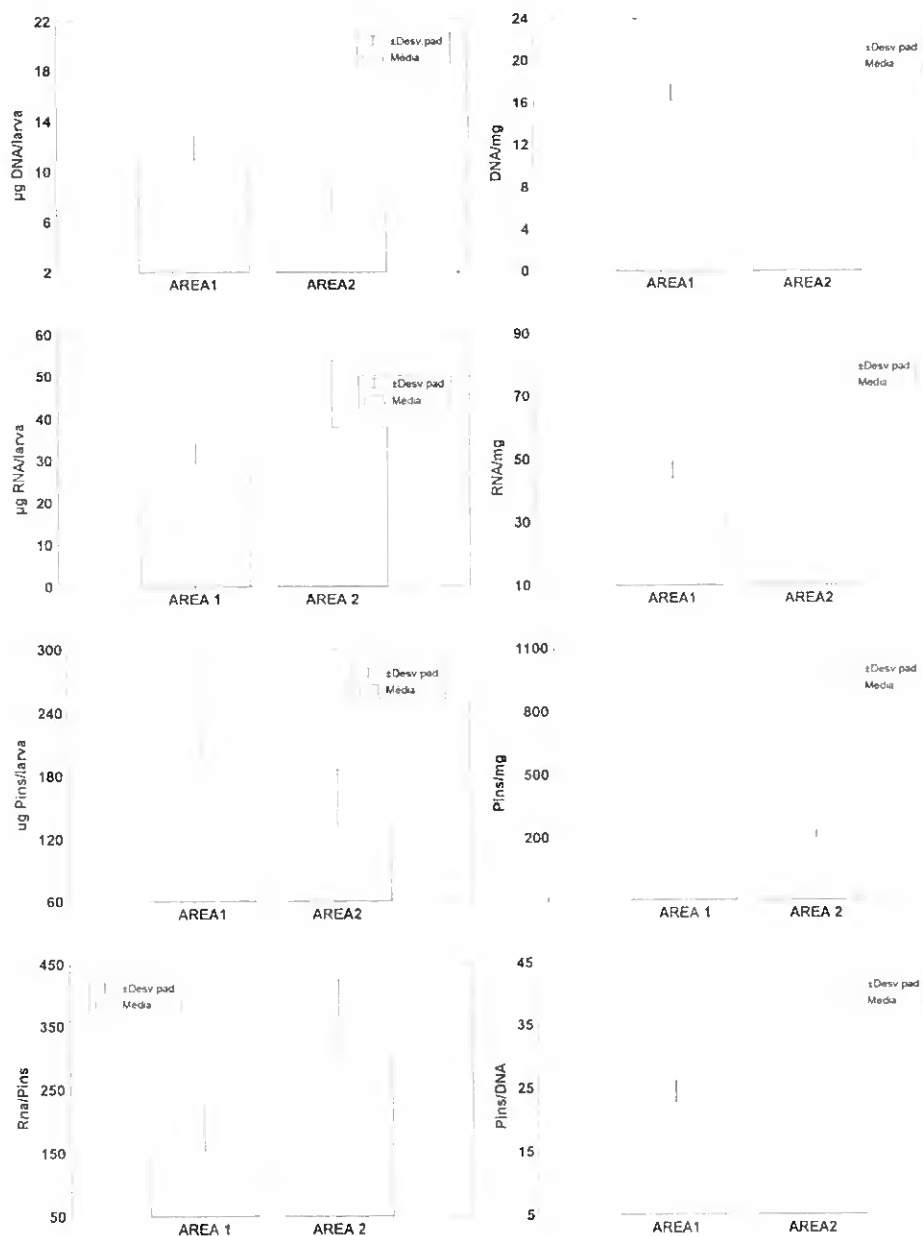


Figura 4.113 - Variação de distintos índices bioquímicos analisados nas larvas de *S. pilchardus* capturadas, em diferentes áreas da costa espanhola, em Março 1992.

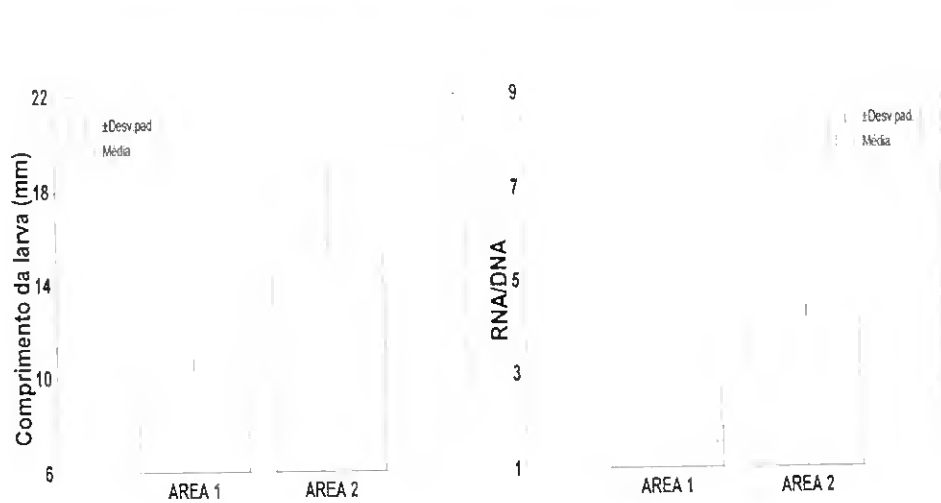


Figura 4.114 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Abril 1992.

Relativamente ao mês de Maio, a razão RNA/DNA apresentou o seu valor mais elevado na área 3 com $4.26(\pm 1.56)$, seguido da área 1 com $3.84(\pm 1.56)$ e da área 2 com $3.20(\pm 1.14)$. No que respeita aos comprimentos médios em Maio, estes também foram mais elevados na área 3 ($14.92\text{mm} \pm 3.75$), seguidos da área 2 com $11.16\text{mm}(\pm 3.08)$ e da área 1 com $10.19\text{mm}(\pm 3.53)$ (Figura 4.115).

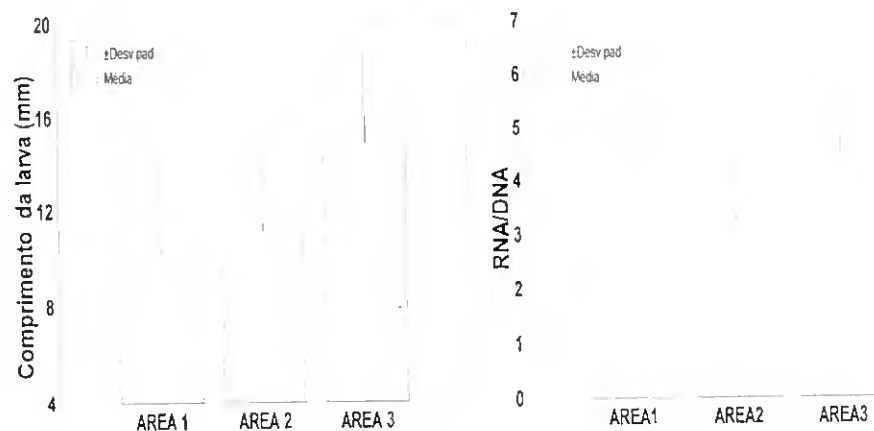


Figura 4.115 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Maio 1992.

A análise dos restantes índices bioquímicos, obtidos nas larvas analisadas, em Abril e Maio, evidenciou valores mais elevados a nível do conteúdo total por larva de DNA, RNA, Pins, nas áreas 2 e 3, respectivamente (Figuras 4.116 e 4.117). Verificando-se o contrário quando se expressou, as mesmas macromoléculas, em concentração (por mg de peso seco).

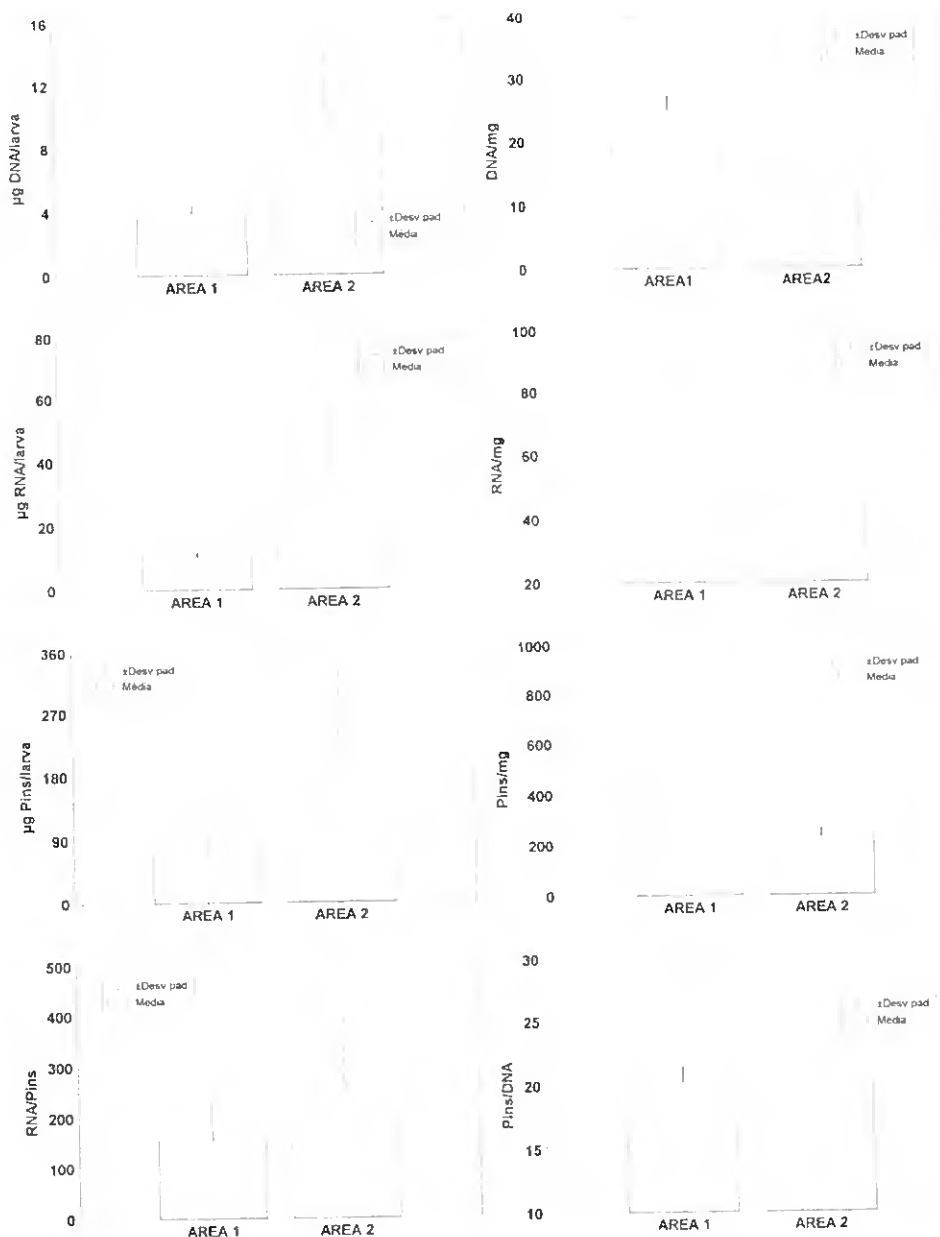


Figura 4.116 - Variação de distintos índices bioquímicos analisados em larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Abril 1992.

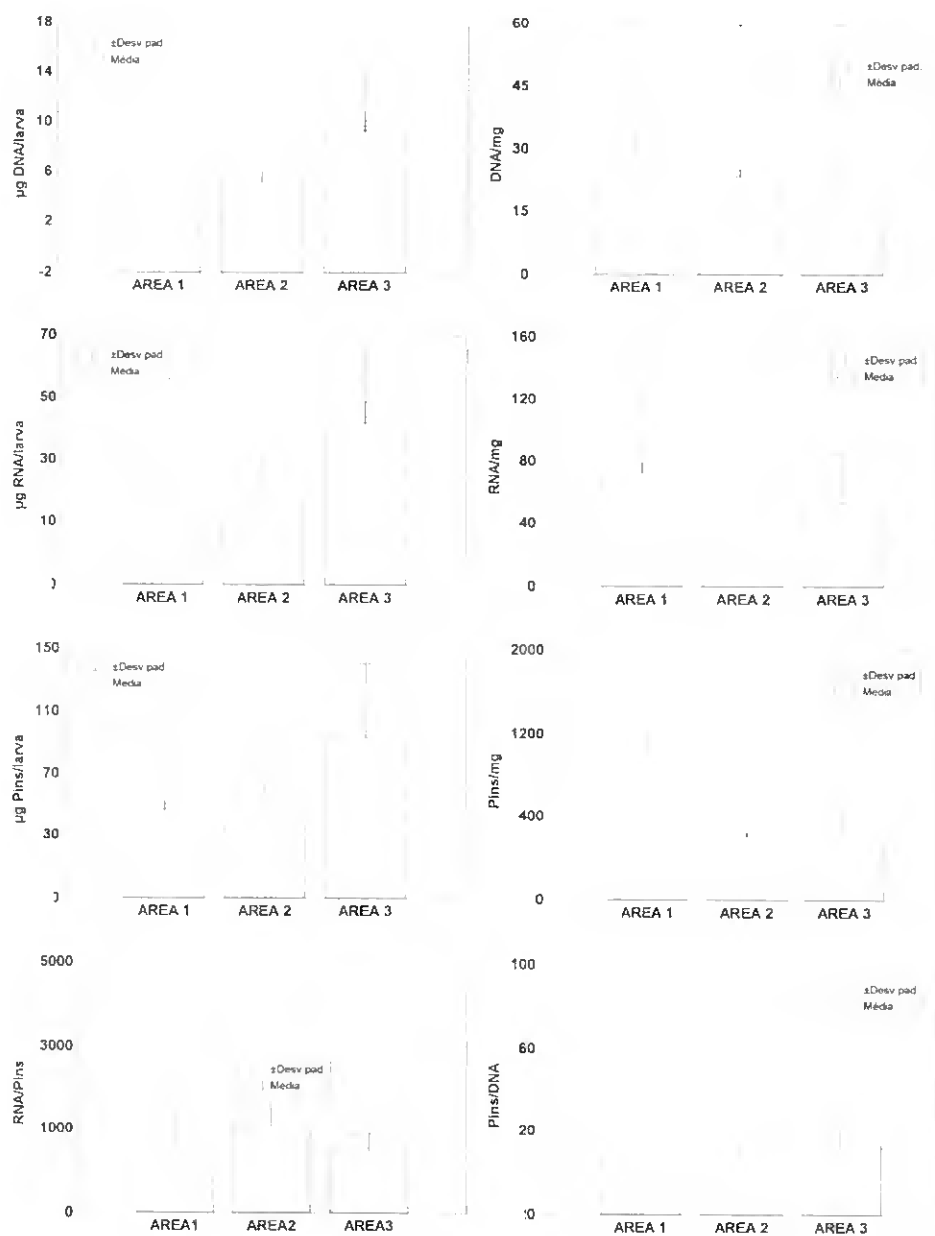


Figura 4.117 - Variação dos restantes índices analisados em larvas de *S. pilchardus* capturadas, nas diferentes áreas da costa espanhola, em Maio 1992.

Nos meses em que a abundância larvar foi mais elevada, nomeadamente em Maio, optou-se por apresentar, também, os resultados por estação, de forma a se poder avaliar rapidamente, o número de larvas em cada uma das classes de valor dos vários parâmetros .

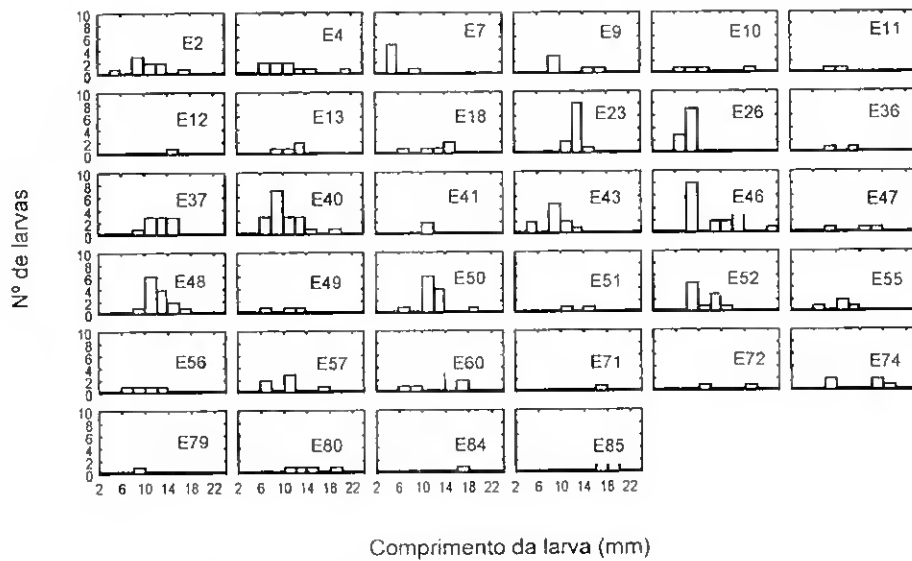


Figura 4.118 - Distribuição de frequências de comprimentos em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações, realizadas em Maio de 1992, na costa espanhola.

Tal como no ano de 1991, verificou-se, também em 1992, uma dispersão relativamente acentuada dos valores de um mesmo índice, entre as larvas recolhidas numa mesma estação (Figuras 4.119-4.127).

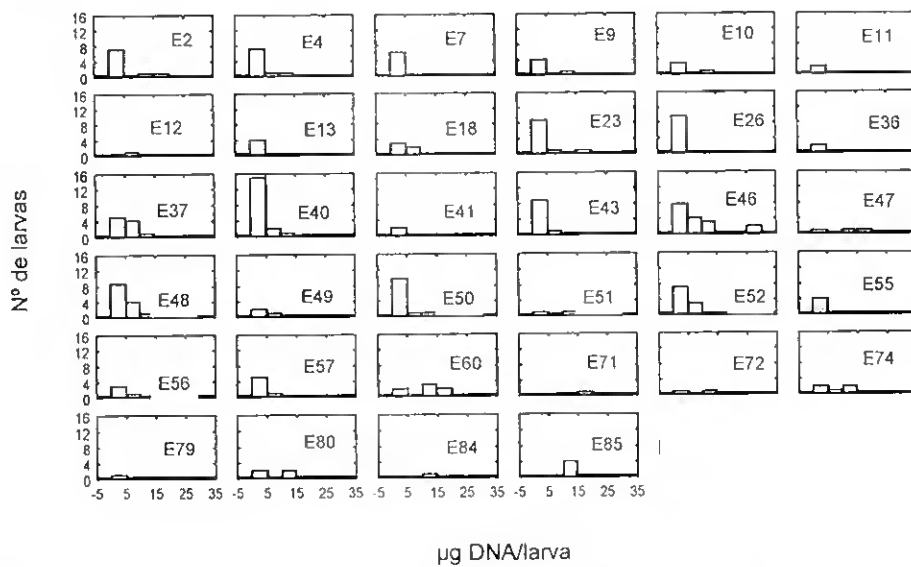


Figura 4.119 - Distribuição de frequências de µgDNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações, realizadas em Maio de 1992, na costa espanhola.

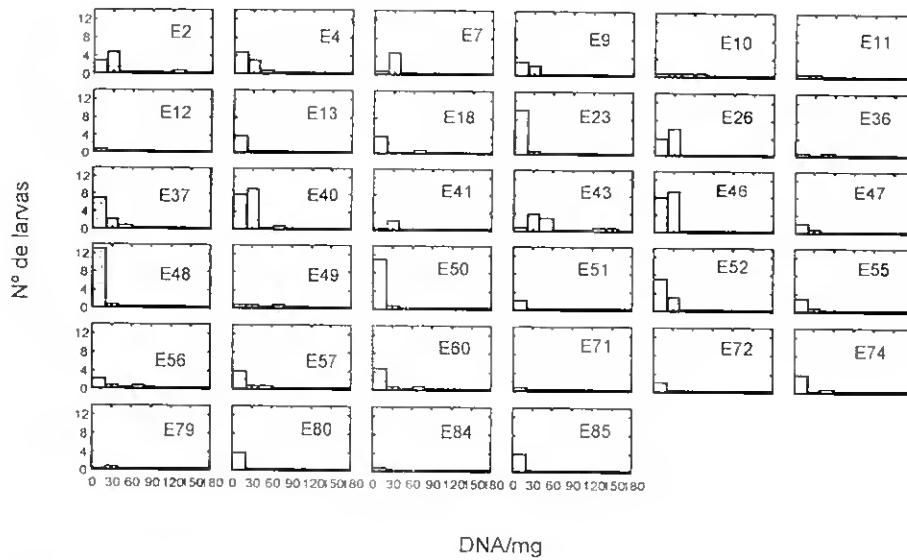


Figura 4.120 - Distribuição de frequências de DNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações, realizadas em Maio de 1992, na costa espanhola.

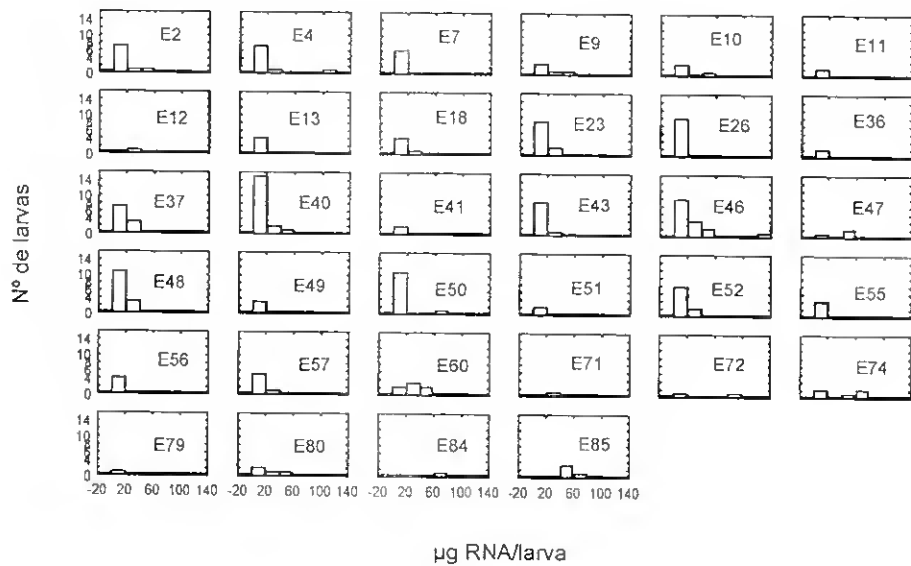


Figura 4.121 - Distribuição de frequências de µg RNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

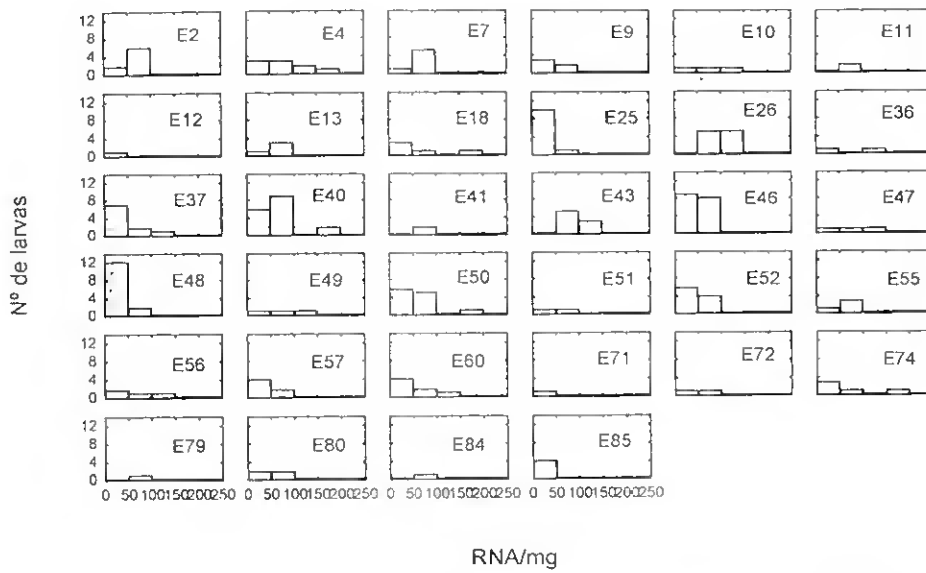


Figura 4.122 - Distribuição de frequências de RNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

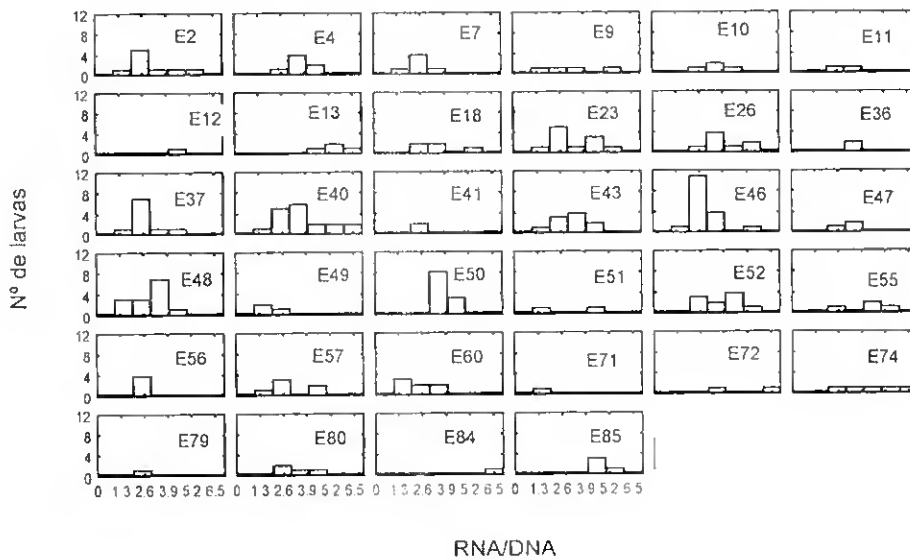


Figura 4.123 - Distribuição de frequências de RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

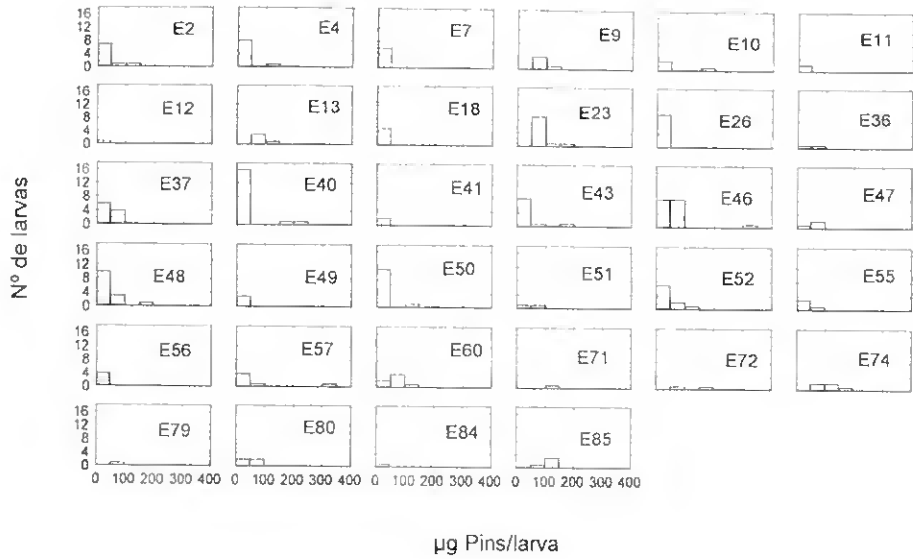


Figura 4.124- Distribuição de frequências de µgPins/larva em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

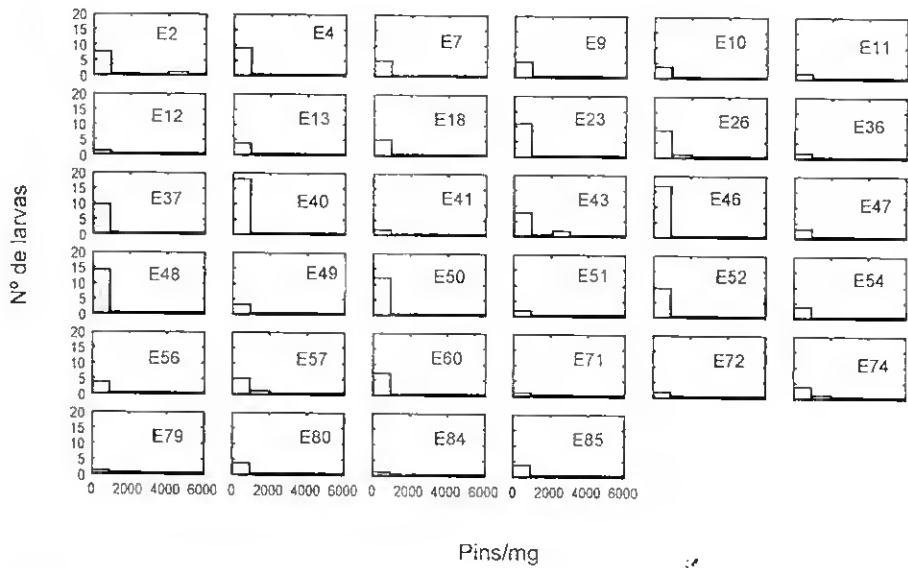


Figura 4.125- Distribuição de frequências de Pins/mg em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

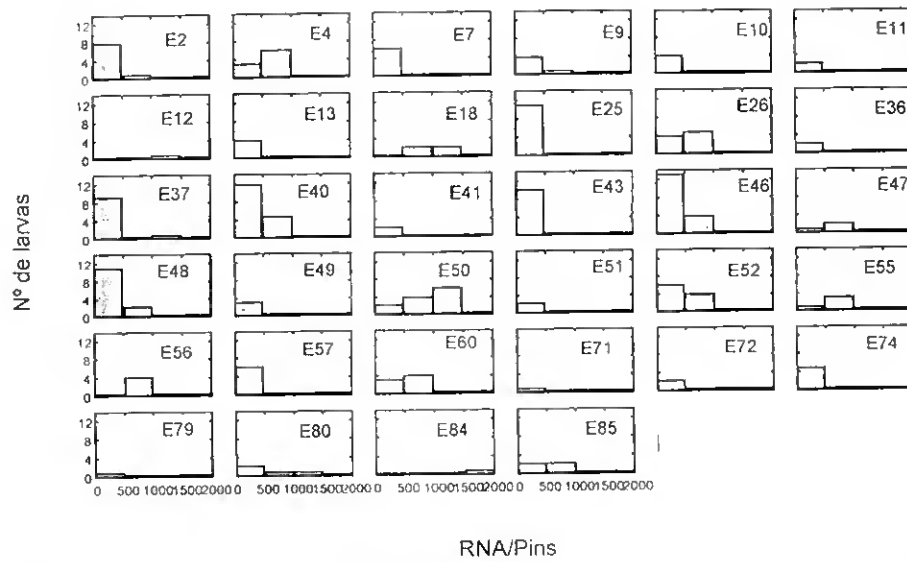


Figura 4.126 - Distribuição de frequências de RNA/Pins em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

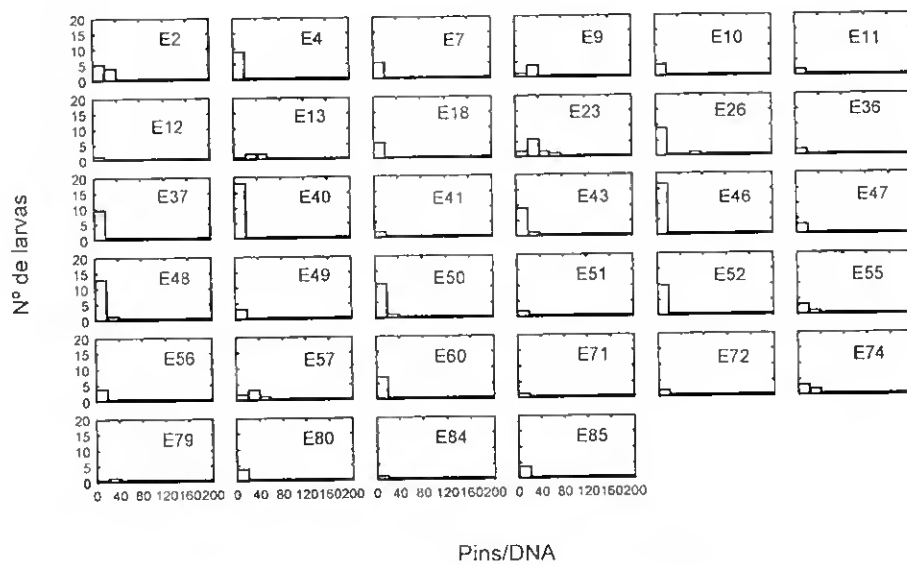


Figura 4.127 - Distribuição de frequências de Pins/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas, em Maio de 1992, na costa espanhola.

Foram as estações, com as larvas de menores comprimentos, nas quais se registaram, os menores valores de DNA/larva e RNA/larva, onde, por vezes, simultaneamente, ocorreram os valores mais elevados de DNA/mg, como nas estações E2 e E43 (Figuras 4.118 a 4.121).

Relativamente à razão RNA/DNA, apesar deste índice ter sido, em média, inferior ao registados na costa algarvia, nunca ocorreram larvas na menor classe deste índice (0-1) na costa espanhola, tal como se encontraram em larvas recolhidas em águas portuguesas (Figura 4.123).

No mês de Junho, o número de larvas analisadas decresceu, função da diminuição das abundâncias larvares na natureza. O valor mais elevado de RNA/DNA registou-se na área 1 com $3.81(\pm 1.32)$ mas não foi significativamente diferente ($p=0.084$) dos valores da área 2 (2.95 ± 0.99) e da área 3 (3.26 ± 0.90).

Relativamente aos comprimentos médios das larvas capturadas deste mês, o valor mais elevado ocorreu na área 2 ($13.16\text{mm}\pm 2.88$) seguido da média da área 1 com $11.90\text{mm}(\pm 2.45)$ e da área 3 com $8.63\text{mm}(\pm 1.85)$ (Figura 4.128).

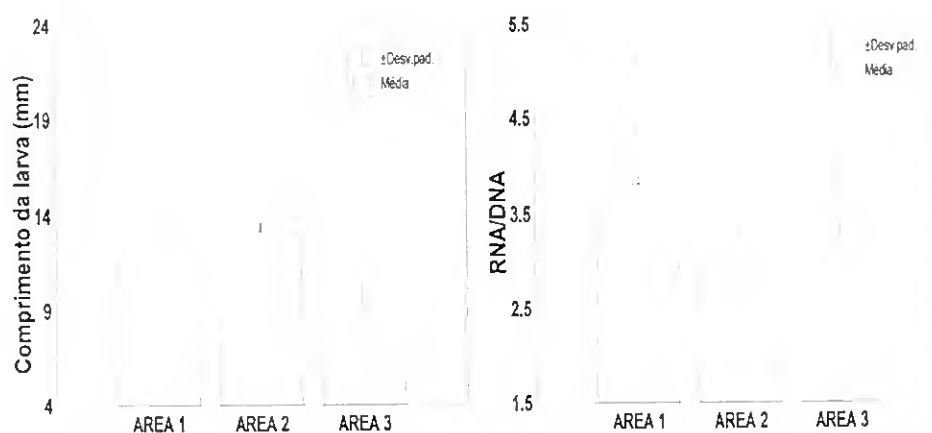


Figura 4.128 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* capturadas, em diferentes áreas da costa espanhola, em Junho 1992.

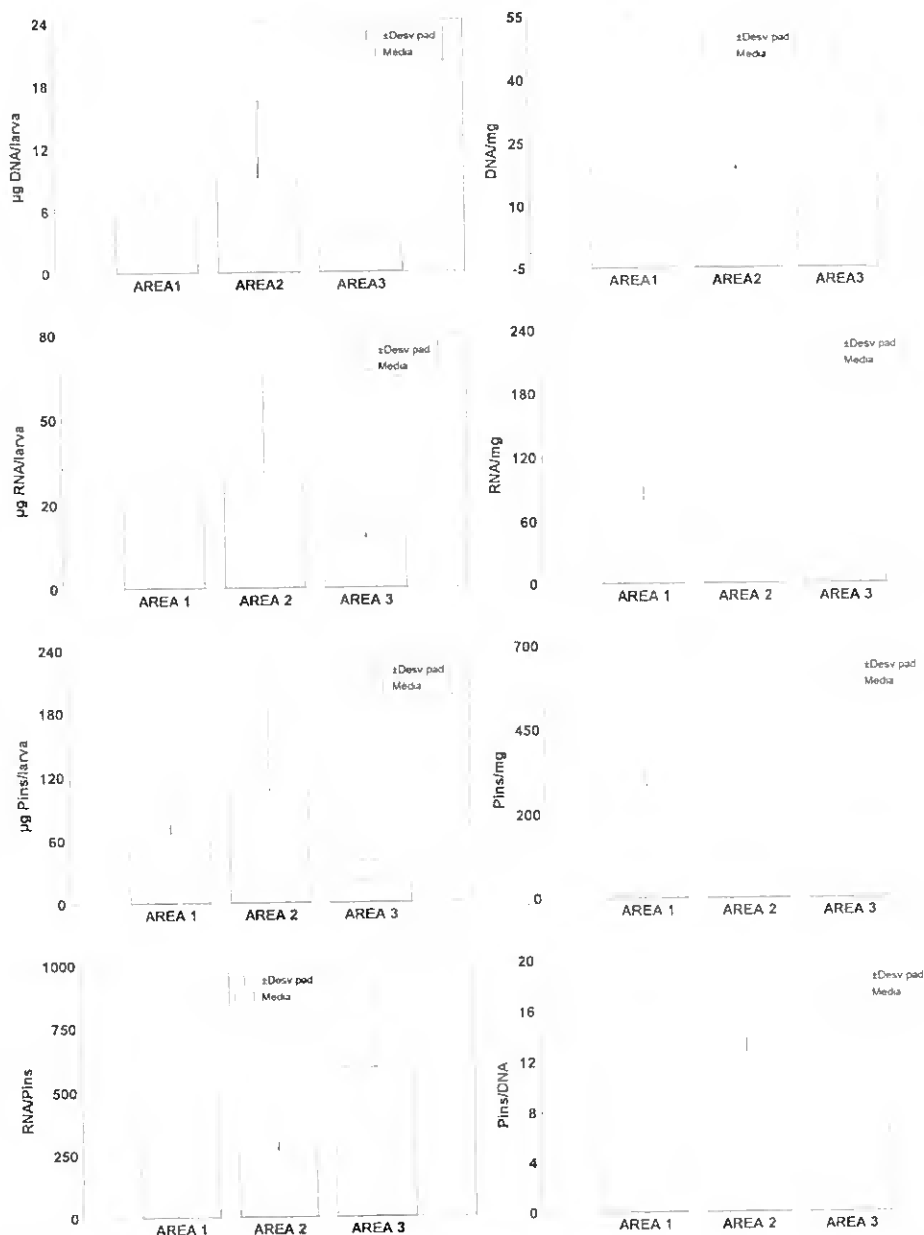


Figura 4.129 - Variação de distintos índices bioquímicos analisados em larvas em larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Junho 1992.

A aplicação da análise por componentes principais, aos índices referidos, revelou uma certa separação da razão RNA/DNA dos restantes índices e uma associação entre o comprimento e RNA/larva, DNA/larva e Pms/larva (Figura 4.130 e Tabela IV. 14).

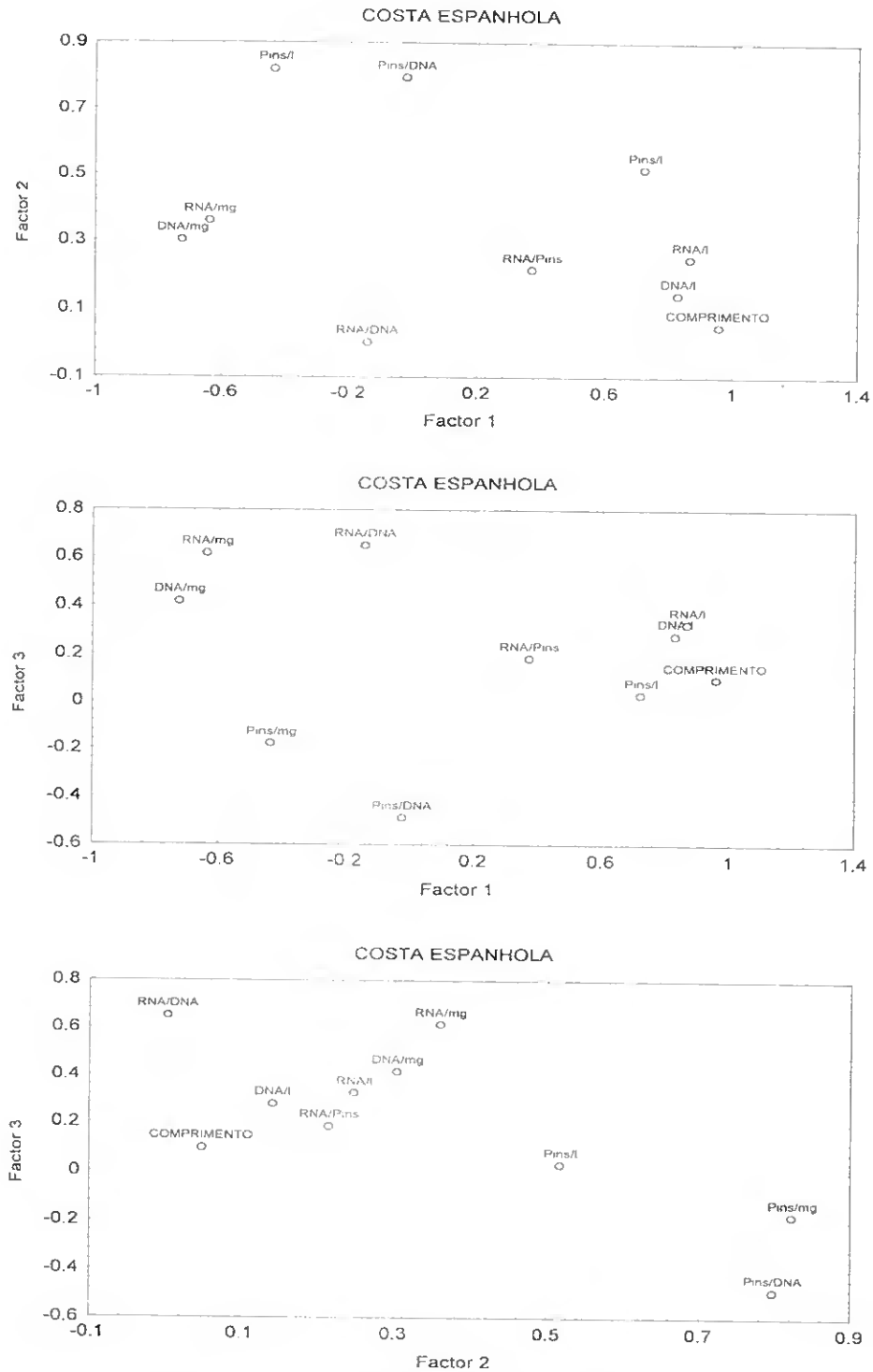


Figura 4.130 - Análise por componentes principais dos dados bioquímicos e do comprimento em larvas de *S. pilchardus* na costa espanhola. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.

Tabela IV.14 - Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos e dos comprimentos em larvas de *S. pilchardus* na costa espanhola.

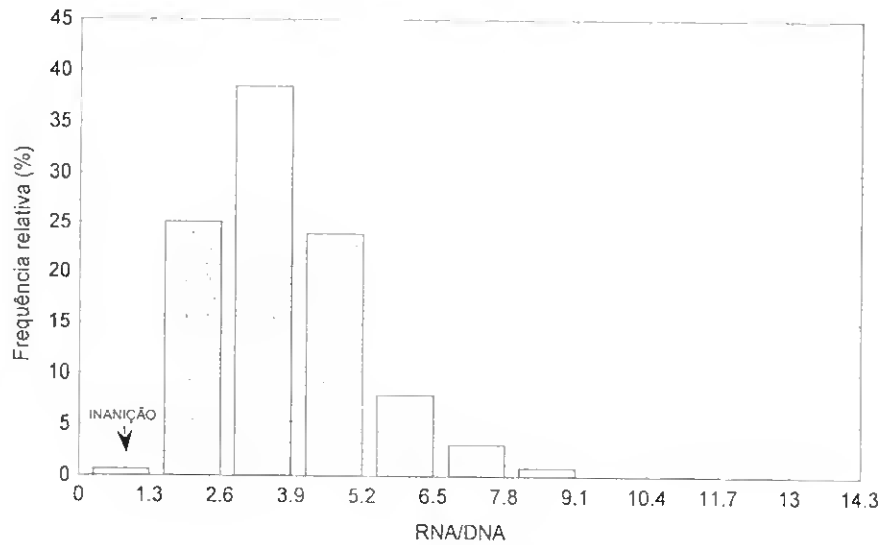
EIXOS	VALOR PRÓPRIO	%TOTAL VARIÂNCIA	V.PRÓPRIO ACUMULADO	%VARIÂNCIA ACUMULADA
1	4.156	41.569	4.156	41.569
2	1.929	19.292	6.086	60.891
3	1.483	14.837	7.569	75.73
4	1.154	11.541	8.724	87.271

3.2.5- Percentagem de larvas em condições de inanição (RNA/DNA<1.3)

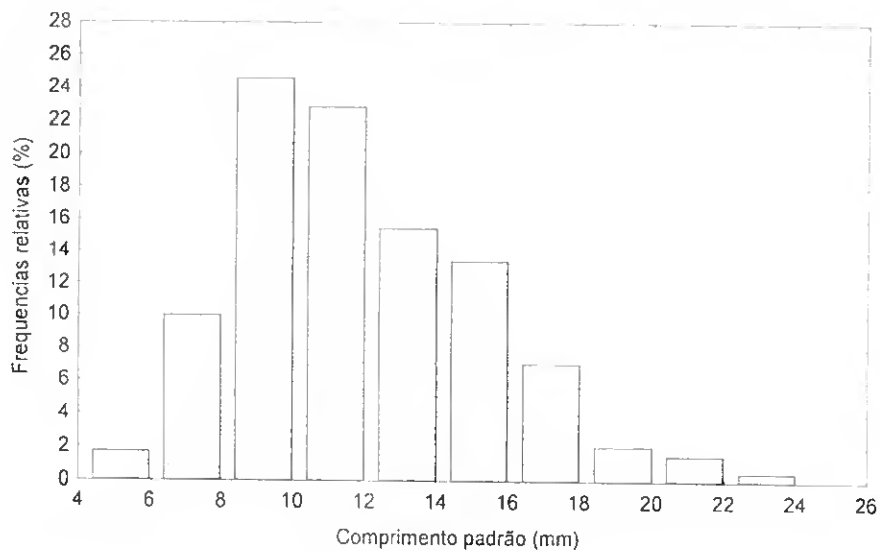
Na costa espanhola, no ano de 1991, não se detectou nenhuma larva com razão RNA/DNA inferior ao “nível crítico”, indicado pela experiência de validação. Relativamente ao ano de 1992 foi o mês de Março que se caracterizou pelo valor médio mais elevado (3.33%) (Tabela IV.15), apresentando-se a estação E19 com 10% e as restantes com percentagem nula. Nos meses seguintes os valores diminuíram, ou seja, no mês de Abril a percentagem média foi de 1.7%, apresentando-se a estação E6 com 10% e as restantes com percentagem nula. No mês de Maio a percentagem média foi de 0.48%, tendo a estação E57, 16%, a estação E71, 10%, e as restantes 0%. No mês de Junho essa percentagem foi nula em todas as estações.

Relativamente à percentagem total de larvas em inanição, na costa espanhola em 1992, esse valor, apesar de superior a 1991, foi muito reduzido: 0.78% (Figura 4.131). Analisando a percentagem de inanição relativa às classes de dimensão observou-se que o intervalo com maior percentagem de inanição foi o de 8 a 16 mm, com 0.52 %, seguida da classe de comprimento inferior a 8 mm com 0.26% e da de 16 a 24 mm com 0% (Tabela IV. 15).

A.



B.



4.131 - Frequências relativas (A.) da razão RNA/DNA e do (B.) comprimento das larvas de *S. pilchardus* em função dos dados globais na costa espanhola em Março, Abril, Maio e Junho de 1992 (n=382).

Tabela IV. 15 - Percentagens de inanição por mês e por classe de comprimento, na costa espanhola em 1992

Comprimento	Março	Abril	Maió	Junho	Total
<8 mm	0	0	0.48% (1/208)	0	0.26% (1/382)
8-16 mm	3.3% (1/30)	1.7% (1/60)	0	0	0.52% (2/382)
16-24 mm	0	0	0	0	0
Total	3.3% (1/30)	1.7% (1/60)	0.48% (1/208)	0 (0/84)	0.78% (3/382)

3.2.6- Taxa de crescimento proteico

A taxa de crescimento variou entre valores negativos (-10.83%/dia) e valores positivos (32.18%/dia), tal como se pode observar na Figura 4.132.

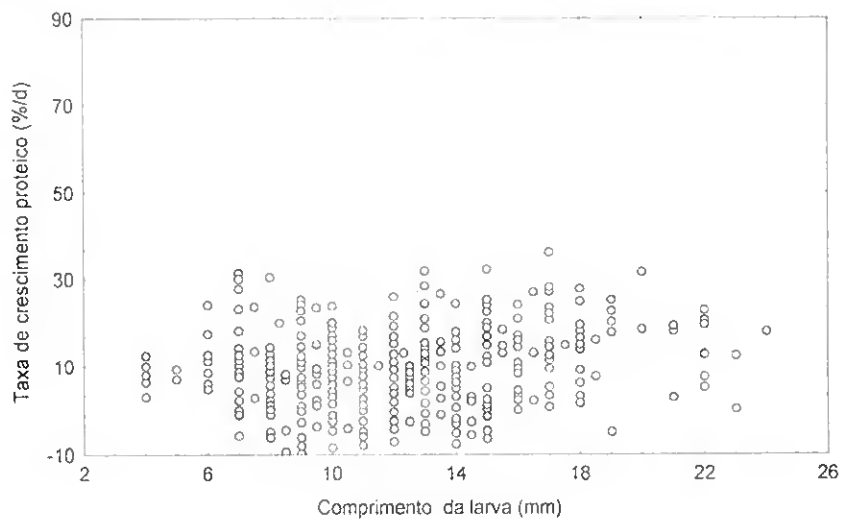


Figura 4.132- Variação geral da taxa de crescimento proteico (%/dia) com o comprimento das larvas de sardinha capturadas na costa espanhola.

No ano de 1991, a média da taxa de crescimento proteico foi de 11.04%/d(± 6.59) e no ano de 1992 de 8.57%/d(± 8.44). No ano de 1991 não se verificaram a existência de

diferenças significativas ($p < 0.073$) entre as áreas estudadas ou seja 2 e 3, sendo o valor mais elevado na área 3 com $12.60(\pm 6.71)$ (Figura 4.133).

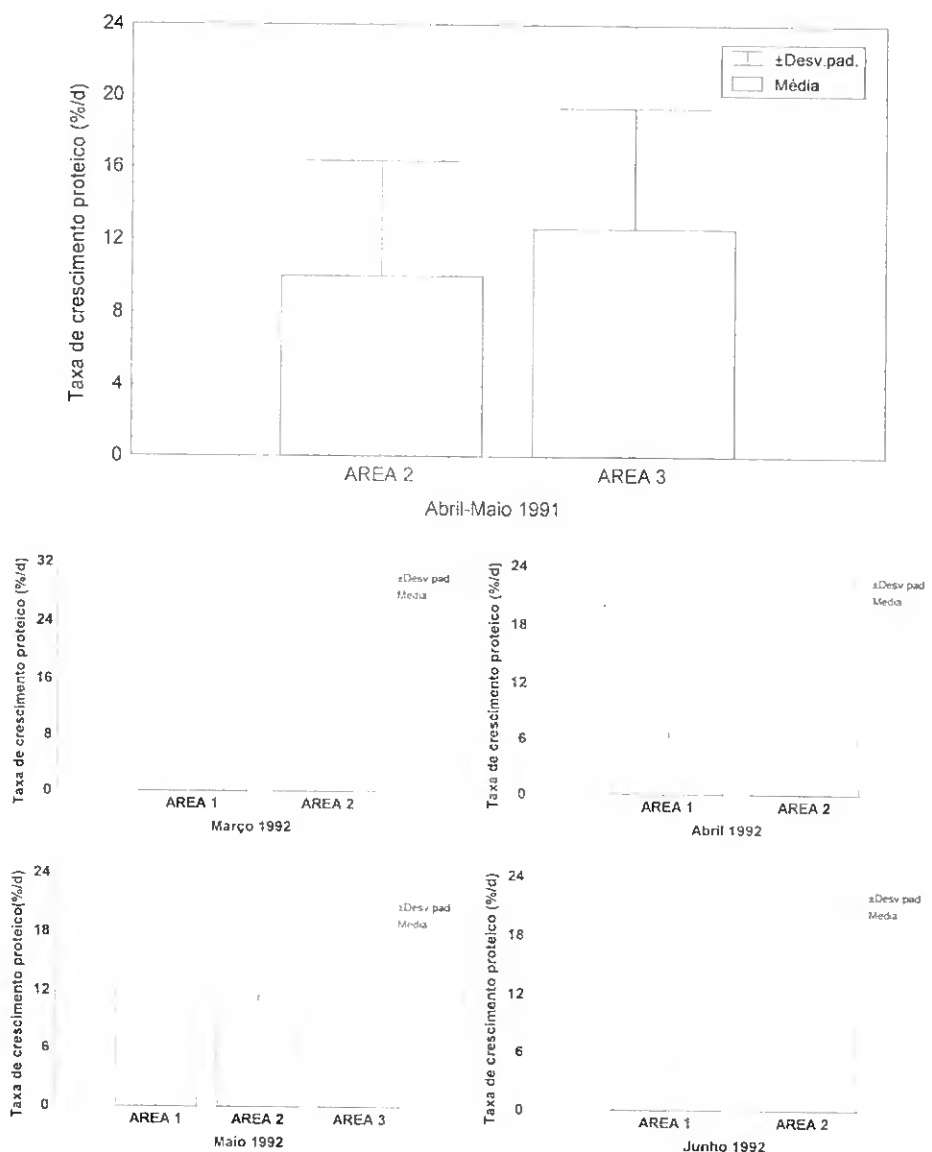


Figura 4.133 - Variação da taxa de crescimento proteico das larvas de sardinha entre áreas nas diferentes épocas de recolha na costa espanhola.

Durante o ano de 1992, os valores mais elevados da taxa de crescimento proteico registaram-se nos meses de Maio e Junho, com médias de $12.36\%/d(\pm 6.48)$ e $14.17\%/d(\pm 5.47)$, respectivamente, e os mais reduzidos em Março e Abril com médias: $11.57\%/d(\pm 7.90)$ e $8.39\%/d(\pm 5.25)$. Durante estes meses registaram-se diferenças

significativas entre as áreas estudadas, com exceção do mês de Junho, tendo-se encontrado os valores mais elevados, de uma forma geral, na área 2 (Anexo V).

3.2.7- Padrão geral de variação das concentrações dos ácidos nucleicos e proteína insolúvel com o comprimento

A relação, quer dos ácidos nucleicos quer das proteínas insolúveis, com o comprimento das larvas recolhidas na costa espanhola (1991 e 1992) foi exponencial e as equações que exprimem essas relações são as seguintes, sendo todos os coeficientes indicados significativos ($p < 0.05$):

- $\mu\text{g DNA/larva versus}$ comprimento da larva (mm) (Figura 4.134)

$$y = e^{((-0.31) + (0.1593) \cdot x)} \quad (r=0.892; \text{variação explicada}=79.58\%; n= 505)$$

- $\mu\text{g RNA/larva versus}$ comprimento da larva (mm) (Figura 4.135)

$$y = e^{((0.632) + (0.185) \cdot x)} \quad (r=0.955; \text{variação explicada}=83.81\%; n= 505)$$

- $\mu\text{g Pins/larva versus}$ comprimento da larva (mm) (Figura 4.136)

$$y = e^{((1.814) + (0.19) \cdot x)} \quad (r=0.779; \text{variação explicada}=60.68\%; n= 505)$$

A variação geral da concentração de DNA com o comprimento das larvas apresentou pequenas flutuações, no âmbito total dos dados, semelhantes às registadas na costa portuguesa. A quantidade de DNA por larva variou pouco até ao comprimento de 10mm, não ultrapassando os 5 μg . No entanto, a partir desse comprimento verificou-se um incremento mais acentuado da quantidade de DNA por larva, podendo atingir valores da ordem de 35 μg em larvas com comprimentos de 22 mm.

A evolução da quantidade de RNA e de proteína insolúvel por larva relativamente ao comprimento, apesar de revelar uma tendência para um comportamento semelhante ao DNA, apresenta uma maior variabilidade com o comprimento (Figuras 4.135 e 4.136). A razão RNA/DNA não se correlacionou com o comprimento, apresentando um valor de r , não significativo ($p > 0.5$), como se pode observar na Figura 4.137.

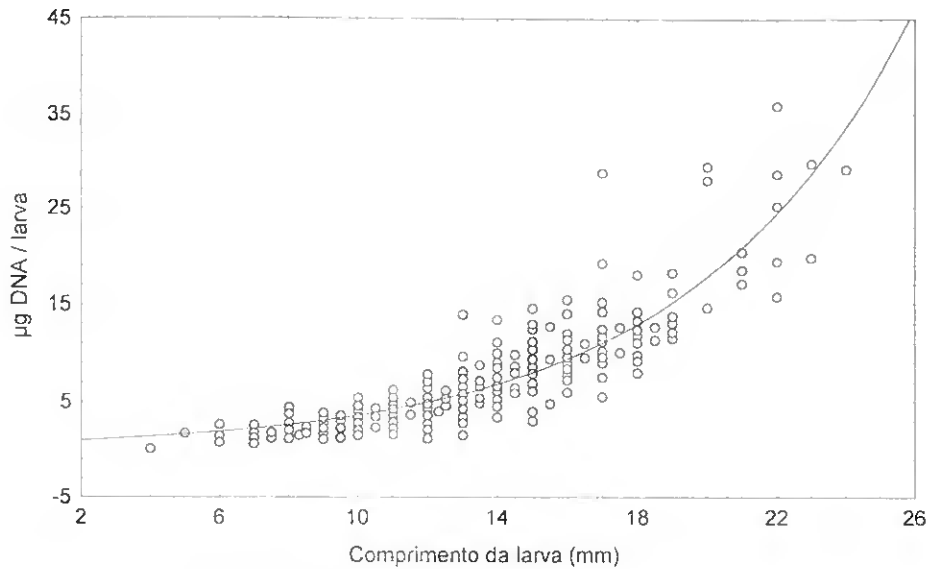


Figura 4.134 - Relação entre μg de DNA/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola.

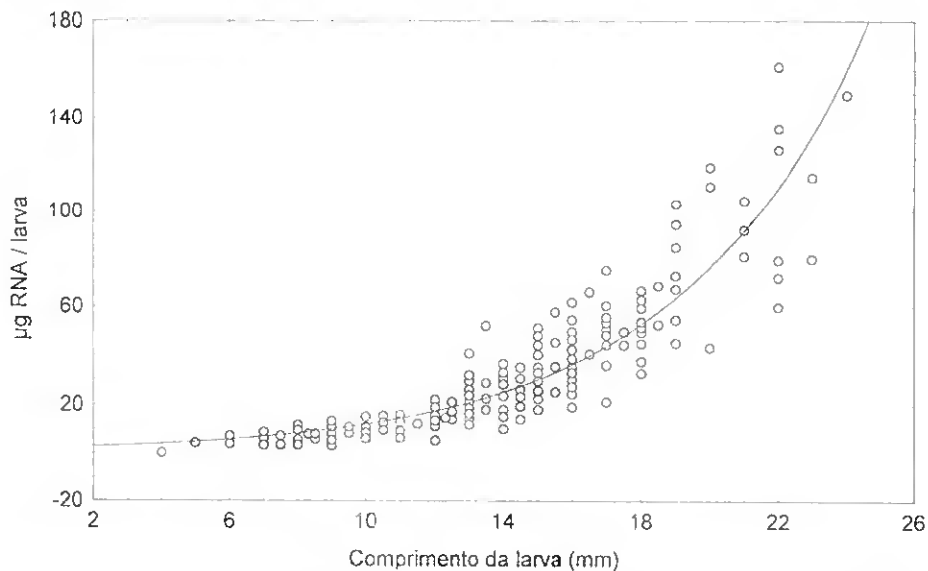


Figura 4.135 - Relação entre μg de RNA/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola.

3.3 - Comparação entre anos e zonas de estudo

A comparação realizada entre os anos e os locais estudados restringiu-se aos meses em que as amostragens coincidiram. Assim, embora em 1992 se tivessem realizado recolhas na costa espanhola desde Março a Junho, só se utilizaram os dados das recolhas de Maio, quando se compararam os resultados relativamente a 1991. Da

mesma forma, quando se compararam os resultados obtidos na costa espanhola com os da costa algarvia, também se restringiram às recolhas efectuadas em simultâneo nas duas zonas, o que também ocorreu apenas em Maio de 1992.

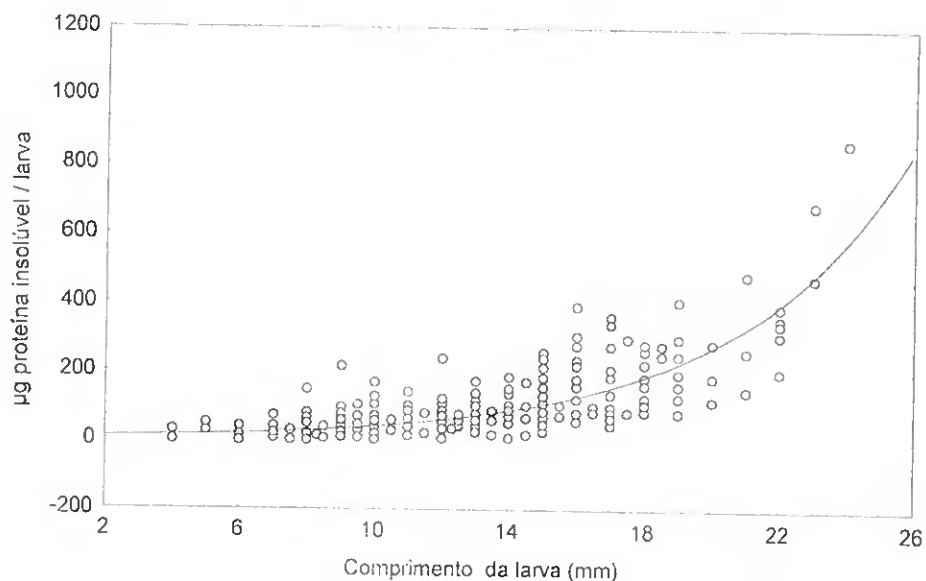


Figura 4.136 - Relação entre μg de Pins/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola.

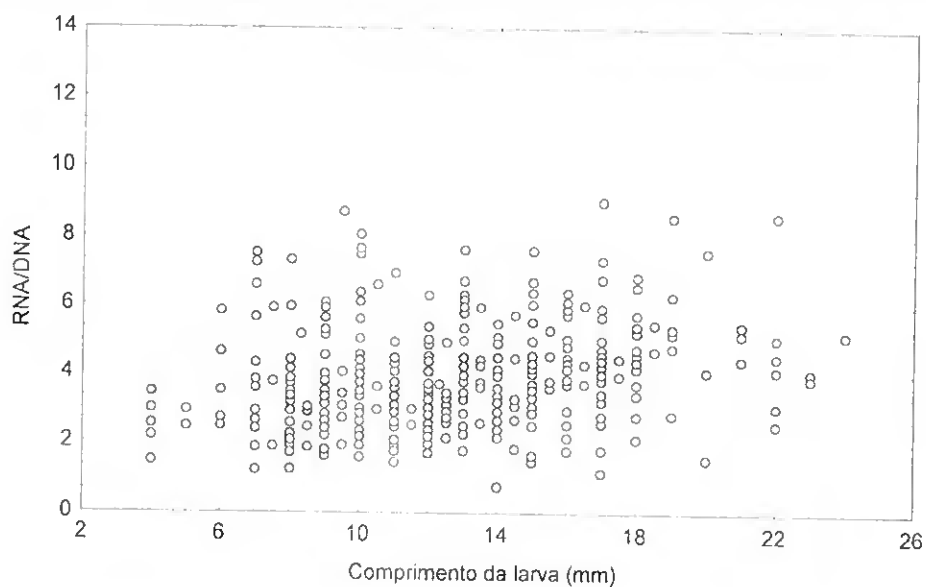


Figura 4.137 - Relação entre a razão RNA/DNA e o comprimento de larvas *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola.

Foram encontradas diferenças significativas entre as épocas e as zonas estudadas (Tabela IV. 16), nomeadamente entre os anos de 1991 e 1992 na costa espanhola e

entre os locais, costa algarvia e costa espanhola. Esta análise restringiu-se aos principais parâmetros analisados no estudo sobre as larvas de sardinha ou seja, comprimento, temperatura da água, RNA/DNA e taxa de crescimento.

Tabela IV.16- Médias e desvios padrões de vários parâmetros analisados nas larvas de sardinha provenientes quer da costa portuguesa quer da costa espanhola.

	TEMPERATURA	COMPRIMENTO	RNA/DNA	TAXA CRESC. PROT.	% INANIÇÃO
Espanha/Maio 1991	12.41 ±0.25	13.14 ±3.35	3.72 ±1.39	11.04 ±6.59	0
Espanha/Maio 1992	14.99 ±0.48	11.36 ±3.51	3.43 ±1.23	12.35 ±6.49	0.48
Portugal/Maio 1992	16.02 ±0.79	10.61 ±2.194	4.40 ±2.19	18.23 ±11.91	4.60
Portugal/Dezembro 1991	14.04 ±0.35	8.61 ±2.72	4.94 ±1.92	19.09 ±9.22	0

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis, relativos a vários parâmetros analisados nas larvas de sardinha provenientes quer da costa portuguesa como espanhola em 1991 e 1992, evidenciaram diferenças significativas entre todas as situações (Tabela IV.17)

Tabela IV.17 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis em vários parâmetros analisados nas larvas de sardinha provenientes quer da costa portuguesa quer da costa espanhola em 1991 e 1992.

Teste Kruskal-Wallis	Espanha/Portugal	1991/1992
Temperatura	p=0.0001	p=0.009
Comprimento	p=0.0001	p=0.001
RNA/DNA	p=0.0001	p=0.005
Taxa de crescimento	p=0.0001	p=0.005

A análise gráfica dos desvios padrões em função das médias das taxas de crescimento proteico evidenciou uma dispersão mais acentuada dos valores determinados para as larvas de sardinha recolhidas em Espanha, no ano de 1992, comparativamente, a 1991, e na costa portuguesa em relação à costa espanhola (Figuras 4.138 e 4.139).

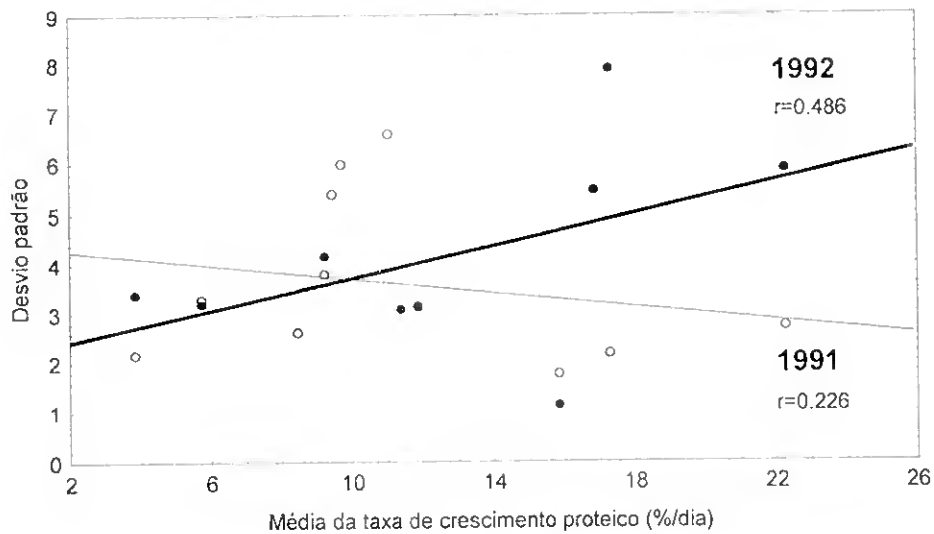


Figura 4.138- Desvio padrão em função da média da taxa de crescimento proteico individual. Linha contínua e círculos preenchidos - Espanha, 1992 e linha a tracejado e círculos não preenchidos - Espanha, 1991.

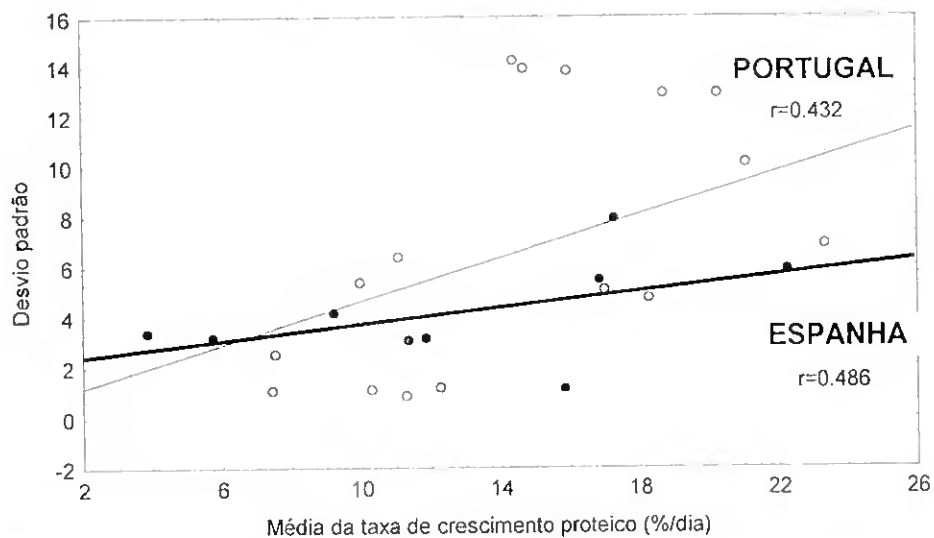


Figura 4.139- Desvio padrão em função da média da taxa de crescimento proteico individual. Linha contínua e círculos preenchidos - Espanha, 1992 e linha a tracejado e círculos não preenchidos - Portugal, 1992.

4- Discussão

4.1 - Índices sobre o estado nutricional e sua relação com parâmetros ambientais

Os índices sobre o estado nutricional têm sido considerados instrumentos, com boas perspectivas, para avaliar, *in situ*, o impacto de diferentes factores ambientais na sobrevivência das fases iniciais do desenvolvimento dos peixes (SUTHERS, 1992; CANINO, 1994). No entanto, a condição larvar de espécies como *S. pilchardus*, alvo tradicional de uma importante pescaria da costa Atlântica da Península Ibérica, tem sido pouco estudada.

A baixa densidade de larvas de sardinha, nalguns locais da costa da Península Ibérica, bem como a sua dimensão reduzida noutras zonas, foram os factores responsáveis pelo número reduzido de indivíduos analisado em determinadas estações. De facto, sendo as larvas pequenas menos visíveis, tal impediu que um maior número de indivíduos fosse, rapidamente, separado para a análise química. Desta forma, as zonas melhor caracterizadas, em termos de condição larvar, foram na costa algarvia, os transectos do Guadiana e de Albufeira e na costa espanhola as áreas 1 e 2.

O estado nutricional das larvas de sardinha, recolhidas na costa Norte de Espanha e Sul de Portugal, foi analisado sobretudo através de índices bioquímicos. No entanto, na costa algarvia utilizaram-se também, para o estudo da condição larvar, métodos morfométricos.

Deste modo, e apesar de não se ter realizado uma calibração dos métodos morfométricos, especificamente, para *S. pilchardus*, os resultados destes índices sugerem que as larvas capturadas na costa algarvia se encontravam em boa condição nutricional. Esta constatação baseou-se sobretudo no índice O/C (relação entre o diâmetro do olho e a altura da cabeça), uma vez que existem validações prévias em diferentes espécies *Trachurus trachurus*, *C. harengus* e *Gadus morhua*

(EHRlich *et al.*, 1976; THEILACKER, 1978; KOSLOW *et al.*, 1985; MCGURK, 1985). Estes trabalhos sugerem que, quando o globo ocular ocupa mais de 66 % da altura da cabeça, a larva deverá ser considerada em má condição, o que no presente estudo raramente ocorreu. Quer este índice (O/C) quer a relação entre o diâmetro do olho e a altura do corpo (O/P) evidenciaram flutuações, mais ou menos acentuadas, que se reflectiram em diferenças significativas entre os transectos realizados na costa algarvia. Tal associou-se, sobretudo, às diferenças entre os transectos do Guadiana e de Albufeira sendo, de acordo com os índices morfométricos, a condição das larvas superior no primeiro.

A proximidade do Rio Guadiana poderia justificar estes resultados, uma vez que o enriquecimento em nutrientes nas áreas adjacentes a estes sistemas poderá incrementar a produção zooplantónica base da alimentação larvar (LEGGETT & DEBLOIS, 1994). De facto, SUTCLIFFE (1972, 1973) referiu boas correlações entre as descargas dos rios no Golfo de St. Lawrence (Canadá) e a sobrevivência dos peixes. No entanto, a complexidade da teia alimentar planctónica torna difícil a comprovação de relações directas deste tipo.

A razão pela qual se analisaram, sobretudo, os índices baseados na relação entre duas características morfométricas, deveu-se ao facto de serem as mais utilizadas neste tipo de estudo (THEILACKER, 1978; KOSLOW *et al.*, 1985; POWELL & CHESTER, 1985). Para além disso, as características individuais, como a altura do corpo, mostram-se pouco úteis na diferenciação de larvas em boa ou má condição, pois apesar destas medições simples serem sensíveis à falta de alimento, tendem a aumentar com a idade, revelando, também, uma variabilidade natural grande (BLAXTER, 1971; EHRlich, 1974; EHRlich *et al.*, 1976). De facto, duas larvas da mesma idade e nas mesmas condições alimentares podem apresentar dimensões distintas, quer no geral quer em diferentes partes do corpo, pelo que a relação entre duas características morfométricas, em que uma delas não se altera significativamente, nem com a idade nem com o estado nutricional, poderá ser uma solução adequada. Neste sentido, a dimensão do globo ocular como não se modifica durante esse processo torna-se uma referência importante. Por outro lado, quando o alimento escasseia, a parte superior da cabeça altera-se de convexa para

côncava, diminuindo a sua altura, o mesmo ocorrendo com a altura do corpo na inserção das barbatanas peitorais (EHRlich *et al.*, 1976).

Contudo, nem estes índices que relacionam duas partes do corpo parecem ser completamente independentes da dimensão larvar. De facto, os valores mais elevados da relação O/C e da relação O/P, no transecto de Albufeira, estiveram provavelmente associados às larvas com os menores comprimentos que se recolheram nessa zona comparativamente ao transecto do Guadiana. Considerando que as larvas menores apresentam quer a altura da cabeça quer a altura do corpo mais reduzidas, tal reflecte-se nos índices O/C e O/P tornando-os superiores, uma vez que o diâmetro do olho se mantém relativamente constante. Estas relações decrescem ligeiramente à medida que o comprimento larvar aumenta. Assim, verificou-se uma correlação negativa (significativa apenas com $p < 0.1$), entre o comprimento da larva e o índice O/P. Tal parece contrariar os resultados de EHRlich *et al.* (1976) onde se refere que, para a espécie *C. harengus*, este índice é independente do comprimento da larva.

Por outro lado, as larvas em que se determinaram os índices morfométricos foram também processadas para a obtenção dos índices bioquímicos. Desta forma, obtiveram-se resultados sobre a condição de um indivíduo segundo índices diferentes, o que é pouco frequente em trabalhos desta índole. Com efeito, na maioria dos estudos retiram-se subamostras de larvas, que podem encontrar-se em distintas situações, para a análise dos vários índices (THEILACKER, 1978, 1986).

A comparação dos resultados sobre condição larvar realizada entre critérios morfométricos e bioquímicos revelou a existência de algumas diferenças. De facto, enquanto que os índices morfométricos indicaram que as larvas estariam em melhor condição no transecto do Guadiana, e em pior no transecto de Albufeira, os índices bioquímicos revelaram o contrário. Tal pode estar relacionado com a existência de uma percentagem bastante importante das larvas de sardinha capturadas com comprimentos entre 8 e 16 mm, correspondentes a uma etapa inicial ou intermédia do desenvolvimento larvar, na qual a aplicação dos índices morfométricos não tem revelado bons resultados.

Segundo THEILACKER (1981) a aplicação das características morfométricas, apesar de muito vulgarizada, não revela de forma significativa o estado nutricional da larva nas fases mais iniciais da sua vida.

A fraca e não significativa correlação que se verificou neste trabalho entre os índices bioquímicos e morfométricos, analisados no mesmo indivíduo, poder-se-à também dever, segundo SUTHERS (1992) e SUTHERS *et al.* (1992), a diferenças temporais na resposta às condições de inanição em cada tipo de índice. Com efeito, os índices bioquímicos apresentam uma resposta mais rápida, um a cinco dias, enquanto que os morfométricos são mais lentos demorando, entre cinco a sete dias ou mais, a detectarem as alterações provadas pela ausência de alimento (MARTIN *et al.*, 1985). Desta forma, o facto da melhor condição larvar, através de métodos morfométricos, se ter revelado no transecto do Guadiana, não assegurará que as larvas não tivessem sido sujeitas, mais recentemente, a *stress* nutricional, mas apenas que este ainda não se evidenciou morfologicamente.

Por este motivo, se as técnicas disponíveis para a análise da condição não forem suficientemente sensíveis, o verdadeiro papel da inanição é mascarado pois as larvas capturadas serão consideradas, incorrectamente, saudáveis. O facto dos métodos morfométricos não detectarem a inanição, nas fases larvares mais iniciais, é uma limitação importante pois é sobretudo após a exaustão das reservas vitelinas que as larvas estarão mais sujeitas à morte por esta via (HJORT, 1914; BLAXTER & STAINES, 1971; THEILACKER, 1981). Uma outra desvantagem deste tipo de método reside na falta de precocidade na detecção dos sintomas de inanição, mesmo em larvas mais avançadas. Tal é um inconveniente importante quando se pretende conhecer o futuro da larva em termos de sobrevivência. Como já foi referido, uma larva em fraco estado nutricional está mais sujeita à acção da predação e às condições abióticas desfavoráveis, mesmo que sobreviva à inanição.

Além da falta de sensibilidade na detecção dos sintomas iniciais da inanição, tem também sido demonstrado a existência de outros problemas na utilização dos índices morfométricos. Verificou-se, para várias espécies de peixes, que o processo

de captura das larvas afecta de forma significativa a sua morfometria, uma vez que causa a contracção do organismo (YIN & BLAXTER, 1986). Esta contracção, trata-se de um fenómeno diferencial, dependendo da zona do corpo, que é função do tempo de arrasto e do fixador usado. A contracção diferencial é, especialmente, prejudicial à utilização de índices que recorrem à relação entre duas medições (THEILACKER, 1978), como os que se utilizaram no presente trabalho, o que pode também ter estado na base da ausência da relação entre os índices bioquímicos e os morfométricos.

Mais recentemente, BUCKLEY *et al.* (1990) referem que uma medição simples e fácil de obter, o comprimento da larva, pode fornecer informação útil sobre a sobrevivência larvar potencial. De facto, BUCKLEY *et al.* (1991a) encontraram uma correlação directa entre a dimensão da larva com saco vitelino e a sobrevivência durante o primeiro mês de vida. Para estes autores, tal poderá explicar-se porque em cada fase do desenvolvimento, as larvas de dimensão superior têm, para além maior capacidade de capturar o alimento, um espectro mais amplo de presas disponíveis, função da maior abertura da boca. As larvas maiores têm, também, uma aptidão superior para evitar predadores, associada a uma maior velocidade de natação.

A análise dos comprimentos das larvas de sardinha capturadas em diferentes zonas da costa algarvia, não indicou a existência de diferenças significativas entre os transectos realizados. Contudo, na costa espanhola, onde não se determinaram índices morfométricos, mas apenas se registou o comprimento das larvas analisadas bioquimicamente, existiram diferenças significativas no comprimento das larvas entre áreas. A costa Norte apresentou comprimentos menores e a costa Noroeste maiores, o que poderá revelar, numa abordagem preliminar, um potencial de sobrevivência superior nesta última. No entanto, esta análise é pouco objectiva, uma vez que numa recolha de ictioplâncton captura-se uma grande variabilidade de dimensões larvares, nem sempre facilmente comparáveis entre si.

Um método morfométrico recente, que parece promissor pela acessibilidade e rapidez na análise do estado nutricional, recorre nos otólitos das larvas de peixes à

medição da dimensão dos anéis diários e ao seu estudo micro-estrutural (JONES & BROTHERS, 1987; RÉ, 1986; RÉ *et al.*, 1988; TZENG & YU, 1989; MAILLET & CHECKLEY, 1990). No entanto, a reduzida espessura dessas estruturas implica, normalmente, um microscópio electrónico, devido ao limite de resolução do microscópio óptico, o que constitui uma barreira importante à aplicação deste método.

De uma forma geral, os problemas associados à determinação do estado nutricional das larvas por métodos morfométricos não se colocam à utilização de índices químicos, sendo a sua aplicação relativamente mais rápida, pelo se consideraram estes últimos mais apropriados para a determinação do estado nutricional em larvas de peixes. As técnicas envolvidas detectam as alterações na condição alimentar no local onde estas primeiro se fazem sentir, ou seja a nível do conteúdo celular. Desta forma, permitem identificar mais cedo as larvas sujeitas a privação de alimento. Neste contexto, no presente estudo, a condição larvar foi analisada de forma mais aprofundada pelos índices bioquímicos, quer na costa algarvia quer na costa espanhola. Os índices bioquímicos estudados estiveram associados, sobretudo, à determinação dos ácidos nucleicos que constituíram índices *per si* ou através de relações entre eles e com as proteínas insolúveis. Esta escolha baseou-se, tal como foi analisado no Capítulo I, entre outras razões, no facto destes índices, sem terem uma resposta excessivamente rápida à falta da alimento, apresentarem maior precocidade na detecção dos sintomas iniciais da inanição.

Os resultados fornecidos pelos índices bioquímicos indicaram a existência de diferenças importantes a nível da condição larvar entre os locais estudados. No entanto, existiram índices em que tal foi mais evidente.

Assim, e da mesma forma que os índices morfométricos, baseados em medições simples, não separaram convenientemente os estados nutricionais, as quantificações simples de macromoléculas como DNA por larva, RNA por larva, ou proteína insolúvel por larva, não se consideraram adequadas para comparações entre o estado nutricional de larvas de diferentes dimensões. De facto, os índices

anteriormente referidos apresentaram uma relação exponencial com o comprimento.

Na costa portuguesa a concentração de DNA, expressa por mg de peso seco (DNA/mg), diferiu significativamente entre transectos, apresentando o seu valor médio mais reduzido no transecto de Albufeira, o que indica que seria nesta zona que as larvas se encontrariam em melhor condição. De facto, em situação de privação de alimento, o volume celular reduz-se e, um maior número de células está presente numa porção equivalente de tecido, o que implica uma maior quantidade de DNA por mg de peso seco. No entanto, o nível de $30\mu\text{g}$ DNA/mg correspondente a uma situação nutricional carenciada (BERGERON *et al.*, 1991), só foi alcançado muito esporadicamente nas zonas onde se verificaram os menores comprimentos larvares.

Este índice, DNA/mg, é especialmente sensível às condições de inanição nas fases larvares mais iniciais (BERGERON *et al.*, 1991). Tal também se reflectiu nos resultados do Capítulo III. Nas estações realizadas paralelamente à costa o valor mais baixo deste índice foi registado na TC4, situada na zona de Albufeira, o que parece revelar que este foi o local em que as larvas se encontravam em melhor condição nutricional. O índice DNA/mg correlacionou-se, de forma negativa mas significativa, com a densidade de *nauplii*, o que poderá estar relacionado com o facto destes serem o alimento preferencial das larvas mais pequenas (BLAXTER, 1969).

Em relação à razão RNA/Pins, esta também diferiu significativamente entre transectos. Os valores mais elevados deste índice registaram-se no transecto de Albufeira, o que também poderia indicar que seria esta a zona onde as larvas se encontrariam em melhor condição. No entanto, como se referiu nos resultados da experiência de validação (Capítulo III), este índice não será um dos mais indicados para a avaliação do estado nutricional, uma vez que não separou convenientemente as diferentes situações alimentares a que as larvas estiveram sujeitas e apresentou um dos maiores coeficientes de variabilidade dentro de cada grupo de larvas. Para

além disso não se correlacionou com nenhum dos parâmetros ambientais estudados, com o objectivo de compreender melhor a variação da condição larvar.

No que respeita à costa espanhola, a concentração de DNA expressa por mg de peso seco (DNA/mg), bem como a concentração de RNA expressa por mg de proteína insolúvel (RNA/Pins), indicaram, por vezes, a existência de diferenças significativas entre áreas. De uma forma geral, os valores foram superiores na costa Noroeste. Apenas no mês de Maio estes índices não detectaram a existência de diferenças significativas entre áreas, o que não seria de esperar uma vez que é nesse período que as condições ambientais mais se distinguem entre zonas (IBANEZ, 1984; GARCIA-SOTO *et al.*, 1991; ROBLES *et al.*, 1992). Assim, e apesar do índice DNA/mg se ter correlacionado significativamente com algumas variáveis ambientais medidas na costa algarvia, não se mostrou muito apropriado para separar as áreas espanholas com características potencialmente diferentes para a sobrevivência larvar.

O índice Pins/DNA apresentou poucas flutuações na costa espanhola, mas evidenciou diferenças significativas entre os transectos realizados na costa algarvia. De facto, este índice de massa celular indicou variações nas dimensões celulares das larvas capturadas nos diferentes transectos, mas não se relacionou com nenhum dos factores ambientais estudados. Tal não invalida que, dentro de uma determinada classe de comprimento, uma redução da massa celular não implique uma situação nutricional carenciada (BULOW, 1987).

As variações mais significativas na condição larvar, quer na costa algarvia quer na costa espanhola, foram detectadas através da razão RNA/DNA, tanto entre os diferentes épocas como entre locais amostradas. Na costa algarvia o transecto de Albufeira registou os valores mais elevados de condição larvar, encontrando-se níveis relativamente inferiores na zona a Este, ou seja, no transecto do Guadiana. Na costa espanhola verificou-se, quer no ano de 1991 quer em 1992, uma tendência relativamente acentuada para os valores mais elevados da razão RNA/DNA ocorrerem na costa Noroeste (área 3) e os mais baixos na costa Norte, sobretudo, na zona mais a Este (área 1).

A análise individual das larvas de sardinha permitiu que, no mesmo organismo, se recolhesse informação relativa a vários índices bioquímicos. Tal facto facilita a comparação entre eles, bem como possibilita a análise da variabilidade inerente. Com efeito, analisando a maioria dos histogramas dos diferentes índices por estação, observa-se uma relativa dispersão de valores relativos às larvas recolhidas num mesmo local. Demonstra-se assim que, como é do conhecimento geral, a integração dos resultados provenientes de uma mistura de larvas implica, necessariamente, perda de informação. A utilização do valor médio de determinado índice por estação, apesar de facilitar a análise dos resultados, despreza a variabilidade intrínseca que em certas situações pode facilitar a interpretação global. Assim, por exemplo, na estação E42 da costa espanhola, apesar de se situar na área 3 apresentou, em 1991, algumas larvas com valores de RNA/DNA reduzidos e de DNA/mg elevados. Tal revela que, contrariamente à indicação geral dos resultados, existiram nesse local larvas em estado nutricional mais fraco.

A análise da distribuição de frequências dos índices bioquímicos, em especial da razão RNA/DNA, evidenciou, de uma forma geral, que as observações, quer na extremidade direita quer esquerda, foram sempre relativamente reduzidas. De facto, a ausência de larvas com valores baixos de RNA/DNA confirma a informação geral de que a maioria dos indivíduos se encontrariam em boa condição nutricional. Tal poder-se-à explicar quer pela acção da predação que eliminou as larvas mais fracas, que potencialmente existiriam nessas classes, quer pela mortalidade directa por inanição, quer ainda devido a uma efectiva melhor condição das larvas nessas estações.

Por outro lado, o facto de normalmente não existirem larvas nas classes superiores dos índices de condição, deve-se à evasão à rede das larvas de maior comprimento e melhor alimentadas ou porque as larvas atingem, num determinado nível não muito elevado da razão RNA/DNA, a taxa máxima de crescimento proteico (ROBINSON & WARE, 1988).

A comparação entre os índices calculados com base na concentração dos ácidos nucleicos demonstrou, de acordo com os resultados da experiência de validação (Capítulo III), que a razão RNA/DNA será o índice mais adequado ao estudo da condição nutricional. Este índice tem ainda a vantagem adicional de fornecer informação sobre a taxa de crescimento proteico instantâneo das larvas de peixe (BUCKLEY, 1984). Para além disso, a razão RNA/DNA foi o índice que mais se associou e melhor se correlacionou com os factores ambientais, não se correlacionado significativamente com o comprimento das larvas. Esta é uma vantagem importante, tal como se referiu, sobretudo quando se considera a grande variabilidade de dimensões larvares existentes numa recolha de ictioplâncton.

De uma forma geral, na costa algarvia o transecto de Albufeira apresentou-se, quer a nível abiótico quer a nível biótico, com características particulares. Para além de, neste local, se registaram os valores mais elevados de condição larvar, expressa pelos índices bioquímicos, foi também aqui que se encontraram dos valores mais elevados de velocidade do vento, turbulência da água, densidade de presas e de predadores. Também, a análise multivariada evidenciou uma certa associação entre as estações integradas neste transecto ou próximo dele.

Relativamente às variações da razão RNA/DNA na costa espanhola, os valores mais elevados na costa Noroeste associaram-se preferencialmente a locais com temperatura da água mais reduzida e com maior disponibilidade de alimento. No entanto, dispôs-se de menos informação do que na costa algarvia, a nível de parâmetros bióticos, especialmente no que se refere a presas potenciais e especialmente de predadores.

As flutuações registadas nos índices bioquímicos, analisados em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na zona costeira da Península Ibérica, associaram-se a distintos factores bióticos e abióticos. As variáveis ambientais que influenciam a condição das larvas são normalmente as mesmas que determinam a sobrevivência larvar, daí que mereçam ser mais aprofundados nas secções seguintes.

4.1.1-Temperatura

A temperatura da água é o parâmetro abiótico determinado mais usualmente nos estudos sobre as fases embrionárias e larvares de peixes. De facto, esta variável parece controlar a distribuição espaço-temporal dos ictioplanctontes (LAPRISE & PEPIN, 1995) e pode influir na própria viabilidade destas fases (ALDERDICE & FORRESTER, 1971a,b; HEUFELDER *et al.*, 1982; GOOLISH *et al.*, 1984; BUCKLEY *et al.* 1990; BLAXTER, 1992; SUTHERS & SUNDBY, 1993; McCORMICK & MOLONY, 1995).

A ausência de relação significativa entre a temperatura e a condição larvar, registada neste trabalho, bem como a reduzida variação explicada por este factor, podem estar relacionadas com o facto das determinações destes dois parâmetros terem sido realizadas em simultâneo. Com efeito, a temperatura parece actuar com algum desfasamento, mas influenciando a condição do futuro indivíduo. Foi demonstrado que em determinadas espécies de clupeídeos, a temperatura da água, entre um a dois meses antes da postura, ou seja nas últimas fases da maturação dos gâmetas e durante o desenvolvimento embrionário e larvar, afecta a composição bioquímica das larvas de peixes (BUCKLEY *et al.*, 1990).

Também a fecundidade específica e a dimensão dos ovos parecem estar relacionados com a temperatura da água do mar, dois a três meses antes da postura, aumentando a fecundidade com a temperatura enquanto a dimensão do ovo diminui (WARE, 1975; TANASICHUK & WARE, 1987). Apesar do número de oócitos que entram em vitelogénese ser provavelmente determinado mais cedo no ciclo reprodutivo (BURTON & IDLER, 1984), vários aspectos importantes ocorrem durante as fases finais do desenvolvimento gametogénico, incluindo a deposição de vitelo e a divisão meiótica final.

Contudo a composição química da larva na altura da eclosão e da primeira alimentação apresentam uma relação mais complexa com a temperatura da água do que entre a temperatura e a dimensão do ovo. Tudo parece indicar que o conteúdo químico do ovo é modificado de alguma forma em resposta à temperatura da água antes da postura. Muito provavelmente, esta resposta vai para além da

produção de ovos grandes ou pequenos em que os componentes químicos se apresentam na mesma proporção. A relação entre os principais componentes orgânicos, incluindo proteínas, lípidos, carboidratos e ácidos nucleicos, pode ser alterado em função da temperatura. Mais subtis, mas possivelmente mais significativas, são as alterações na composição do oócito em desenvolvimento como resposta à temperatura da água, o que pode incluir alterações no conteúdo, composição e actividade, das enzimas, das hormonas e do RNA (BUCKLEY *et al.*, 1991a,b).

Nesta perspectiva seriam de esperar diferenças, nomeadamente a nível da razão RNA/DNA, entre larvas de sardinha provenientes da postura invernal e da postura primaveril. Com efeito, a postura da sardinha na costa algarvia em Dezembro de 1991 foi precedida por um período de amadurecimento dos gâmetas a temperaturas mais altas (Setembro - 21°C), relativamente à postura de Abril/Maio de 1992 que foi precedida de temperaturas mais baixas (Fevereiro - 15.4 °C). Tal, não pareceu conduzir, nos resultados deste estudo, a diferenças significativas na condição larvar expressa pela razão RNA/DNA, medida em Dezembro e em Maio. No entanto, um estudo mais aprofundado sobre esta matéria será necessário.

Apesar de não significativa, verificou-se uma correlação negativa entre a condição larvar (RNA/DNA) e a temperatura, o que poder-se-à associar à diminuição da actividade dos ribossomas quando a temperatura da água decresce, sendo necessário uma maior concentração desta macromolécula para assegurar as mesmas funções (BULOW, 1987; HOULIHAN *et al.*, 1993), enquanto que a concentração de DNA se mantém estável. Contudo, quando se associou à temperatura outros parâmetros na regressão múltipla, como a velocidade do vento, ou a densidade de predadores, a temperatura passou a apresentar um coeficiente negativo mas significativo, explicando uma maior percentagem de variação. Convém também referir que o número total de presas e de predadores também se correlacionaram negativamente com a temperatura, e de forma significativa. No entanto, o facto de as larvas de sardinha em melhor estado nutricional se encontrarem nos locais amostrados com a temperatura da água mais baixa, contraria, de certa forma, uma visão mais tradicional da dinâmica trófica.

Com efeito, as temperaturas elevadas aumentam o metabolismo das larvas de peixes e a sua taxa de crescimento, provocando uma diminuição do período de desenvolvimento embrionário e larvar (PEPIN, 1991; BLAXTER, 1992). Adicionalmente, uma maior disponibilidade de presas de larvas de peixes está associada a águas mais quentes (UITTO, 1996), o que contribui também para o aumento do crescimento larvar (TARGGART & LEGGETT, 1987). Por fim, os predadores invertebrados parecem ser menos abundantes nas águas quentes superficiais, o que aumenta a sobrevivência na fase larvar (FRANK & LEGGETT, 1985). Esta divergência entre os resultados obtidos e o conhecimento geral pode explicar-se pela existência de afloramento sazonal nas zonas estudadas (WOOSTER *et al.*, 1976).

Este fenómeno verificou-se, sobretudo, na costa ocidental da Península Ibérica. De facto, e apesar de ter ocorrido afloramento na costa algarvia, na altura das recolhas, este foi evidente, apenas, na zona mais a oeste, afectando unicamente o transecto de Sagres. Com efeito, todos os restantes transectos diferiram significativamente deste a nível da temperatura da água. A tal facto deve estar, também, associado o reduzido o número de indivíduos encontrado nessa área, o que se deverá ao transporte dos zooplanctontes para o largo.

No fim de Abril de 1992 existia uma diferença nítida entre a temperatura da água na costa ocidental e na costa algarvia, mas que se atenuou com o decorrer da amostragem. Inicialmente, devido ao afloramento que ocorreu na costa ocidental, uma massa de água fria pareceu contornar o cabo de São Vicente e estender-se até próximo da costa africana, aprisionando no Sotavento da costa algarvia uma massa de água mais quente. Estes resultados estão de acordo com MONTEIRO *et al.* (1983), FIÚZA (1980,1983) e FIÚZA *et al* (1982) que referem que quando no início da Primavera se verifica a ocorrência de afloramento na costa ocidental, as águas afloradas estendem-se para além da costa ocidental, sobretudo durante os períodos de maior intensidade de vento Norte. Ainda segundo estes autores o aparecimento da água fria a alguma distância da costa algarvia explica-se pelo declive pouco

acentuado desta plataforma, que leva a que seja interpretada como uma costa, "ignorando" a verdadeira.

Verificou-se com o decorrer da amostragem uma diminuição progressiva da influência da água aflorada na costa Sul, e um aumento da influência de uma massa de água proveniente, provavelmente, do Mediterrâneo ou da costa da África do Norte, tornando-se as temperaturas ao longo da costa mais homogêneas. As diferenças entre a costa algarvia e a costa ocidental diminuíram também, provavelmente, devido à atenuação ou fim do afloramento.

As zonas estudadas na costa espanhola foram também atingidas pelo afloramento costeiro entre Abril e Maio (LOPEZ-JAMAR *et al.*, 1991). A ocorrência de afloramento registou-se, especialmente, nas estações amostradas a Noroeste (área 2 e 3). Nesta área a temperatura da água foi mais reduzida comparativamente às áreas 1 e 4. De facto, segundo LAVIN *et al.* (1992a,b) devido ao afloramento que ocorre, entre Março e Novembro, a água ao largo da costa Noroeste de Espanha é normalmente mais fria do que no Mar Cantábrico, verificando o contrário no Inverno, ou seja a temperatura da água é, em média dois graus, mais elevada na costa Noroeste. Assim, na plataforma continental do Mar Cantábrico podem distinguir-se as zonas Este e Oeste, com características térmicas e dinâmicas diferentes. Esta diferenciação é especialmente nítida durante o período de Primavera e Verão (IBANEZ, 1984; GARCIA-SOTO *et al.*, 1991; ROBLES *et al.*, 1992), o qual constitui uma época importante para a sobrevivência de larvas e juvenis de sardinha (CABANAS *et al.*, 1992). Associado a este facto, está a constatação de os maiores comprimentos larvares ocorrerem também na costa Noroeste, onde as condições de sobrevivência potencial serão superiores, e os menores na costa Norte, sobretudo a Este.

Estes resultados poderão explicar-se pela postura da sardinha no Mar Cantábrico se realizar principalmente na região a Este (LANZÓS *et al.*, 1988; SOLÁ *et al.*, 1990). Assim, apesar de as melhores condições alimentares que se verificam na costa Noroeste devido ao afloramento (CHESNEY & ALONSO-NOVAL, 1989; LOPEZ-JAMAR *et al.*, 1991), a postura ocorre noutro local. Este comportamento pode ser compreendido como uma selecção adaptativa, de forma a evitar o transporte dos

peixes recém-eclodidos para o largo, que ocorre em zonas de afloramento costeiro (PARRISH *et al.*, 1981) e que iria afastar as larvas de sardinha do seu *habitat*.

Por outro lado, proporcionando o aproveitamento das condições alimentares surgidas na costa Noroeste, no período da reprodução, entre Abril - Junho, a circulação altera-se deixando o padrão de Inverno. A direcção da corrente superficial passa a ser de Este para Oeste (ROBLES *et al.*, 1992), favorecendo o transporte das larvas recém-eclodidas da zona de postura (Mar Cantábrico) para a zona de alimentação a Oeste. Os indivíduos provenientes da postura realizada em Abril no Mar Cantábrico serão transportados para a costa Oeste onde existe alimento abundante, associado ao afloramento costeiro (SOLÁ *et al.*, 1990). Devido a este fenómeno, algumas larvas podem ser dispersadas para o largo do Cabo Finisterra, onde provavelmente perecerão por inanição. Foram, de facto, as larvas recolhidas nas estações mais afastadas, por exemplo, em Maio 1991, a estação E42, e em Maio de 1992, a estação E71 que apresentaram valores muito reduzidos de RNA/DNA.

Nesta perspectiva, salienta-se que uma compreensão tão aprofundada, quanto possível, dos factores que determinam a época e duração da postura, pode contribuir para o esclarecimento dos factores que influenciam o crescimento e sobrevivência dos ovos e larvas de peixes (MACKENZIE *et al.*, 1996) e em particular de *S. pilchardus*.

A localização espaço-temporal da postura desta espécie, quer na costa portuguesa quer espanhola, parece seguir uma estratégia, que evita as épocas e zonas onde o afloramento se faz sentir mais acentuadamente. Assim, a época de postura da sardinha na costa ocidental situa-se preferencialmente entre Dezembro e Janeiro (AFONSO, 1991), período em que não existe afloramento, enquanto que no Mar Cantábrico (LANZÓS *et al.*, 1988; CHESNEY & ALONSO-NOVAL, 1989; SOLÁ *et al.*, 1990) e no Algarve ocorre sobretudo entre Março e Abril (RÉ *et al.*, 1990), uma vez que neste locais o afloramento não se faz sentir, pelo menos de forma tão acentuada.

As consequências do afastamento das fases embrionárias e larvares, dos locais mais apropriados para o seu desenvolvimento, são abordadas na hipótese da “retenção larvar” ou “membro/errante” (member/vagrant) (SINCLAIR, 1988). Esta hipótese desenvolve numa perspectiva muito mais abrangente, uma ideia inicial onde se considera que as correntes transportando os estados iniciais da vida dos peixes para longe da costa, podem contribuir para as variações interanuais de abundância dos peixes (HJORT, 1926; WALFORD, 1938). A teoria da “retenção larvar” explica os mecanismos reguladores das populações marinhas que se reproduzem sexualmente. Esta hipótese enfatiza que os membros de uma população marinha necessitam de estar no lugar certo na altura certa do seu ciclo de vida, de forma a não se perderem da população evitando-se assim que se tornem errantes. Uma população pode perder membros quer por processos espaciais (deslocações para fora da área geográfica de distribuição da população) quer por processos energéticos (a predação, a doença ou a inanição). No entanto, segundo esta hipótese, os processos espaciais e independentes da densidade são os principais responsáveis pela perda de membros da população. Assim, é necessário que a hidrografia local assegure a retenção de um número suficiente de estados embrionários e larvares, para permitir a continuidade da população naquela área (GRAHAM, 1972).

Com efeito, e tal como se verificou neste estudo relativamente a *S. pilchardus*, um trabalho efectuado com *Theragra chalcogramma* refere a fraca condição e reduzida taxa de crescimento em larvas afastadas dos locais onde, em situações normais, o seu desenvolvimento ocorre (BAILEY *et al.*, 1995). Embora o destino das larvas “expatriadas” não seja necessariamente a morte, a maior duração da vida planctónica dificulta a sobrevivência (MYERS & CADIGAN, 1993), uma vez que prolonga a exposição à predação, aumenta o risco de inanição e a probabilidade de aparecimento de fenómenos hidroclimáticos desfavoráveis. A distribuição relativamente superficial das fases larvares de sardinha, entre os 0 e 30 metros (FAGE, 1920; RÉ, 1984) torna-as mais susceptíveis a estes fenómenos, nomeadamente a valores elevados de temperatura do ar, velocidade do vento e turbulência.

4.1.2 - Vento e turbulência

A razão RNA/DNA correlacionou-se, significativamente e de forma positiva, com a velocidade do vento, além do que esta última variável explicou uma parte importante da variação deste índice bioquímico na costa algarvia. Por outro lado, quer a densidade total de predadores quer de quetognatas também se relacionaram positivamente com a velocidade do vento. A turbulência, apesar da correlação positiva com a razão RNA/DNA, não teve um coeficiente significativo. No entanto, a turbulência de pequena escala causada pelo vento é considerada um factor importante na dinâmica trófica do plâncton, incluindo as larvas de peixes (HUNTER, 1972). Com efeito, este tipo de turbulência aumenta a taxa de encontro entre as partículas de alimento e a larva, podendo melhorar a sua condição geral (MACKENZIE *et al.*, 1990; MACKENZIE & LEGGETT, 1991; MACKENZIE & KJØRBOE, 1995). No entanto, valores excessivos tornam-se prejudiciais (LASKER, 1975, 1981).

A influência do vento e da turbulência na condição larvar constituíram a base para o estabelecimento da hipótese da "estabilidade" (stable ocean) (LASKER, 1975, 1981). Segundo esta teoria, apenas um ambiente oceanograficamente estável permite a agregação de presas nas quantidades necessárias para larvas de peixes. Para este autor, as tempestades e o afloramento podem provocar turbulência excessiva, a qual destruindo as agregações de alimento, origina uma pesada mortalidade e possivelmente um fraco recrutamento.

Por outro lado, as condições de calma completa podem não ser ideais para as larvas, em termos de alimentação, uma vez que numa coluna de água estratificada, o fluxo vertical de nutrientes para a zona eufótica diminui, reduzindo a produção de fitoplâncton e, por conseguinte, de zooplâncton (WROBLEWSKI *et al.*, 1989). Estes autores propuseram algumas alterações à hipótese da "estabilidade", para eles a duração e velocidade do vento devem ser suficientemente altas para aumentarem a profundidade da camada de mistura. Por outro lado, consideram que a frequência de tempestades deve ser reduzida, de forma a maximizar a duração do período de calma, para permitirem às larvas adquirirem reservas energéticas suficientes para ultrapassar os períodos de provável ausência de presas durante as tempestades.

Estas conclusões são suportadas pelo facto da postura de certas espécies, como *Engraulis mordax*, na zona Central e Sul da Califórnia se efectuar na Primavera e não durante o Verão, (época em que os ventos são mais calmos e a coluna de água está muito estratificada), como seria esperar, se considerar, apenas, a hipótese da “estabilidade”, tal como LASKER (1981) a propôs. De facto, também a espécie em estudo, *S. pilchardus*, na costa portuguesa evita o Verão, realizando a postura preferencialmente noutras épocas do ano, quando a estabilidade da coluna de água é menor.

Embora na costa algarvia não se registem normalmente ventos fortes, na costa espanhola, a Norte do Cabo Finisterra, o vento é por vezes forte, superior a 10 m/s, o que causa uma elevada turbulência e destabiliza a água até uma profundidade de 25 ou 30m, podendo atingir os 80 m (MCLAIN *et al.*, 1986; LAVÍN *et al.*, 1992b). Com efeito, o vento forte destrói os agregados planctónicos e contribui para uma redução da condição nutricional (FRANK & LEGGETT, 1981; MACKENZIE & LEGGETT, 1991). Tal poderá justificar os reduzidos valores da razão RNA/DNA encontrada nesse local, concretamente nas estações mais ao largo do Cabo Finisterra.

A hipótese “Ambiente Ótimo” (Optimal Environmental Window) (ROY *et al.*, *in press*) sugere que a sobrevivência larvar aumenta com a intensidade do afloramento em áreas em que a velocidade do vento é baixa ou moderada. Desta forma, a turbulência produzida é em pequena escala, tornando-se a disponibilidade de alimento o factor determinante. Por outro lado, o sucesso do recrutamento diminui com a intensidade do afloramento em áreas de ventos fortes. Neste caso, as condições físicas adversas, relacionadas com a turbulência elevada que provocam a destruição dos “agregados” de presas e de larvas, ou o transporte para longe da costa, são determinantes na taxa de mortalidade larvar. Esta hipótese pressupõe a existência de uma relação não linear entre o sucesso do recrutamento e a intensidade do afloramento. Desta forma, parece conciliar os resultados contraditórios que têm sido encontrados entre o afloramento costeiro e a sobrevivência larvar/recrutamento, consoante as zonas em estudo e as espécies,

sendo em alguns casos positiva e noutros negativa (DICKSON *et al.*, 1988; BELVEZE & ERZINI, 1983).

O afloramento deverá ter um efeito negativo na sobrevivência larvar quando a mistura causada pelo vento é grande, e isto apesar da produção primária aumentar. Uma velocidade de vento baixa ou moderada, próxima de 5-6 m/s, de acordo com a hipótese de ROY *et al.* (*in press*) parece ser o ideal, uma vez que em velocidades inferiores a disponibilidade de presas poderá ser limitante e para valores superiores os factores hidrodinâmicos negativos prevalecerão. Foi apenas no transecto de Albufeira da costa algarvia que os valores da velocidade do vento, se aproximaram dos referidos, sendo também aí que se registaram os níveis mais elevados de condição larvar, o que poderá indiciar, de alguma forma, a importância deste factor.

A demonstração do efeito potencial da turbulência de pequena escala, na taxa de encontros em sistemas de afloramento, aumenta a compreensão dos processos que favorecem a produção biológica dessas áreas. Explicações prévias das elevadas produções aí registadas focavam-se sobretudo nos efeitos positivos do aumento dos nutrientes, do fitoplâncton e níveis seguintes. No entanto, muito desse incremento na produção pode ser atribuído ao aumento da taxa de encontro entre os consumidores e suas presas, como resultado da turbulência em pequena escala (MACKENZIE & KIØRBOE, 1995), isto apesar das restrições colocadas por vários autores (BROWMAN, 1996; OSBORN & SCOTTI, 1996; SUNDBY, 1996; YAMAZAKI, 1996) a esta associação, por ser considerada demasiado simplista.

Salientam-se desta forma as relações que se estabelecem, entre os "compartimentos" biótico e abiótico, num sistema dinâmico como é o meio marinho. De facto, embora a importância das condições hidroclimáticas na sobrevivência dos ictioplânctontes e conseqüentemente na estrutura futura das populações mereça grande destaque (HEATH, 1990; KING & BANG, 1990; OLIVAR, 1990; TOWNSEND *et al.*, 1990), analisar a influência dos factores físicos, isoladamente, na mortalidade larvar poderá ser incorrecto. Na realidade, a circulação, por exemplo, contribuirá para afastar ou aproximar as larvas das zonas mais ou menos favoráveis, em termos de alimentação e predação, mas deverão ser, sobretudo, estes os factores

directamente responsáveis pela mortalidade. Com efeito, apenas uma integração tão completa quanto possível das variáveis abióticas e bióticas permitirá para uma progressiva compreensão desta problemática. De entre as variáveis bióticas, a predação merece, actualmente, grande destaque (BAILEY & HOUDE, 1989; PURCELL, 1990; PEPIN & SHEARS, 1995).

4.1.3 - Predação

Um dos parâmetros bióticos mais associado à variação da razão RNA/DNA foi a densidade de alguns predadores potenciais. De facto, esta variável explicou a maior parte da variação deste índice, quer individualmente quer associado à temperatura ou vento, e apresentou dos mais elevados coeficientes de correlação significativos. Apesar de se poder tratar de uma associação sem qualquer significado biológico, já foram referidas evidências da existência de uma relação entre a condição larvar e a acção da predação (ROBINSON & WARE, 1988). Com efeito, esta associação pode parecer numa primeira abordagem pouco clara, mas a eliminação pelos predadores das larvas em pior condição leva a um aumento médio do estado nutricional dos indivíduos que não foram predados e portanto capturados pela rede de plâncton.

Os resultados do presente trabalho estão parcialmente de acordo com os de MCGURK *et al.* (1992). Estes autores verificaram que a influência da concentração de presas na variação da razão RNA/DNA era marginal ou inexistente, tal como se registou para a costa algarvia, mas que existia um outro factor ambiental com carácter sazonal não identificado que explicava a variação da razão RNA/DNA, e que poderia tratar-se da predação.

A predação tem sido, de facto, considerada como um factor de grande relevância na sobrevivência embrionária e larvar (MURPHY, 1961; HEMPEL, 1965), podendo mesmo ser o principal agente de mortalidade nestas fases iniciais da vida dos peixes (CUSHING, 1974; PETERMAN & GATTO, 1978). No seguimento desta tendência, HUNTER (1981) foi mais longe e apresentou a hipótese da "predação", que postula que a variabilidade do recrutamento dos peixes é determinada pela acção deste factor sobre os primeiros estados de desenvolvimento planctónicos.

No entanto, a comprovação desta hipótese no meio natural tem sido difícil de alcançar. Os métodos para o estudo da mortalidade geral, em particular da predação no meio aquático, estão ainda pouco desenvolvidos (OWEN *et al.*, 1989; LO *et al.*, 1989). Por outro lado, são raros os trabalhos sobre larvas de peixes que dediquem simultaneamente alguma atenção aos seus potenciais predadores (BAILEY & HOUDE, 1989).

Nesse sentido no presente trabalho, devido à grande variedade de potenciais predadores de larvas de peixes, optou-se por analisar apenas os invertebrados zooplanctónicos que ocorrem simultaneamente com as larvas de peixes nas recolhas de mesozoplâncton. Consideraram-se potenciais predadores zooplanctónicos de ictioplanctontes todos os grupos de organismos sobre os quais já se tivessem descrito evidências de ingerirem este tipo de presas no meio aquático e que segundo LILLELUND & LASKER (1971), THEILACKER & LASKER (1974), ARAI & HAY (1982), MOLLER (1984), BAILEY & HOUDE (1989) e COWAN & HOUDE (1993) integram, principalmente, os seguintes grupos: misidáceos, ctenóforos, cnidários, quetognatas e tunicados.

No entanto, o tipo de estudo realizado nesta tese, que se baseou na recolha em simultâneo larvas de peixes e predadores, é contestado por alguns autores (HOUDE & SCHEKTER, 1980; FRANK & LEGGETT, 1985). Estes trabalhos sugerem que muitas espécies de peixes desenvolveram um mecanismo que minimiza o impacto potencial dos predadores zooplanctónicos, através da realização das posturas em zonas da costa onde estes últimos estão ausentes, ou presentes em quantidades reduzidas. No entanto, este estudo demonstrou que, pelo menos, alguns grupos potencialmente importantes de predadores ocorreram em quantidades importantes com as larvas de peixes. Com efeito, as populações de muitos predadores apresentam um comportamento gregário e um crescimento que parece estar directamente relacionado com a concentração de ovos e larvas de peixes (SMITH, 1985). Esta questão é, também, confirmada por HUNTER (1981), particularmente se os predadores são invertebrados que aparecem em "agregados" (VEER, 1985, 1986; COWAN & HOUDE, 1993), como por exemplo medusas ou quetognatas.

De facto, os resultados deste estudo mostraram que os quetognatas, em particular *Sagitta friderici*, foram um grupo quase sempre presente nas capturas onde ocorreram larvas de sardinha e com percentagens relativas, por vezes, bastantes elevadas. Dos restantes grupos estudados apenas as hidromedusas merecem um destaque especial pela sua abundância.

Os quetognatas, não obstante constituírem um grupo taxonómico relativamente pequeno, são bastante abundantes e contribuem de forma significativa para a biomassa total do zooplâncton (RAYMONT, 1983). Apesar das suas dimensões serem semelhantes às das larvas de peixes, estes organismos conseguem ingerir presas de dimensões muito superiores às suas (PURCELL, 1989).

Enquanto muitos cnidários não têm possibilidade de detectar as suas presas antes de se estabelecer contacto físico entre eles, limitando este facto de certa forma o seu potencial de captura, os quetognatas reagem através de mecanorrecepção e respondem, por exemplo, ao batimento das barbatanas caudais das larvas de peixes (KUHLMANN, 1977). Em laboratório, os quetognatas exibem taxas de ingestão de larvas de peixes, comparativamente mais baixas do que a ingestão de copépodes, mas no meio natural ainda não se fez esta comparação. Contudo, e devido à grande abundância de quetognatas no meio marinho e à elevada capacidade de captura, tornam-se consumidores potencialmente importantes de larvas de peixes sobretudo em zonas de agregados de ictioplanctontes (BREWER *et al.*, 1984).

Quer os cnidários quer os quetognatas, além de serem ambos potenciais predadores das larvas de peixes, também competem com estas por alimento, o que aumenta o seu impacto na sobrevivência e na condição geral das larvas de peixes (PURCELL, 1990). Assim, de acordo com PEPIN & SHEARS (1995), as larvas de peixes podem ser vulneráveis quer à predação quer à competição por parte dos mesmos organismos, uma vez que os considerados predadores de “corpo-mole” consomem as mesmas presas que as larvas de peixes, *nauplii*, copepoditos, velígeras de bivalves e tintínídeos. Este tipo particular de predadores são

organismos versáteis pois conseguem consumir presas de uma gama bastante ampla de dimensões. Tal poderá estar na base do coeficiente de correlação entre a densidade de quetognatas e a densidade de *nauplii*, que apresentou um valor positivo significativo. Com uns competidores fortes por alimento as larvas tenderão a tornarem-se mais fracas. No entanto, como a condição geral das larvas foi elevada, tal indicará que a influência da predação foi preponderante relativamente à competição por alimento. Por outro lado, é necessário considerar que as larvas em mau estado nutricional estão mais susceptíveis de serem predadas, o que reduzirá o número de indivíduos em fraca condição. Estes factos devem estar associados à correlação bastante significativa que se estabeleceu entre a razão RNA/DNA e a densidade de predadores e, especialmente, de quetognatas presentes nas amostras recolhidas.

Os quetognatas parecem ter, assim, um papel de relevo na compreensão da variabilidade da condição geral das larvas de sardinha entre as várias zonas estudadas na costa algarvia. Não obstante, não se ter realizado nenhuma experiência onde se comprovasse que os quetognatas presentes ingeriam, na realidade, as larvas de sardinha, encontram-se referências a trabalhos, quer laboratoriais (KUHLMANN, 1977) quer no meio natural (LEBOUR, 1923; BREWER *et al.*, 1984) que comprovam este facto, para outras espécie de clupeídeos, como *C. sprattus* e *Engraulis encrasicolus*.

Apesar de não terem sido quantificados neste estudo, devido a dificuldade de amostragem, convém não deixar de referir que os peixes pelágicos filtradores podem também preda de forma significativa os ovos e larvas da sua própria espécie (canibalismo) ou de qualquer outra. A predação exercida pelos peixes planctófagos parece ser mais importante do que a atribuída aos invertebrados zooplanctónicos (FUIMAN & GAMBLE, 1989). O modo de vida em cardume e o comportamento migratório deste tipo de peixes permite-lhes procurar extensas áreas e concentrarem-se naquelas em que o alimento é abundante, o que não acontece com os predadores zooplanctónicos que dependem basicamente das correntes para as deslocações horizontais. Por outro lado, enquanto que a maioria dos holozooplancntones são pequenos demais para serem retidos pelos peixes

adultos, os ovos e as larvas de peixes apresentam uma dimensão óptima, que os torna alvo de muitas espécies de peixes pelágicas (SKJOLDAL & MELLE, 1989).

Na realidade, as dimensões das larvas de peixes parecem desempenhar um papel determinante no esclarecimento dos processos que afectam a sua relação com os potenciais predadores no meio natural. CUSHING (1974) assinalou que devia existir uma relação inversa entre a taxa de mortalidade e a idade ou dimensão das larvas, como resultado da diminuição dos predadores potenciais nas fases mais avançadas. Também, de acordo com a hipótese de BAILEY & BATTY (1984), “quanto maior melhor” (bigger-is-better), são as larvas de menores dimensões as mais sujeitas à acção da predação.

Esta hipótese, ou seja a possibilidade de as larvas de menores dimensões serem predadas mais facilmente, poderá estar na base da ausência de diferenças significativas, a nível dos comprimentos larvares entre os transectos estudados na costa algarvia. De facto, a eliminação preferencial no meio marinho dos indivíduos menores tende a produzir uma maior homogeneidade nas dimensões das larvas recolhidas (FUIMAN & GAMBLE, 1989; PEPIN, 1989a; LITVAK & LEGGETT, 1992; PEPIN *et al.*, 1992)

Foram também apresentadas algumas evidências por LITVAK & LEGGETT (1992) e COWAN & HOUDE (1992), que contrariam a hipótese anterior (BAILEY & BATTY, 1984). Segundo estes autores, em algumas circunstâncias as larvas mais pequenas, dentro de uma determinada idade e em certos estados de desenvolvimento, dispõem de um potencial de sobrevivência superior relativamente à acção da predação. A maior dispersão, a menor velocidade de natação e a diminuição do campo reactivo do predador para larvas mais pequenas proporcionam uma diminuição da acção da predação. De facto, o comportamento pouco activo das larvas com falta de alimento ou de menor idade pode reduzir as possibilidades de encontro com os predadores ou não estimular o ataque por parte destes (GAMBLE & FUIMAN, 1987).

No entanto, o esclarecimento destas hipóteses não é fácil de alcançar devido à ausência de métodos eficazes para o estudo da mortalidade por predação nas fases iniciais da vida dos peixes. Tal associa-se, sobretudo, a dificuldades a nível da identificação das larvas no tubo digestivo dos predadores e da quantificação do número efectivo de presas consumidas, devido à acção de maceração das mandíbulas existentes na maioria dos predadores e à sua rápida digestão (BAILEY & HOUDE, 1989). No entanto, realizaram-se alguns progressos, a nível da identificação das presas, sobretudo através da técnicas imunológicas (THEILACKER *et al.*, 1986). De qualquer forma, na área da quantificação as dificuldades são ainda muitas, uma vez que se recorre às reservas vitelinas existentes nas larvas e a sua quantidade varia consoante o estado de desenvolvimento em que a larva se encontra, só estando presentes nas fases iniciais.

O recurso aos estudos laboratoriais pode ser um complemento na análise da predação no meio natural, sobretudo para comprovação que determinado predador ingere de facto determinada espécie de larvas de peixes. No entanto, tal acarreta algumas limitações e não exclui a comprovação através de estudos no mar que demonstrem que isto realmente ocorre.

A utilização de experiências de predação em situações controladas tem sido criticada, uma vez que o comportamento dos predadores é muito influenciado pela condições da experiência que nunca simulam, de forma completa o meio natural (PETERSON & BLACK, 1994). Contudo, esta continua a ser a maneira mais simples e rápida de medir a predação potencial desde que se tenha em consideração as limitações da própria experiência (ARONSON & HECK, 1995).

Com efeito, os métodos directos de estudo da mortalidade por predação são difíceis de aplicar. A abundância efectiva dos predadores na natureza tem algumas limitações, uma vez que vários *taxa* podem actuar, simultaneamente, sobre larvas de determinada espécie de peixe e a realização de amostragens, que assegurem a captura de todos os predadores potenciais, é quase impossível de concretizar (BAILEY & HOUDE, 1989).

Por estas razões os métodos indirectos para o estudo da predação têm sido implementados. Se se pretender obter indirectamente um valor para a contribuição absoluta da predação na mortalidade total, devem-se seguir métodos baseados no pressuposto de que, com o conhecimento da mortalidade total e da mortalidade por inanição, é possível o cálculo da mortalidade por predação através de diferença entre ambas. Este método considera que as outras fontes de mortalidade são insignificantes (HEWITT *et al.*, 1985) ou que se pode proceder à subtracção das perdas por dispersão (FORTIER & LEGGETT, 1985).

A escolha dos métodos indirectos tem também de ter em consideração que é muito difícil simular em condições controladas, quer os factores hidrológicos, nomeadamente correntes e turbulência, quer a predação natural. Contudo conseguem-se produzir facilmente larvas alimentadas e larvas não alimentadas, com o objectivo de servirem referência, com as devidas correcções, para as investigações no meio natural sobre a condição nutricional das larvas de peixes, através da qual se pode calcular a mortalidade por inanição (UEBERSCHAR, 1987). Desta forma, convém também enfatizar que uma larva em fraca condição nutricional no meio natural pode perecer, quer directamente devido à falta de alimento, quer de forma indirecta através do aumento da vulnerabilidade à predação (BOOMAN *et al.*, 1991) e às condições hidrológicas desfavoráveis (SINCLAIR *et al.*, 1985; SINCLAIR & ILES, 1985) o que salienta o interesse do estudo da alimentação larvar.

4.1.4 - Alimentação

Foram encontradas variações significativas a nível do estado nutricional das larvas entre as áreas estudadas. Estas flutuações na condição larvar de diferentes espécies de peixes são frequentes em estudos desta natureza e explicados, na maioria das vezes, através da disponibilidade alimentar (O'CONNELL, 1980; KASHUBA & MATTHEWS, 1984; BUCKLEY & LOUGH, 1987; CANINO *et al.*, 1991; THEILACKER & PORTER, 1995) (Tabela IV. 18). Quer na costa portuguesa quer na costa espanhola os valores mais elevados de condição larvar associaram-se às estações com maior número de presas. A determinação da densidade de presas

potenciais necessita, entre outros aspectos, do conhecimento prévio do tipo de presas que as larvas ingerem, o qual permitirá a sua quantificação no meio natural.

O tipo de presas ingeridas foi obtido a partir da análise do conteúdo do tubo digestivo das larvas de peixes recolhidas no meio natural. Os resultados deste trabalho, apesar de não se ter realizado uma investigação exaustiva sobre o assunto, mostraram que os principais itens encontrados no tubo digestivo de *S. pilchardus* foram por ordem de abundância relativa: *nauplii*, copepoditos, ovos de invertebrados, larvas de bivalves, tintinídeos e aglomerados de origem vegetal, sendo que os *nauplii* e copepoditos representaram 50 % do total de presas encontrados. Os resultados do estudo do microplâncton na costa algarvia evidenciaram os *nauplii* como um dos grupos de maior importância relativa, o que parece concordar com o facto de serem os mais abundantes no conteúdo estomacal.

A importância dos copépodes no conteúdo estomacal das larvas é também assinalada por CONWAY *et al.* (1991) num estudo que integrou o mesmo projecto de investigação SARP que o presente trabalho. Estes autores referem que os copépodes nos seus diferentes estádios de desenvolvimento (ovos, *nauplii* e copepoditos) representam em média 85% do total de presas ingeridas pelas larvas de sardinha. Deve-se salientar que estes autores incluem os ovos de copépodes neste grupo, enquanto que no presente trabalho eles foram englobados com outros ovos de invertebrados, representando este grupo 33.3%.

A alimentação das larvas de clupeídeos, tal como muitas outras espécies de peixes, consiste fundamentalmente em copépodes em diferentes estádios de desenvolvimento (ovos, *nauplii*, copepoditos e adultos) (CONWAY *et al.*, 1991; PAUL *et al.*, 1991). Antes da fase de alimentação existe um período variável em que a larva subsiste à custa das reservas vitelinas. A captura de espécies-presas pode iniciar-se, nalguns clupeídeos, antes da absorção completa das reservas vitelinas, quando a boca se torna funcional (BLAXTER, 1971). Nesta fase capturam basicamente fitoplâncton e muitos autores crêem que se trata de uma fase de aprendizagem (BLAXTER & HUNTER, 1982).

Os primeiros estados larvares apresentam normalmente preferências alimentares mais heterogêneas, incluindo, para além de copépodes em diferentes fases de desenvolvimento, fitoplâncton, ciliados, tintinídeos, larvas de bivalves e de gastrópodes, entre outros (ARTHUR, 1977; BREWER *et al.* 1984; BREWER & KLEPPEL, 1986; FERREIRA & RÉ, 1993).

Tabela IV.18- Estudos recentes no meio natural que detectaram variações, entre zonas, no índice de condição larvar (I.C.) e para as seguintes espécies: a) *C. harengus*, b) *Engraulis mordax*, c) *Gadus morhua*, d) *Trachurus symmetricus*, e) *Melanogrammus aeglefinus*, f) *Morone saxatilis*, g) *Sardinops melanostictus*, h) *T. chalcogramma* e i) *Coregonus* spp.

Local	Índice de condição (I.C)	Varição I.C. explicada por	Referências
Golfo de Maine c)	Peso/comprimento	disponibilidade presas	CHENOWETH (1970)
Baía Sul Califórnia b)	histológico	biovolume do plâncton	O'CONNELL (1980)
Nova Escócia c)	morfométrico	turbulência/estratificação	KOSLOW <i>et al.</i> (1985)
Estuário Potomac f)	vários métodos e RNA/DNA	----	MARTIN <i>et al.</i> (1985)
Banco Georges c), e)	RNA/DNA	copépodes e estratificação	BUCKLEY & LOUGH (1987)
Columbia Britânica a)	RNA/DNA	alimentação/ predação	ROBINSON & WARE (1988)
Baía Sul Califórnia b)	classes de lípidos	triacilglicerol copépodes	HAKANSON (1988)
Corrente Kuroshio g)	RNA/DNA	disponibilidade presas	SHIMIZU <i>et al.</i> (1989)
Nova Escócia e)	morfométrico	turbulência/estratificação	FRANK & MCRUER (1989)
Golfo do Alasca h)	RNA/DNA	disponibilidade presas	CANINO <i>et al.</i> (1991)
Lago Constance i)	RNA/DNA	doença	STEINHART & ECKMANN (1992)
Golfo do Alasca h)	RNA/DNA	disponibilidade presas	BAILEY <i>et al.</i> (1995)
Golfo do Alasca h)	histológico	disponibilidade presas	THEILACKER & PORTER (1995)

Contudo, muitas vezes os ovos de copépodes, as larvas de bivalves e as células de fitoplâncton apresentam-se inalteráveis durante o processo de digestão de larvas de peixes de diferentes dimensões (CONWAY *et al.*, 1993,1994) o que poderá indicar que o fornecimento de nutrientes por estes grupos taxonómicos deve ser reduzido ou nulo.

Os dinoflagelados, apesar de constituírem normalmente o primeiro ou o segundo grupo mais abundante nas recolhas de microplâncton, não foram registados, pelo menos de forma individualizada, no tubo digestivo das larvas analisadas. Foram observados, apenas, aglomerados de origem vegetal não identificados. No entanto, existem referências à identificação destes fitoplanctontes no interior de larvas de sardinha recolhidas na natureza (LEBOUR,1919).

Numa experiência realizada em laboratório, com larvas de *S. pilchardus*, verificou-se que, quando estas eram alimentadas exclusivamente com organismos fitoplanctónicos não sobreviviam, apesar de constarem no seu tubo digestivo (BLAXTER, 1969). Com efeito, na experiência de validação apresentada no Capítulo III verificou-se que as larvas de sardinha quando mantidas nas câmaras (malha de 60 µm), que permitiam a passagem, sobretudo, de fitoplanctontes apresentaram um decréscimo significativo na condição nutricional. Contudo, uma experiência semelhante, mas que incidiu apenas sobre os dinoflagelados evidenciou que estes, apesar de *per si*, não manterem as larvas de peixes, quando adicionados ao microzooplâncton aumentavam a taxa de crescimento e sobrevivência larvar (SCURA & JERDE, 1977). Este facto poderá estar relacionado com a tendência actual (BELL & SARGENT, 1996; St. JOHN & LUND, 1996), que considera determinante, para a sobrevivência larvar, a existência de certos ácidos gordos típicos de alguns grupos de fitoplanctontes. As diatomáceas são disso exemplo, e a partir delas esses ácidos gordos são transferidos para os copépodes e destes para as larvas de peixes, através dos *nauplii*. A presença de alguns tipos de ácidos gordos assegura o desenvolvimento com sucesso de órgãos tão importantes para a sobrevivência das larvas de peixes, como os associados à visão e que possibilitam quer a captura de alimento quer a fuga aos predadores (TOCHER, 1985).

Por outro lado, a ingestão pelas larvas de peixes de fitoplanctontes, organismos da reduzida digestibilidade e mobilidade, numa fase em que ainda dispõem de algumas reservas vitelinas, provavelmente facilita a aprendizagem para a captura das presas futuras com maior mobilidade e maior valor nutritivo.

De qualquer forma, e nas fases larvares em que o vitelo já foi reabsorvido, a digestibilidade das próprias presas na análise do alimento disponível, num determinado local e momento, parece ser um factor a ter em atenção. Considerando que as larvas de peixes não dilaceram (trituras) mecanicamente as suas presas (excepção para *Coregonus lavaretus*, ROSCH & SEGNER, 1990; SEGNER *et al.*, 1993) o grau de digestibilidade do alimento será de grande importância. Assim, o crescimento e a sobrevivência das larvas de peixes poderá variar regional e temporalmente devido a diferenças na digestibilidade do item alimentar mais abundante (CONWAY *et al.*, 1993, 1994).

Um dos principais problemas que se coloca ao estudo dos hábitos alimentares dos estados larvares capturados no meio aquático é a fraca incidência de larvas contendo alimento no tubo digestivo. Esta dificuldade acentua-se quando se trata de larvas de clupeídeos, como a sardinha, com tubo digestivo rectilíneo, que facilita o seu esvaziamento durante o processo de captura, fixação e conservação (HAY, 1981; BLAXTER & HUNTER, 1982; CONWAY *et al.*, 1991). Esta será uma possível explicação para a elevada percentagem de larvas capturadas na costa algarvia sem alimento no tubo digestivo. De facto, na costa algarvia a percentagem de incidência alimentar oscilou entre 0% e 24%, enquanto que na costa espanhola os valores variaram entre 0% e 7.1%. No entanto, CONWAY *et al.* (1991) num trabalho inserido no mesmo projecto de investigação que o presente estudo, mas apenas em 1991, indicaram uma percentagem de 28% de larvas com presas no tubo digestivo. Por outro lado, RÉ (1984), também para a espécie *S. pilchardus*, assinalou valores entre 3-63%, enquanto que BLAXTER (1969) referiu valores entre 8 e 30%. Estudos realizados com outros clupeídeos mostraram a mesma tendência com valores entre 4 e 31% para a espécie *E. mordax* (BREWER & KLEPPEL, 1986) e de 22 % para *E. ringens* (MENDIOLA, 1974), com algumas excepções como a espécie *E. encrasicolus*

(FERREIRA & RÉ, 1993), onde os níveis da incidência alimentar variaram, aproximadamente entre os 60 e 100%.

COLTON *et al.* (1980) referem que a incidência alimentar varia em função da velocidade do arrasto e aconselharam uma velocidade entre os 1.5 e 2 nós de forma a ultrapassar esse problema. De facto, nos arrastos realizados na costa espanhola, onde as velocidade de arrasto, por vezes, foram superiores a esses valores a incidência alimentar também foi mais reduzida.

Por outro lado, a baixa incidência alimentar detectada em estudos na natureza pode também ser real, uma vez que muitas experiências de cultura larvar de diferentes espécies de peixes demonstraram que uma percentagem significativa de larvas nunca inicia a alimentação, apesar da grande disponibilidade de presas (BROWMAN, 1995).

De qualquer forma, o estudo do conteúdo do tubo digestivo não será suficiente para se analisar o futuro individual da larva, em termos de sobrevivência (IRIGOIEN *et al.*, 1996). Dado que, uma larva em má condição poderá não apresentar conteúdo intestinal. No entanto, uma larva em óptima condição, pode da mesma forma, apresentar-se sem conteúdo intestinal, sem que isso ponha em risco a sua sobrevivência.

Para além disso, o esvaziamento do tubo digestivo deste tipo de larvas é também uma limitação importante em estudos de ecologia alimentar pois, para além de levar à perda total ou parcial das partículas alimentares, acarreta outros problemas, nomeadamente quando a perda incide sobre determinados *taxa* ou em presas de determinadas dimensões. Desta forma, os dados, para além de não revelarem a incidência alimentar, não indicam o tipo preferencial de presas ingerido. Outros factores, nomeadamente a grande velocidade de digestão, entre duas a seis horas, como acontece em *C. harengus* (BLAXTER, 1971), poderão também explicar a fraca incidência alimentar nas larvas capturadas. Por outro lado, o contacto que se estabelece entre os organismos planctónicos no interior da rede de colheita, pode

também favorecer a ingestão pelas larvas de peixes de alguns tipos de presas diferentes daqueles que normalmente ingerem no meio natural.

Uma das questões que se tem colocado aos investigadores desta área é a determinação da densidade de presas necessária para assegurar a sobrevivência larvar no meio aquático. Os resultados dos vários trabalhos realizados com clupeídeos (HUNTER, 1972; ARTHUR, 1977; HOUDE, 1977; LASKER, 1975, 1981) evidenciaram que são precisas altas densidades de presas para assegurar a alimentação e crescimento das larvas de peixes. No entanto, os valores encontrados apresentam discrepâncias relativamente às densidades médias do meio marinho, que são relativamente inferiores.

De facto, neste trabalho o valor mais elevado encontrado foi na costa algarvia na primeira estação do transecto de Albufeira (A1) onde se verificou uma concentração de *nauplii* próxima de 20000/m³ e uma densidade total de potenciais presas de quase 110000/m³. A informação sobre a disponibilidade de alimento para a costa espanhola foi escassa e conseguida, sobretudo, através de CONWAY *et al.* (1991) e de FÉRNANDEZ de PUELLES *et al.* (1996), os quais realizaram um estudo sobre a alimentação das larvas de sardinha, integrado no mesmo projecto de investigação (SARP) que a presente tese. Estes autores referem que, relativamente ao cruzeiro realizado entre Abril e Maio de 1991, o número médio de *nauplii*/m³ foi superior na costa Noroeste, com 5564 *nauplii*/m³, em comparação com as estações da costa Norte, que apresentaram densidades médias de 2958 *nauplii*/m³. Foi, também na costa Noroeste, onde se registaram os valores mais elevados da razão RNA/DNA. Também, no que respeita ao número médio de presas no tubo digestivo, este foi mais elevado na costa Noroeste (3.2 presas/larva), do que na costa Norte (1.4 presas/larva) (CONWAY *et al.*, 1991).

De qualquer forma, estes valores são bastante inferiores às concentrações indicadas como necessárias para a sobrevivência de outros clupeídeos, nomeadamente para *C. harengus*, 170000 organismos/m³ (WERNER & BLAXTER, 1980) ou 200000 organismos/m³ (SCHNACK, 1972).

Apesar da suposta escassez de presas encontrada no presente trabalho, a condição nutricional das larvas recolhidas foi, em geral, boa, coincidindo os locais com melhores índices de condição com as zonas de maiores concentrações de presas. De facto, o índice DNA/mg correlacionou-se com o número de *nauplii*, negativa e significativamente. Assim as larvas com menores valores de DNA por mg de peso seco, logo em melhor condição, encontraram-se nas zonas onde a disponibilidade de *nauplii* foi superior. Como não se verificou uma correlação significativa com o número total de presas, tal poderá estar ligado às dimensões menos apropriadas de organismos que este grupo, na sua globalidade inclui. Com efeito, são as larvas menores aquelas que se alimentam sobretudo das fases mais iniciais do desenvolvimento dos copépodes, sendo também essas larvas em que o índice DNA/mg pareceu mais sensível ao estado nutricional.

Por outro lado na costa algarvia, apesar da razão RNA/DNA em larvas de sardinha e o número de presas potenciais se correlacionarem de forma positiva, a correlação não foi significativa e a variação da condição larvar explicada pelo alimento foi também relativamente reduzida. Contudo, tal não implicará directamente a ausência de relação entre ambos mas antes que a verdadeira disponibilidade de alimento não terá sido medida.

Na base desta questão poderão estar vários factores. Por um lado, a estimativa da densidade de presas subestima a sua verdadeira disponibilidade, uma vez que negligencia a produção zooplânctónica, que se situa na gama de dimensões apropriada para a alimentação das larvas de peixes (HUNTER, 1981), e que pode ser consumida tão rapidamente quanto produzida (LEGGETT & DEBLOIS, 1994). Também se se excluir a contribuição da turbulência de pequena escala, na taxa de encontros entre presas e predadores, as taxas de alimentação do zooplâncton podem ser subestimadas (MACKENZIE *et al.*, 1990; MACKENZIE & KIØRBOE, 1995). Por outro lado, como os dados relativamente ao microplâncton foram obtidos através de arrastos verticais, os quais como integram toda a coluna de água, obscurecem a existência de microagregados, com densidades mais elevadas de presas (FRANK, 1988). Na realidade, as concentrações de alimento necessárias para a alimentação das larvas de peixes, existem, como seria óbvio, no meio marinho, mas em zonas

muito localizadas (ARTHUR, 1977). De facto, a variabilidade ambiental do plâncton, nomeadamente a espacial existe em escalas tão pequenas como 10 cm, quer horizontais (CASSIE, 1969), quer verticais (FÉRNANDEZ de PUELLES *et al.*, 1996).

Considerações sobre a disponibilidade de alimento na sobrevivência larvar desde há muito que são referidas. De facto, uma das hipóteses mais conhecidas que aborda a importância da alimentação é a teoria de HJORT (1914). Para este autor, se existir um certo lapso de tempo entre o período em que as larvas necessitam pela primeira vez de alimento externo e o momento em que este está disponível, será provável que ocorra uma elevada mortalidade (hipótese do "período crítico"). A existência de alimento adequado (fitoplâncton ou zooplâncton), após a absorção das reservas vitelinas, foi considerada nesta hipótese de grande importância na determinação da dimensão da futura classe anual.

Após esta fase de transição, o número de larvas em *stress* alimentar normalmente diminui (O'CONNELL, 1981; THEILACKER, 1986; ROBINSON & WARE, 1988; THEILACKER & PORTER, 1995). Tal facto está relacionado com a capacidade da larva de armazenar energia (EHRlich, 1974; FRASER, 1985; HAKANSON, 1988), devido à possibilidade de capturar e ingerir uma maior variedade de presas (HUNTER, 1972; ARTHUR, 1977; COHEN & LOUGH, 1983; YIN & BLAXTER, 1987).

Após um longo período, em que se discutiu sobretudo a hipótese do "período crítico", surgiu a hipótese da "sincronia" (match-mismatch) (CUSHING, 1975). Esta hipótese atribui também grande importância à existência de um número elevado de presas no meio marinho, mas não apenas após a fase em que ocorre a reabsorção das reservas vitelinas. Assim, supõe que a magnitude do recrutamento está ligada com o grau de sobreposição temporal entre a época de postura e o ciclo de produção de fitoplâncton no meio natural. Este autor assinala que a força do vento e a radiação solar determinam o início do aumento da produção primária e da taxa com que esta se desenvolve. No entanto, apesar de CUSHING (1990, 1995) ter defendido novamente a sua teoria, demonstrando o seu carácter mais abrangente, referindo que esta não trata apenas da inanição, têm sido apresentados vários argumentos que referem a dificuldade da sua verificação. Estes aspectos associam-

se, sobretudo, às inúmeras ramificações que caracterizam a teia alimentar e que estão na base da transferência de energia do fitoplâncton para as larvas de peixes (FRANK & LEGGETT, 1982; SINCLAIR *et al.*, 1985; SINCLAIR, 1988; BAILEY *et al.*, 1995; FORTIER *et al.*, 1995). Também para a espécie analisada, *S. pilchardus*, esta hipótese parece não ter uma aplicação directa uma vez que o biovolume de zooplâncton analisado por CUNHA (1993) ao longo de um ciclo anual na costa ocidental refere que os valores são mais elevados na Primavera e Verão. Tal parece, de alguma forma, não se adequar com o facto da reprodução da sardinha ser mais intensa no Inverno nessa mesma zona. No entanto, é também necessário ter em consideração, que no referido estudo, para além das malhagens de rede de arrasto de plâncton (300 e 500 μm) não serem as mais adequadas para a captura de potenciais presas de larvas de peixes, os valores da biomassa zooplânctónica foram relativamente elevados durante todo o ano.

De qualquer forma, a comprovação destas hipóteses necessita, para além de outros aspectos, da determinação no meio natural da percentagem de larvas de peixes em condições de inanição, nas diferentes fases do seu desenvolvimento.

4.2- Percentagem de inanição

A análise do papel da inanição entre as larvas de sardinha na zona costeira da Península Ibérica necessita, para além do conhecimento da variação registada na condição larvar em diferentes zonas, de quantificar os indivíduos que se encontravam, de facto, em fraca condição. A determinação da percentagem de larvas de sardinha que estava em situação nutricional carenciada foi alcançada recorrendo ao “nível crítico” da razão RNA/DNA fornecido pela experiência de validação (Capítulo III).

Através da referida experiência verificou-se que um valor inferior a 1.3 na razão RNA/DNA poderá indicar que a larva se encontrava sujeita a *stress* nutricional, portanto mais exposta às condições desfavoráveis (quer directamente à ausência de alimento quer indirectamente à predação). A percentagem de larvas capturadas na costa algarvia com razões RNA/DNA inferiores ao nível referido foi bastante

reduzida (0% em 1991 e 4.6% em 1992). À semelhança do que ocorreu na costa algarvia, na costa espanhola a percentagem de larvas com razões RNA/DNA inferiores ao "nível crítico" também foi muito reduzida. No entanto, neste caso a percentagem de larvas em condições de *stress* alimentar foi ainda inferior (0% em 1991 e inferior a 1% em 1992). Estes valores podem, contudo, estar subestimados pela acção da predação, que rapidamente elimina as larvas em fraca condição (PEPIN, 1989a).

Utilizando uma forma indirecta de determinar o "nível crítico", descrita por ROBINSON & WARE (1988) e baseada em BUCKLEY (1984), obtêm-se percentagens de inanição inferiores às indicadas acima. Este método considera que o "nível crítico" é, teoricamente, a razão RNA/DNA correspondente à ausência de crescimento proteico líquido numa larva de peixes, a determinada temperatura. Assim, e de acordo com a temperatura média da água de 16.1°C durante o cruzeiro realizado na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992, o "nível crítico" seria de 0.68, e percentagem de inanição de 2.3%. Por outro lado, no cruzeiro realizado em Espanha no mesmo período, em que a temperatura média da água foi de 15°C, o "nível crítico" seria de 0.89, sendo nula a percentagem de larvas em inanição.

Nesta perspectiva, as comparações entre "níveis críticos" da razão RNA/DNA devem limitar-se a larvas recolhidas em locais de temperatura semelhante. De facto, fazendo variar a temperatura da água, por exemplo de 10°C para 14°C, obtêm-se através da equação de ROBINSON & WARE (1989) valores do "nível crítico" relativamente distintos, nomeadamente 1.87 e 1.09. De qualquer forma, e como a temperatura da experiência de validação (15.3°C), não se afastou muito da temperatura em que as larvas foram recolhidas, considerou-se mais aconselhável a utilização do "nível crítico" obtido directamente pela experiência de validação.

Foram também encontradas noutros estudos (CANINO *et al.*, 1991; CANINO, 1994) diferenças nas percentagens de inanição calculadas pelas duas formas referidas, que podem variar entre 1% e 100%. Segundo estes autores é de salientar que são necessárias precauções na comparação dos "níveis críticos" obtidos através de diferentes técnicas sem uma aprofundada intercalibração de métodos. De facto no

presente estudo, o “nível crítico” obtido segundo o método proposto por ROBINSON & WARE (1988), baseia-se em resultados de ácidos nucleicos determinados pela técnica espectrofotométrica, enquanto que o “nível crítico” da experiência de validação provêm de dados resultantes da aplicação da técnica fluorimétrica.

Independentemente do método (equação de BUCKLEY (1984) modificada ou experiência de validação directa), a percentagem de inanição registada no presente trabalho foi muito reduzida. Este resultado concorda com a maioria dos trabalhos nesta área, nos quais percentagens de inanição elevadas são relativamente raras em larvas de peixes recolhidas no meio natural.

Com efeito, valores de larvas em inanição inferiores a 2% e 7% foram indicados, respectivamente, para as espécies *M. aeglefinus* e *Ammodytes* sp. (BUCKLEY, 1984). Por outro lado, percentagens um pouco superiores foram encontradas em larvas de *C. harengus* (13%) (CLEMMESEN, 1989). No entanto, um trabalho posterior com larvas da mesma espécie, mas com outra proveniência, a autora referiu um valor de apenas 1.4% (CLEMMESEN, 1994). Ainda relativamente a larvas da espécie *C. harengus*, MCGURK *et al.* (1992) encontraram 7.5% de indivíduos em inanição. Contrastando com estas percentagens reduzidas, em duas espécies de *Scombridae* foram indicados valores muito superiores aos anteriores, nomeadamente, 62-63% de larvas em condições de inanição (MARGULIES, 1993). Também THEILACKER (1986) registou 59% de larvas de *T. symmetricus* com falta de alimento. No entanto, estes valores médios variam muito quando se analisam separadamente zonas ou estações, podendo ocorrer percentagens nulas de indivíduos em inanição em determinadas estações e noutras percentagens muito superiores às referidas. As considerações anteriores aplicam-se tanto para os autores citados como aos resultados deste trabalho.

De facto, e analisando alguns dos histogramas da razão RNA/DNA, verificou-se que nas estações A4, A5, A6, do transecto de Albufeira, não existiram larvas em *stress* alimentar, uma vez que a razão RNA/DNA foi sempre superior ao “nível crítico” determinado. Tal poder-se-à explicar quer devido a uma melhor condição das larvas

nessas estações, quer pela acção da predação que eliminou as larvas que potencialmente existiriam nessas classes.

A predação, *per si*, ou complementada com a competição, possivelmente, desempenhou um papel preponderante na determinação da condição das larvas de sardinha recolhidas nessas estações. É, provável que, devido à maior importância da predação relativamente à competição, não se tivessem recolhido larvas em *stress* nutricional, uma vez que a acção dos predadores, ao eliminar os indivíduos mais fracos, eleva a condição média das larvas, enquanto que a acção da competição contribuiria para o seu decréscimo. Tal, contrariamente à situação anterior, pareceu verificar-se, por exemplo nas estações A2 e A3 do transecto de Albufeira e G2 do transecto do Guadiana, na costa algarvia, as quais apresentaram percentagens importantes de larvas em *stress* alimentar, que chegaram a ultrapassar os 10 %, sugerindo que a competição por alimento pode ter tido aqui alguma expressão. Desta forma, só se atingiram valores significativos de larvas em inanição em escalas espaciais restritas. Assim, à semelhança da variação temporal da percentagem de inanição, existiu também uma variação espacial acentuada de larvas em situação nutricional carenciada.

O facto das maiores percentagens de inanição se terem registado em zonas onde a disponibilidade de alimento medida foi grande, como, por exemplo, nas primeiras estações do transecto de Albufeira, pode indiciar que, tal como se referiu na secção da alimentação, a verdadeira disponibilidade de presas não foi determinada, ou que algumas das larvas não tem capacidade de capturar essas presas. Relativamente a este aspecto, MCGURK *et al.* (1992) mostraram também que, mesmo com as densidades adequadas de presas para suportar elevadas taxas de crescimento, as larvas de pequenas dimensões das espécies *C. harengus pallasii* e *Ammodytes hexapterus*, se encontravam em situação de inanição. Concluíram então que se deviam tratar de larvas anormais ou de larvas que estariam ainda a aprender a alimentar-se de organismos planctónicos, e logo incapazes de aproveitar a disponibilidade de alimento. Com efeito, as mais elevadas percentagens de inanição ocorriam especialmente após a reabsorção do vitelo. O trabalho anterior suportou, de certa forma, a hipótese do “período crítico” pois detectou um decréscimo

acentuado da condição larvar próximo da fase de transição. No entanto, segundo o autor desta hipótese (HJORT, 1914), tal ocorria associado, não por uma incapacidade de aproveitar o alimento disponível, mas sim à ausência directa de alimento.

A importância deste factor, numa altura próxima da reabsorção das reservas vitelinas, foi analisada no presente estudo através da determinação da percentagem de inanição por classes de comprimento. Considerou-se que as larvas com comprimento inferior a 8 mm poderiam ser classificadas como próximas da fase da primeira alimentação, ou seja, na transição entre a alimentação endógena e a exógena, o que teve como base o trabalho de SILVA & MIRANDA (1992). No entanto, um número reduzido de larvas nessa situação foi considerado em inanição, concretamente 0.52% na costa algarvia e 0.17 % na costa espanhola, sendo mesmo nula nas estações em que, na totalidade dos comprimentos, a percentagem de inanição foi importante. De facto, já o índice DNA/mg de peso seco, especialmente apropriado para avaliar a condição larvar nas fases mais iniciais da vida dos peixes, tinha indiciado que, de uma forma geral, as larvas de menor comprimento estavam em boa condição. Assim, este trabalho não suporta a visão tradicional sobre a dinâmica alimentar das fases iniciais da vida dos peixes, ou seja, de que são os estados larvares, na altura da primeira alimentação, os mais susceptíveis à falta de alimento, o que é a base da hipótese do “período crítico” (HJORT, 1914).

No entanto, a classe de comprimento de larvas de *S. pilchardus*, mais representada no presente estudo, 8 a 16 mm, de acordo com SILVA & MIRANDA (1992), incluiu os indivíduos que já ultrapassaram a fase de transição entre a alimentação endógena e exógena, o que limitará uma análise mais aprofundada desta hipótese.

O número reduzido de larvas de pequenas dimensões analisadas neste trabalho poderá relacionar-se com a necessidade de uma triagem e congelação rápidas das larvas após a recolha, de forma a evitar a degradação dos ácidos nucleicos. Este processo tenderá a seleccionar as larvas maiores, uma vez que são mais facilmente detectáveis na massa planctónica. Por outro lado, inclusivé, na fase de recolha

também pode ter ocorrido perda das fases larvares de menores dimensões, as quais que em princípio deveriam ser mais abundantes. Tal pode estar relacionado com a passagem das larvas mais pequenas através das malhas da rede, por saída passiva ou por saída forçada, ou seja por extrusão (SMITH & RICHARDSON, 1977). Contudo, a extrusão é pouco provável que ocorra com velocidades de arrasto da ordem do 2 nós, como a que foi utilizada neste trabalho. Também a saída passiva, e de acordo com os dados da secção da morfometria, não deve ter sido muito relevante neste estudo. De acordo com COLTON *et al.* (1980), a altura da cabeça das larvas é a medida mais adequada para estudos de retenção de redes e apenas as larvas menores que 5 mm apresentaram uma altura da cabeça inferior à malhagem usada na costa algarvia, ou seja menor que 500 μm . Por outro lado, considerando que na costa espanhola se utilizou uma malhagem de 200 e 280 μm , poderá supor-se que a perda de larvas de dimensão inferior ao poro terá sido desprezável, uma vez que as fases larvares mais iniciais estiveram também pouco representadas nessas amostras. Para além disso, embora os resultados gerais proporcionem a indicação de que o intervalo de comprimentos inferior a 8 mm foi pouco importante, nas estações A5 e A6 da costa algarvia, as larvas dessa gama de dimensões foram mais abundantes, apesar de se ter utilizado a mesma malha de rede. Convém também referir que nenhuma dessas larvas, classificadas como próximo da fase de transição de modo de alimentação, ou seja inferior a 8 mm, se encontrava em *stress* nutricional, nas referidas estações.

De uma forma geral, os resultados do presente estudo sugerem que o "período crítico" não será a fase mais susceptível à inanição, tal como já tinha sido evidenciado por LEGGETT & DEBLOIS (1994). De facto, a percentagem de inanição foi superior na classe de comprimento mais representada (8 a 16 mm) quer na costa algarvia quer na costa espanhola. Também PETERMAN *et al.* (1988), num trabalho sobre *E. mordax*, defende a inexistência de "período crítico". No entanto, se este existir, e de acordo com o último trabalho, não será após o esgotamento das reservas vitelinas mas sim em fases mais avançadas.

Com efeito, a verificação no meio marinho da hipótese do "período crítico" não tem sido alcançada, apesar de ser testada desde meados deste século (SOLEIM, 1942 *in*

WIBORG, 1976; SETTE, 1943; MARR, 1956; MAY, 1974). Existem, no entanto, autores que a defendem como SHELBOURNE (1957), baseando-se na própria fisiologia das larvas de peixes. Assim, enquanto um peixe adulto apresenta reservas consideráveis de alimento e pode sobreviver durante mais tempo à escassez de alimento, as fases larvares após a reabsorção do vitelo são muito dependentes do fornecimento diário de alimento externo, pelo que, no caso deste faltar, a morte deve ocorrer rapidamente.

Também os resultados de um trabalho efectuado por FORTIER & LEGGETT (1985) suportam parcialmente esta hipótese de HJORT. Estes autores estudaram a sobrevivência larvar de *Mallotus villosus* num estuário, através do acompanhamento de uma coorte de larvas e da monitorização do declínio da sua abundância, extraído o efeito da dispersão, e verificaram que durante o período de transição entre a alimentação endógena e alimentação exógena, ocorre uma elevada mortalidade. Da mesma forma, mais recentemente foram encontradas evidências para *T. chalcogramma* que confirmam parcialmente a hipótese do "período crítico" (THEILACKER & PORTER, 1995). Estes autores detectaram 29% de larvas em situação de inanição na altura da primeira alimentação, mas esse valor decresceu rapidamente, passando para 12% uma semana depois e para 0% duas semanas depois.

De qualquer forma, o presente estudo evidenciou que a inanição não foi especialmente acentuada entre as larvas de sardinha recolhidas, independentemente da fase em que se encontravam. Associado a este facto poderá estar a relação privilegiada que a razão RNA/DNA demonstrou com a densidade de predadores potenciais. Com efeito, como se referiu, é atribuído à predação um papel importante na eliminação das larvas mais fracas, potencialmente em inanição.

Para além do estado nutricional, existe um parâmetro que, também, expressa a influência cumulativa dos factores ambientais nos indivíduos. Trata-se do crescimento larvar, o qual pode contribuir para um melhor esclarecimento da importância relativa da inanição e da predação entre as fases larvares dos peixes.

4.3 - Crescimento larvar

O crescimento larvar de *S. pilchardus* foi analisado a partir da alteração do conteúdo dos indivíduos em ácidos nucleicos. A quantidade de DNA por larva manteve-se relativamente constante até ao intervalo entre 8 a 10 mm de comprimento, aumentando em seguida. Assim poder-se-à inferir, que existiram duas etapas de crescimento, uma no início onde predominou o aumento em volume das células e, posteriormente, outra onde o aumento em número das células foi maior.

Estes resultados parecem reflectir a existência dos dois processos no crescimento larvar indicados por ZWEIFEL & LASKER (1976). O primeiro, em que há um aumento pouco significativo do comprimento e que se restringe à fase após a eclosão. Neste período, o crescimento é reduzido e acompanhado pela diminuição das reservas vitelinas durante a transição da alimentação endógena para a exógena. Estes acontecimentos a nível celular corresponderão a um aumento preferencial de volume da célula relativamente ao número e neste caso a quantidade de DNA no organismo mantém-se constante (PITTMAN *et al.*, 1990). Na segunda fase, com o início da alimentação activa, o comprimento da larva aumenta rapidamente. Tal traduz-se, a nível celular, num incremento da actividade mitótica que produz um acréscimo mais acentuado na quantidade de DNA no indivíduo (PITTMAN *et al.*, 1990). De qualquer forma, ambos os processos conduzem ao aumento de biomassa que caracteriza o crescimento do organismo. Por outro lado, a quantidade de RNA por larva, devido a ser mais susceptível às alterações ambientais, apresenta uma variabilidade mais acentuada, pelo que não é muito utilizada neste âmbito.

Num estudo efectuado com *Hippoglossus hippoglossus*, por PITTMAN (1991), foram obtidos resultados semelhantes. Neste trabalho, é referido que a quantidade de DNA também se revelou relativamente constante após a eclosão só aumentando, posteriormente, a partir dos catorze dias, o que segundo PITTMAN *et al.* (1989) corresponde um comprimento aproximado de 10 mm.

Também MUSTAFA (1979), analisando o comportamento da concentração de DNA, propôs que o crescimento se caracteriza inicialmente pelo aumento das dimensões da células, preferencialmente ao incremento do seu número. No entanto, estudos revistos por LOVE (1980) mostram que, na fase adulta, o crescimento é conseguido de forma igualitária, pelo aumento do volume e pelo aumento do número das células. Da mesma forma, estudos em *Salmo gairdneri* (ZEITOUN *et al.*, 1977) evidenciaram resultados semelhantes ao anterior.

Por outro lado, existem indicações, segundo LONE & INCE (1983) que no músculo do peixes, a multiplicação celular continua durante a vida mas as dimensões das células só aumentam até determinado nível, para além do que estabilizam.

Nesta perspectiva, parece evidente que o grau em que cada um destes processos está envolvido no crescimento varia, quer com a espécie de peixe, quer com a fase do seu ciclo de vida (BULOW, 1987).

Para além dos aspectos morfofisiológicos do crescimento, analisaram-se também aspectos quantitativos relativos à determinação da taxa de crescimento das larvas de peixes. O crescimento do peixe integra, como se referiu, cumulativamente a influência de factores bióticos e abióticos.

O conhecimento nesta área pode contribuir também para a compreensão das causas das flutuações da sobrevivência larvar e mesmo de acordo com a hipótese de HOUDE (1987) do subsequente recrutamento. É razoável assumir que os indivíduos com crescimento mais lento têm uma maior probabilidade de morrer antes da metamorfose, do que aqueles com taxas de crescimento maiores, tendo em consideração que a taxa diária de mortalidade diminui com o aumento das dimensões (MCGURK, 1986). As condições de crescimento desfavoráveis podem prolongar a duração das fases, conduzir à inanição e aumentar substancialmente o tempo de vulnerabilidade à predação. As implicações da variabilidade da taxa de crescimento dentro de uma classe anual são importantes no sentido de prever a sobrevivência, independentemente da causa final de mortalidade (PEPIN, 1989a).

A taxa de crescimento proteico individual foi calculada através do modelo proposto por BUCKLEY (1984) que recorre à razão RNA/DNA da larva e à temperatura da água em o organismo se encontrava. Este modelo baseia-se nos principais factores que influenciam o crescimento da larva no mar, e que são a temperatura e a disponibilidade de alimento. Enquanto que a temperatura é um factor que controla a velocidade das reacções químicas, a razão RNA/DNA parece ser um bom indicador da existência de factores limitantes, sobretudo da disponibilidade real de alimento, dificilmente alcançada de forma directa, como se referiu.

A integração neste método da condição larvar e da temperatura *in situ* possibilita uma forma mais adequada de comparar um conjunto de larvas provenientes de zonas ou épocas com diferentes características térmicas, uma vez que a razão RNA/DNA *per si* é influenciada pela temperatura em que as larvas se desenvolveram (BUCKLEY, 1984).

As taxas de crescimento proteico registadas variaram desde valores negativos, -2.5%/dia até valores da ordem dos 70%/dia. Esta variabilidade poderá estar relacionada com o facto das larvas de sardinha serem provenientes do meio natural, onde condições extremas podem ocorrer. Da mesma forma, foi encontrada uma variação semelhante em larvas da espécie *C. harengus pallasii*, também recolhidas na natureza, nomeadamente entre -3 a 80%/dia (MCGURK & KUSSER, 1992). No entanto, BUCKLEY (1984) numa experiência laboratorial, obteve uma menor variação das taxa de crescimento proteico, nomeadamente entre 2.2-19.5%/dia, o que se relacionará com a maior homogeneidade das condições de cultivo. Também o crescimento larvar, obtido através do estudo dos otólitos, tem demonstrado, para a espécie *S. pilchardus*, variações por vezes acentuadas entre as zonas costeiras do Cantábrico e da Galiza (ALVAREZ & ALEMANY, 1992; ALVAREZ & MORALES-NIN, 1992).

A análise da variabilidade típica da taxa de crescimento larvar é uma forma indirecta de se ter acesso à importância relativa da predação e inanição no meio natural. Segundo HOUDE & ZASTROW (1993) a taxa de crescimento relaciona-se com a taxa de mortalidade. A variação da média da taxa de crescimento e do seu desvio

padrão reflecte alterações na abundância dos predadores e do alimento, factores que determinam a sobrevivência larvar (PEPIN, 1989a). Este último estudo prevê que a variação da média da taxa de crescimento aumente com o incremento do alimento e que a mesma variação diminua com o aumento do número de predadores.

De facto, de acordo com o estudo anterior, a taxa média de crescimento aumenta com a disponibilidade de alimento, o que se traduz também por um incremento da variação daquela taxa, já que existem diferentes probabilidades de encontros entre as larvas e as suas presas, bem como diferentes capacidades nas larvas em capturar o alimento existente. Por outro lado, a adição de predadores diminui a variação uma vez que estes capturarão as larvas menores e mais fracas, produzindo uma maior homogeneidade nas taxas de crescimento.

Segundo PEPIN (1989b), a dimensão média da larva parece ser determinada pela abundância de alimento, enquanto que a sua variação reflectirá alterações na pressão dos predadores. A acção da predação sobre as larvas de peixes menores provoca um aumento da dimensão média da população, reduzindo também a sua variação. É necessário considerar que tanto os predadores como o alimento disponível estão influenciando a própria distribuição de frequências de comprimentos das larvas, pelo que é necessário utilizar um meio alternativo para a determinação da taxa de crescimento. Desta forma, não deverá ser utilizada a amostragem sequencial e a distribuição de frequências de comprimentos larvares para este tipo de estudo.

Neste contexto, o método de análise do crescimento assume assim especial importância. Actualmente considera-se que o estudo dos anéis dos otólitos das larvas é uma das melhores opções para determinar a taxa individual de crescimento larvar (RÉ *et al.*, 1988; MAILLET & CHECKLEY, 1990). No entanto, no presente estudo trabalhou-se com taxas individuais de crescimento proteico que tal, como a espessura dos últimos anéis do otólito larvar (CASTILLO *et al.*, 1985; HERRERA *et al.*, 1985; PALOMERA *et al.*, 1988), reflectem o ambiente recente em que as larvas se desenvolveram. De facto, estudos realizados por HOVENKAMP (1990), HOVENKAMP & WITTE (1991) e CLEMMESSEN & DOAN (1996) referem que o crescimento do otólito e a

razão RNA/DNA estão bem correlacionados entre si e com o crescimento somático da larva.

A análise quantitativa dos ácidos nucleicos proporciona uma forma relativamente simples de se determinar a taxa de crescimento recente e individual, há muito ambicionada pelos investigadores. A determinação da taxa de crescimento pelos meios tradicionais tem algumas limitações, sobretudo durante curtos períodos de tempo, da ordem dos dias. Os trabalhos nesta escala temporal são necessários devido à natureza dinâmica do ambiente marinho e à resposta rápida das larvas às alterações do meio.

O estudo da média e da variação da taxa de crescimento proteico será, de uma forma generalizada, uma solução para a comparação das condições que afectam o destino das larvas de peixes no seu meio natural, porque integra quer parâmetros abióticos, como a temperatura, quer parâmetros bióticos, nomeadamente a alimentação e a predação. Considerou-se, por esse motivo, que este seria a melhor forma para uma comparação preliminar das duas áreas e épocas estudadas na zona costeira da Península Ibérica, a nível das condições de sobrevivência das larvas de sardinha.

De facto, o desvio padrão graficado em função da taxa média de crescimento proteico de larvas de sardinha na costa espanhola revelou uma tendência para apresentar valores inferiores em Maio de 1991, relativamente a igual período de 1992. Tal pode levar a sugerir que na costa espanhola, em Maio de 1991, as larvas estiveram sujeitas a uma maior acção da predação do que no ano seguinte (1992). A isto não será alheio o facto da temperatura ter sido mais baixa em Maio de 1991, aumentando o período de duração da vida planctónica e logo a exposição à predação e conduzindo, indirectamente, a um aumento da condição larvar. De facto, nos resultados expressos pela razão RNA/DNA esta foi ligeiramente superior nesse ano, para além do que se verificou também uma ausência de larvas em inanição.

Da mesma forma, também se poderá inferir, através da análise do desvio padrão em função da taxa média de crescimento proteico de larvas de sardinha, que a

predação terá sido maior na costa espanhola do que na costa algarvia, durante o mês de Maio de 1992, uma vez que o desvio padrão foi inferior na primeira. A menor dispersão relativa dos valores individuais da taxa de crescimento na costa espanhola poderá ter-se reflectido tanto na menor percentagem de larvas em inanição nesse local, como na superioridade de comprimentos larvares registados. De facto, a acção da predação eliminará, em princípio, preferencialmente as larvas mais fracas e de menor comprimento. No entanto, a taxa média de crescimento proteico foi também inferior, o que se associou à menor temperatura da água e aos valores inferiores da razão RNA/DNA. Assim, se a intensidade da predação tivesse sido igual, a percentagem de inanição provavelmente seria superior na costa espanhola, quer devido à menor condição das larvas, quer à menor temperatura da água que prolongando a duração da vida planctónica, aumenta também a probabilidade de inanição.

A análise da taxa de crescimento dentro de cada uma das zonas em estudo demonstrou também a existência de alguma variabilidade neste parâmetro. Quando se compararam os vários transectos realizados na costa algarvia, verificou-se que diferiram de forma significativa entre eles, sendo o da zona de Albufeira que preferencialmente contribui para a existência dessas diferenças. Neste transecto determinaram-se as taxa de crescimento proteico mais elevadas, tal como os valores da razão RNA/DNA. No entanto, a temperatura da água foi das mais reduzidas, logo a seguir ao transecto de Sagres, onde mais se fez sentir o afloramento, embora as diferenças não tenham sido muito acentuadas entre transectos. Situação similar ocorreu na costa espanhola, concretamente na área 2. De facto, quer na costa algarvia quer na espanhola, foi a razão RNA/DNA que mais se associou-se à taxa de crescimento, apresentando-se a variação da temperatura com menor influência.

Segundo BUCKLEY (1984) quando se comparam larvas que vivem no meio natural onde a variabilidade de abundância de presas é elevada, mas num intervalo relativamente restrito de temperaturas, a disponibilidade de alimento será o factor condicionante da taxa de crescimento e então a razão RNA/DNA explicará, maioritariamente, a variabilidade observada na taxa de crescimento.

Um trabalho recente desaconselha a utilização da razão RNA/DNA na estimativa da taxa de crescimento proteico (MATHERS *et al.*, 1994), contrariamente ao que tem sido defendido por diferentes investigadores (BUCKLEY, 1984; CLEMMESSEN, 1989). Os problemas associam-se ao facto da razão RNA/DNA, apesar de se correlacionar com a taxa de crescimento proteico em larvas de peixes, não se relacionar directamente com a taxa de síntese proteica. No entanto, o crescimento envolve processos complexos e, em geral, é conseguido através quer da taxa de síntese quer da taxa de degradação proteica em distintas combinações (HOULIHAN *et al.*, 1986; HOULIHAN, 1991). A degradação também é muito importante na eliminação das proteínas anormais (HERSHKO & CIECHANOVER, 1982), sendo, mesmo, possível que a baixa taxa de degradação proteica encontrada nos cefalópodes, que se caracterizam por elevadas taxas de crescimento, possa contribuir para a sua rápida senescência típica do seu ciclo de vida (O'DOR & WELLS, 1987; HOULIHAN *et al.*, 1990).

Por outro lado, existem indicações que as larvas de peixes em crescimento degradam uma grande proporção das proteínas que sintetizam, evitando assim acumular proteínas anormais (HOULIHAN *et al.*, 1990). No entanto, como se referiu, apesar de a razão RNA/DNA provavelmente não se relacionar directamente com a taxa de síntese proteica, relaciona-se com o resultado líquido entre esta e a taxa de degradação, e que se traduz no crescimento proteico, podendo por vezes originar taxas negativas, tal como ocorreu neste trabalho. De facto, os resultados do estudo de EHRLICH (1974) mostram que as larvas de *C. harengus*, na fase inicial de crescimento, caracterizam-se por uma produção acentuada de proteínas que ultrapassa de forma acentuada a de outras macromoléculas, o que vem reforçar o facto da relação RNA/DNA se ajustar tão bem à taxa de crescimento, neste período da vida dos peixes.

Com efeito, a metodologia e as questões colocadas pelo trabalho de MATHERS *et al.* (1994) à utilização da razão RNA/DNA na determinação da taxa de crescimento proteico, têm sido criticadas (FOLKVORD & MOKSNESS, 1995). De acordo com estes autores, existem dois aspectos importantes em estudos sobre crescimento larvar

que não se verificaram no trabalho de MATHERS *et al.* (1994). O primeiro diz respeito à expressão da taxa de crescimento observada, a qual deve ser possível de comparar com os resultados de outros autores, o que não aconteceu. O segundo aspecto é a necessidade das comparações entre larvas cultivadas em laboratório e recolhidas na natureza só se realizarem quando se tratarem de larvas do mesmo manancial e em condições térmicas semelhantes, o que também não se verificou. Desta forma, segundo FOLKVORD & MOKSNESS (1995), as conclusões do trabalho anterior não justificam a exclusão da razão RNA/DNA em estudos de crescimento larvar.

De facto, embora a razão RNA/DNA, proposta por BULOW (1970) como indicador recente da taxa de crescimento em peixes adultos, seja utilizada para a estimação da taxa de crescimento numa grande variedade de animais, parece que este tipo de aplicação se adapta, de forma particular, às larvas de peixes. Os peixes crescem continuamente através do período larvar, contrariamente a muitos invertebrados os quais passam por várias fases de muda e fases não tróficas (ANGER & HIRCHE, 1990). Depois do período larvar os próprios peixes apresentam fases no seu ciclo de vida, como a maturação e postura em que a razão RNA/DNA no músculo decresce, mas aumenta muito no fígado. Assim, razões RNA/DNA elevadas poderão não indicar necessariamente um rápido crescimento do corpo, sobretudo durante a maturação das gónadas (BULOW, 1981,1987). Esta questão faz sublinhar mais uma vez a necessidade de limitar a utilização da razão RNA/DNA, em estudos de crescimento, às fases mais iniciais da vida dos peixes (BUCKLEY, 1979).

5- Conclusões

O estado nutricional das larvas de sardinha recolhidas na zona costeira da Península Ibérica foi, em geral, elevado. No entanto, os resultados dos índices morfométricos e bioquímicos, utilizados para determinar a condição larvar, não se correlacionaram de forma significativa entre eles, o que poderá evidenciar a existência de diferenças temporais na resposta à inanição. De facto, os índices morfométricos caracterizam-se por uma resposta mais lenta à falta de alimento, enquanto que os índices bioquímicos são consideravelmente mais sensíveis. Por

esta razão, no presente trabalho utilizaram-se, de forma preferencial, os índices bioquímicos.

Através dos índices bioquímicos verificou-se que o estado nutricional foi superior no transecto de Albufeira da costa algarvia e na área 2/3 (Noroeste) da costa espanhola. A análise geral dos resultados fornecidos pelos índices bioquímicos indicou a existência de variações importantes a nível da condição larvar, tanto na costa portuguesa como espanhola, que se tentaram relacionar com os diferentes parâmetros ambientais estudados. No entanto, apenas os índices DNA/mg e, em particular, a razão RNA/DNA se associaram de forma significativa às diferentes variáveis abióticas e bióticas disponíveis.

A experiência de validação (Capítulo III) já tinha indicado, tal como para outras espécies, que os índices anteriores serão os mais adequados para avaliar a influência que os principais factores ambientais têm na condição e, por inferência, na sobrevivência larvar de *S. pilchardus*.

A acção directa da temperatura da água na condição larvar foi pouco óbvia. Tal poderá dever-se ao facto da amostragem das larvas e a determinação da temperatura terem sido realizadas em simultâneo e não com o desfaseamento necessário para que a influência da temperatura se pudesse revelar na condição dos indivíduos. No entanto, apesar de não significativa, a correlação entre as variáveis anteriores foi negativa, o que pode ter estado ligado à ocorrência de afloramento costeiro mais acentuado nas estações a Oeste.

Outros factores abióticos estudados, como a velocidade do vento e a turbulência, determinados apenas na costa algarvia, registaram valores elevados no transecto de Albufeira, onde a condição larvar foi máxima. Foi neste transecto que a velocidade do vento atingiu um valor próximo do considerado ideal (5-6 m/s) para a sobrevivência larvar. Esta foi das variáveis abióticas que explicou maior percentagem de variação da condição larvar (RNA/DNA) quer *per si*, quer associada a factores como a densidade de predadores potenciais.

Relativamente aos parâmetros bióticos, tanto na costa portuguesa como espanhola, os valores mais elevados de condição larvar encontraram-se nas estações com maior número de presas. Tal foi especialmente óbvio através da relação significativa que se estabeleceu entre DNA/mg e a densidade de *nauplii*. No entanto, apesar da correlação positiva entre a razão RNA/DNA e o número de presas, esta não foi significativa. Tal não implicará directamente uma ausência de relação entre ambos mas antes que a verdadeira disponibilidade de alimento poderá não ter sido medida.

A análise das presas potenciais para as larvas de sardinha mostrou que os *nauplii* foram um dos grupos mais abundantes nas recolhas de microplâncton realizadas na costa algarvia. Estes resultados parecem estar de alguma forma relacionados com o facto de as principais presas encontradas no tubo digestivo das larvas analisadas terem sido os copépodes, em diferentes fases do desenvolvimento (ovos, *nauplii*, copepoditos e adultos). Contudo, a percentagem de larvas de *S. pilchardus* capturadas com alimento no tubo digestivo foi baixa, o que se relacionou, em princípio, com o seu esvaziamento durante a recolha e fixação das amostras.

Por outro lado, de entre os potenciais predadores zooplânctónicos estudados, os quetognatas, especialmente *Sagitta friderici*, foram dos grupos quase sempre presente nas recolhas, co-ocorrendo com as larvas de sardinha e apresentando-se, por vezes, em percentagens elevadas. Os quetognatas correlacionaram-se significativamente com a densidade de *nauplii*, pelo que também poderão competir com as larvas de peixes a nível alimentar. Tal como nas recolhas de microplâncton, o transecto de Albufeira apresentou também valores significativamente superiores de predadores potenciais em relação aos restantes locais estudados na costa algarvia. Este parâmetro explicou, a nível individual, a maior percentagem de variação da razão RNA/DNA, a qual aumentou ligeiramente com a introdução de variáveis como a velocidade do vento e temperatura. A predação, *per si* ou complementado com a competição, parece ter desempenhado um papel preponderante na determinação da condição das larvas de sardinha recolhidas. Provavelmente devido à maior importância da predação relativamente

à competição, a percentagem de larvas recolhidas em estado nutricional carenciado foi muito reduzida, uma vez que a acção dos predadores ao eliminar os indivíduos mais fracos, eleva a condição média das larvas, enquanto que a competição contribuiria para o seu decréscimo. De facto, de acordo com o "nível crítico" determinado para a razão RNA/DNA, a inanição entre as larvas de *S. pilchardus* foi pouco frequente. Apesar de na maioria das estações os valores obtidos terem sido nulos, existiram outras onde a percentagem de larvas em inanição ultrapassou os 10 %, revelando que a disponibilidade alimentar, associada ou não à competição, em escalas espaciais restritas pode ser importante.

De qualquer forma, os valores, em geral, elevados da razão RNA/DNA nas larvas analisadas, associados às percentagens de inanição reduzidas, podem ser interpretados, quer por uma condição efectivamente boa da população larvar, quer pela acção intensa da predação.

A menor percentagem de larvas em inanição na costa espanhola indicará uma predação mais intensa nessa zona. Tal resultará da menor temperatura da água, a qual reduzindo o crescimento, aumentará a duração da vida planctónica, pelo que o período de exposição aos predadores será maior.

Devido à influência da temperatura na razão RNA/DNA, é conveniente que a comparação da condição larvar entre duas zonas com características térmicas distintas se realize integrando estas duas variáveis. A determinação da taxa de crescimento proteico, através da razão RNA/DNA e da temperatura constituiu uma das soluções mais adequadas. A análise da média e o desvio padrão da taxa de crescimento proteico evidenciou, também, uma maior acção da predação sobre as larvas de sardinha provenientes da costa espanhola relativamente à costa algarvia, o que concorda com os resultados da percentagem de inanição. A incidência da inanição e da predação sobre as larvas de sardinha parece variar assim no espaço e no tempo.

De uma forma geral, através do índice RNA/DNA e complementarmente da taxa de crescimento proteico encontraram-se algumas evidências que, para a espécie *S. pilchardus*, de entre os principais factores associados normalmente à sobrevivência larvar no meio marinho, a predação parece desempenhar um papel relativamente mais importante que a inanição.

O estudo da razão RNA/DNA constituirá um aspecto a privilegiar em estudos integrados que visem esclarecer e aprofundar os processos inerentes à sobrevivência larvar e indirectamente da variabilidade do recrutamento de espécies como *S. pilchardus*.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não existirem evidências conclusivas de que as variações na mortalidade larvar determinem o recrutamento nem de que este explique as flutuações nas capturas, várias hipóteses, às quais se fez referência ao longo desta dissertação, relacionam os factores condicionantes da sobrevivência das larvas com a força das classes anuais. Os resultados deste trabalho, não obstante não permitirem aceitar ou refutar essas hipóteses, possibilitam algumas considerações sobre a sua aplicação à espécie em estudo (*S. pilchardus*). Nesta perspectiva, constatou-se que as percentagens de inanição das larvas de sardinha, analisadas por classe de comprimento, não suportaram a hipótese do "período crítico" (HJORT, 1914). De facto, as larvas na fase de transição entre a alimentação endógena e exógena evidenciaram percentagens de inanição mais reduzidas que as fases larvares mais avançadas. Por outro lado, a hipótese da "sincronia" (CUSHING, 1975) e a hipótese da "estabilidade" (LASKER, 1981), também parecem ter pouca adequação ao caso da sardinha, uma vez que a principal época de reprodução desta espécie ocorre no Inverno, pelo que o desenvolvimento larvar não coincide nem com os *blooms* planctónicos primaveris, nem com uma maior estabilidade da coluna de água, típica da situação estival. Contudo, a teoria do "membro/errante" ou da "retenção larvar" de SINCLAIR (1988) parece explicar o facto da postura se localizar, preferencialmente, em períodos ou zonas onde o afloramento costeiro não ocorre, ou seja, na Costa Ocidental da Península Ibérica durante o Inverno e na Primavera na costa Algarvia bem como na costa Nordeste de Espanha. Desta forma, é evitado o arrastamento das fases mais iniciais para fora da zona costeira. Por outro lado, a hipótese da "predação" de HUNTER (1981), parece também encontrar algum suporte no presente trabalho uma vez que, a condição larvar se correlacionou positivamente com a densidade dos potenciais predadores, pelo que a percentagem reduzida de larvas em inanição, indicará uma acção intensa da predação.

Por outro lado, com este trabalho pretendeu-se tornar a aplicação dos índices de condição nutricional mais vulgarizada em estudos futuros de rotina de ictioplâncton. Tal será particularmente útil no caso de investigações dirigidas a espécies com interesse como recurso, nomeadamente a sardinha (*S. pilchardus*) cujo recrutamento está sujeito a elevada variabilidade. Com efeito, é comumente aceite que a compreensão dessas flutuações necessita da informação relativa aos factores que influenciam a sobrevivência nas fases iniciais do desenvolvimento dos peixes.

Assim, a possibilidade de que o recrutamento seja influenciado por factores que actuam numa fase muito inicial da vida dos peixes, sublinha a necessidade de complementar as densidades das larvas com informação sobre a sua condição. Deste modo, proporcionar-se-ão melhores perspectivas de comparação com o recrutamento, do que apenas com dados de abundância larvar não ajustados. De facto, densidades elevadas de larvas em fraco estado nutricional dificilmente se relacionarão com uma classe anual forte. Por outro lado, o estudo da condição nutricional, sobretudo através da razão RNA/DNA, da determinação do “nível crítico” associado e da taxa de crescimento proteico, parece promissor em estudos futuros integrados que visem esclarecer os processos inerentes à sobrevivência larvar e indirectamente a variabilidade do recrutamento das espécies.

O facto da amostragem na costa portuguesa e espanhola ter sido realizada em períodos temporal e espacialmente restritos, bem como integrada em projectos de investigação diferentes, com objectivos e métodos nem sempre coincidentes, dificultou de alguma forma a análise dos resultados. Para além disso, o acesso limitado aos parâmetros bióticos e abióticos que caracterizaram a costa espanhola na altura das recolhas, impossibilitou um estudo mais aprofundado dos factores que determinaram a condição larvar nesta zona. Neste sentido, será necessário a realização de estudos mais alargados no tempo e no espaço, que integrem uma maior informação sobre as variáveis ambientais.

Para além disso, devem conjugar-se esforços em diferentes áreas de investigação, o que envolve uma aproximação efectiva entre os investigadores que se dedicam aos estudos do recrutamento, da sobrevivência larvar e da condição nutricional. Uma melhor integração entre os oceanógrafos físicos e químicos e os biólogos marinhos deve também ser encorajada, sendo esta uma forma indispensável de se determinar os factores ambientais responsáveis pela variabilidade na condição e sobrevivência das larvas de peixes.

De qualquer forma, a razão RNA/DNA constitui um instrumento com grandes potencialidades em estudo futuros integrados, que visem uma monitorização de rotina, de longa duração e em toda a extensão da costa Atlântica da Península Ibérica, da abundância e condição de larvas de peixes, como *S. pilchardus*, com o intuito de relacionar esses resultados com as variações registadas no recrutamento. Só através da constituição de série temporais da abundância e da condição larvar, dos principais factores ambientais susceptíveis de actuarem nesta fase, e da dimensão da classe anual, se poderá, de facto, esclarecer a importância da fase larvar na variabilidade do recrutamento.

Apesar da possibilidade de prever, através de uma monitorização ambiental, a dimensão da futura classe anual, com o objectivo de fornecer informação útil ao sector económico, ser muito difícil de concretizar a curto prazo, tal não implica que a investigação de base neste âmbito deva ser menosprezada. Pelo contrário, tal perspectiva, deve constituir um incentivo para que se continuem os estudos, de forma a melhorar o conhecimento dos mecanismos que afectam a sobrevivência dos estados iniciais da vida dos peixes.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. H. (1991). Estudo de uma área de postura de sardinha, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) na costa continental portuguesa. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas*, Lisboa, 16:23-53.
- ALHSTROM, E. H. (1954). Distribution and abundance of egg and larval population of Pacific sardine. *Fish. Bull.* 56(96): 83-139.
- ALHSTROM, E. H. & H. G. MOSER (1979). Systematics and development of early life history stages of marine fishes: achievements during the past century, present status and suggestions of future. *Symposium on the early life history*, 1: 1-31.
- ALDERDICE, D. F. (1985). Strategies for early life history studies. *Trans. Am. soc.*, 114(4): 445-451.
- ALDERDICE D. F. & C. R. FORRESTER (1971a). Effects of salinity and temperature on embryonic development of the Petrale Sole (*Eopsetta jordani*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28: 727-744.
- ALDERDICE, D. F. & C. R. FORRESTER (1971b). Effects of salinity, temperature and dissolved oxygen on early development of the Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28: 883-902.
- ALLIOT, E.; A. PASTOUREAUD & J. TRELLU (1977). Evolution of enzymatic activities in the digestive system during the sea bass larval life (*Dicentrarchus labrax*). Variations of proteograms and zymograms, pp. 85-91. 3rd Meeting of the ICES-Working Group on Mariculture, Brest, France, May, 1977. CNEXO, Brest, Oct. 77.
- ALVAREZ, F. & F. ALEMANY (1992). Regional growth differences in sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) from cantrabrian and galician coasts. *ICES, CM Pelagic Fish Committee*, H:9 , 10 p.
- ALVAREZ, F. & B. MORALES-NIN (1992). An attempt to determine growth and hatching dates of juvenile sardine, *Sardine pilchardus*, in the western Mediterrean Sea. *Mar. Biol.*, 114: 199-203.
- ANDRES, H. G., H-CH. JOHN & P. RÉ (1992). Fish larvae and gammaridae plankton off northern Portugal during Autumn 1987. *Senckenbergiana marit.*, 22 (3/6): 179-201.

- ANGER, K. & H.-J. HIRCHE (1990). Nucleic acids and growth of larvae and juvenile spidercrab, *Hyas araneus*. *Marine Biology*, 705: 403-411.
- ANTUNES, M. M., P. L. CUNHA, A. P. DUARTE & E. P. MENDONÇA (1988). Ria de Alvor as a spawning place and a nursery ground. *J. Fish. Biol.*, 33 A: 185-190.
- ARAI, M. & D. HAY (1982). Predation by medusae on Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Can.*: 39: 1537-1540.
- ARONSON, R. B. & K. L. HECK Jr (1995). Tethering experiments and hypothesis testing in ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 121:307-309.
- ARTHUR, K. D. (1977). Distribution, size, and abundance of microcopepods in the California current system and their possible influence on survival of marine teleost larvae. *Fish. Bull.*, 75(3): 601-611
- ASHFORD, D. A. & V. PAIN (1986). Effects of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo. *J. Biol. Chem.*, 261:4059-4065.
- BAILEY, K. M. & R. S. BATTY (1984). Laboratory study of predation by *Aurelia aurita* on larvae of cod, flounder, plaice and herring: development and vulnerability to capture. *Mar. Biol.*, 83:287-291.
- BAILEY, K. M. & E. D. HOUDE (1989). Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. In: *Advances in Marine Biology*. J. H. S. Blaxter & A. J. Southward (eds.), vol. 25, pp. 1-83. Academic Press. London.
- BAILEY, K.M., M. F. CANINO, J. N. NAPP, S. M. SPRING & A. L. BROWN (1995). Contrasting years of prey levels, feeding conditions and mortality of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the western Gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119:11-23.
- BALBONTIN, F., S. S. DE SILVA & K. F. EHRLICH (1973). A comparative study of anatomical and chemical characteristics of reared and wild herring. *Aquaculture*, 2: 217-240.
- BALON, E. K. (1984). Reflections on some events in the early life of fishes. *Trans. American Fish. Soc.*, 113: 178-185.

- BAMSTEDT, V. & H. R. SKJOLDAL (1980). RNA concentration of zooplankton. Relationship with size and growth. *Limnol. Oceanogr.*, 25:304-316.
- BARRON, M. G. & I. R. ADELMAN (1984). Nucleic acid, protein content, and growth of larval fish sublethally exposed to various toxicants. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41:141-150.
- BARRON, M. G. & I. R. ADELMAN (1985). Temporal characterisation of growth of fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae during sublethal hydrogen cyanide exposure. *Comp. Biochem. Physiology*, 81 C (2): 341-344.
- BELL, M. V. & J. R. SARGENT (1996). Lipid nutrition and recruitment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 134: 315-316.
- BELVEZE, H. & K. ERZINI (1983). The influence of hydroclimatic factors on the availability of sardine in the Moroccan Atlantic fishery. *In: Proceedings of the expert consultation to examine change in abundance and species composition of neritic fish resources*. G. D. Sharp & J. Csirke (eds). *FAO, Fish. Rep.*, 291(2): 285-327.
- BENSADOUN, A. & D. WEINSTEIN (1976). Assay of protein in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, 70: 241-250.
- BENTLE, L., A. S. DUTTA & J. METCOFF (1981). The sequential enzymatic determination of DNA and RNA. *Anal. Biochem.*, 116: 5-16.
- BERGERON, J.-P., M. BOULHIC & R. GALOIS (1991). Effect de la privation de nourriture sur la teneur en AND de la larve de sole (*Solea solea* L.). *ICES J. mar. Sci.*, 48:127-134.
- BERGMAN, J. N., H. W. van der VEER & J. J. ZIJSTRA (1988). Plaice nurseries: effects on recruitment. *J. Fish. Biol.*, 33 (supplement A): 210-218.
- BHATTACHARYA, G. & R. JOHNSON (1977). Statistical concepts and methods. John Wiley & Sons, Inc. New-York, 638 p.
- BLAXTER, J. H. S. (1969). Experimental rearing of pilchard larvae, *Sardina pilchardus*. *J. mar. biol. Assoc. U. K.*, 49:557-575.
- BLAXTER, J. H. S. (1971). Feeding and condition of Clyde herring larvae. *Rapp. P. -v. Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer.*, 160: 128-136.

- BLAXTER, J. H. S. (1975). Reared and wild fish-how do they compare? *In*: 10th European Symposium on Marine Biology, Ostend, Belgium, Sept. 17-23, vol.1, pp.11-12 .
- BLAXTER, J. H.S. (1992). The effect of temperature on larval fishes. *Neth. J. Zool.*, 42:336-357.
- BLAXTER, J. & G. HEMPEL (1963). The influence of egg size on size on herring larvae (*Clupea harengus*). *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 28: 211-240.
- BLAXTER, J. H. S. & M. E. STAINES (1971). Food searching potential in marine fish larvae. *In*: Proceedings 4th European Marine biology Symposium, pp-467-481. D. J. Crisp (ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- BLAXTER, J. H. S. & R. HUNTER (1982). The biology of the clupeid fishes. *Adv. Mar. Biol.*, 20:1-223.
- BOHINSKI, R. C. (1987). Modern concepts in biochemistry. Allyn and Bacon, Inc. Toronto. 346 p.
- BOOMAN, C., A. FOLKVORD & J. HUNTER (1991). Responsiveness of starved northern anchovy, *Engraulis mordax* larvae to predatory attacks by adult anchovy. *Fish. Bull. U. S.*, 89: 707-711.
- BOUCHER, J. ; J. P. BERGEREON & J.-D. GAFFET (1983). Composition faunistique du mesozooplankton de l'upwelling cotier portugais. *Publications du Centre National pour l'Exploitation des Oceans.*, 25: 89-94.
- BRADFORD, M. J. (1992). Precision of recruitment predictions from early life stages of marine fishes. *Fish. Bull. U. S.*, 90: 238-251.
- BREWER, G. D. , G. S. KLEPPEL & M. DEMPSEY (1984). Apparent predation on ichthyoplankton by zooplankton and fishes in nearshore waters of southern California. *Mar. Biol.*, 80:17-28.
- BREWER, G. D. & G. S. KLEPPEL (1986). Diel vertical distribution of fish larvae prey in nearshore waters of southern California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 27: 217-226.
- BROWMAN, H. (1995). Introduction: commentaries on current research trends in recruitment studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 128: 305-310.

- BROWMAN, H. (1995). Predator-prey interactions in the sea: commentaries on the role of turbulence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 139: 301-302.
- BUCKLEY, L. J. (1979). Relationships between RNA-DNA ratio prey density and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 1495-1502.
- BUCKLEY, L. J. (1980). Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and effects of starvation. *Fish. Bull.*, 77: 703-708.
- BUCKLEY, L. J. (1982). Effects of temperature on growth and biochemical of larval winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 8: 181-186.
- BUCKLEY, L. (1984). RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.*, 80: 291-298.
- BUCKLEY, L. J. & J. F. BULOW (1987). Techniques to the estimation of RNA, DNA and protein in fish. *In: The age and growth of fish*, pp.345-354. R. C. Summerfelt & G. E. Hall. The Iowa State University Press, Arnes, Iowa.
- BUCKLEY, L. J. & R. G. LOUGH (1987). Recent growth, biochemical composition, and prey field of larva hadcod (*M.aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) on Georges Bank. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 14-25.
- BUCKLEY, L. J.; A. SMIGIELSKI; T. HALAVIK & G. LAURENCE (1990). Effects of water temperature on size and biochemical composition of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* at hatching and feeding initiation. *Fish. Bull.*, 88:419-428.
- BUCKLEY, L. J.; A. SMIGIELSKI; T. HALAVIK; E. M. CALDARONE; B. R. BURNS & G. LAURENCE (1991a). Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. I. Among-location variability in size and survival of larvae reared in the laboratory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 74:117-124.
- BUCKLEY, L. J.; A. SMIGIELSKI; T. HALAVIK; E. M. CALDARONE; B. R. BURNS & G. LAURENCE (1991b). Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. II. Effects of spawning time and female size on size, composition and viability of egg and larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 74:125-135.

- BULOW, J. F. (1970). RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, 27: 2343-2349.
- BULOW, J. F. (1971). Selection of suitable tissues for use in the RNA-DNA ratio technique of assessing recent growth rate of a fish. *Iowa State Journal of Science*, 46(1):71-78.
- BULOW, J. F. (1974). A review of the literature concerning the relationship between nucleic acids and the growth rates of fish. *The Tennessee Tech. Journal*, 9:17-23.
- BULOW, J. F. (1978). Comparisons of two bluegill populations by means of RNA/DNA ratio and liver-somatic index. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107(6):799-803.
- BULOW, J. F. (1981). Seasonal variations in RNA/DNA ratios and in indicators of feeding, reproduction, energy storage, and condition in a population of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. *J. Fish Biol.*, 18, 237-244.
- BULOW, J. F. (1987). RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. *In: The age and growth of fish*, pp.45-63. R. C. Summerfelt & G. E. Hall. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- BURTON, M. & D. IDLER (1984). The reproductive cycle in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Can. J. Zool.*, 62:2563-2567.
- CABANAS, J. M.; G. D. RIOS; A. LAVIN & T. NUNES (1992). Hydrographic conditions off the galician coast, NW of Spain, during an upwelling event. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8(1): 27-40.
- CALDARONE, E. M. & L. J. BUCKLEY (1991). Quantification of DNA and RNA in crude tissue extracts by flow injection analysis. *Anal. Biochem.*, 199:137-141.
- CANINO, M.F. (1994). Effects of temperature and food availability on growth and RNA/DNA ratios of walleye pollock *Theragra chalcogramma* (Pallas) eggs and larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 175: 1-16.
- CANINO, M. F.; K. M. BAILEY & L. S. INCZE (1991). Temporal and geographic differences in feeding and nutritional condition of walleye pollock larvae *Theragra chalcogramma* in Shelikof Strait, Gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 79: 27-35.

- CANINO, M. F. & E. M. CALDARONE (1995). Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. *Fish. Bull.*, 93:158-165.
- CASSIE, M. (1969). Frequency distribution model in the ecology of plankton and other organisms. *N. Z. Journal*, 5: 65-91.
- CASTILLO, G.; E. AGUILLERA; G. HERRERA; P. BERNAL; J. BUTLER; J. CHONG & H. GONZALEZ (1985). Larval growth rates of the pacific sardine *Sardinops sagax* off the central Chile, determined by daily ring counts in otoliths. *Biologia Pesquera*, 14: 3-10.
- CHENOWETH, S. B. (1970). Seasonal variations in condition of larvae herring in Boothbay area of Maine coast. *J. Fish. Res. Board Can.*, 27(10): 1875-1879.
- CHESNEY, E. J. & M. ALONSO-NOVAL (1989). Coastal upwelling and the early life history of sardines (*Sardina pilchardus*) along the Galician coast of Spain. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer.*, 191: 63-69.
- CHÍCHARO, M. A. (1993). Estado nutricional em larvas de peixe: análise de ácidos nucleicos e proteínas. *Bol. UCA U. Algarve, UCTRA*, 1:653-669.
- CHÍCHARO, L. M. & M. A. TEODÓSIO (1991a). Utilização do estuário do Guadiana como local de postura para *Engraulis encrasicolus* Linné (1774). *Rev. Biol. U. Aveiro*, 4: 263-276.
- CHÍCHARO, L. M. & M. A. TEODÓSIO (1991b). Contribuição para o estudo do ictioplâncton do estuário do Guadiana. *Rev. Biol. U. Aveiro*, 4: 277-286.
- CHÍCHARO, L. M. & M. A. TEODÓSIO (1991c). Caracterização geral do ictioplâncton da Ria Formosa. *Rev. Biol. U. Aveiro*, 4: 287-300.
- CHÍCHARO, L. & M. A. T. CHÍCHARO (1994). A razão RNA/DNA em bivalves recém-fixados na natureza. *In: VIII Simpósio Ibérico de Estudios del bentos Marino*, pp. 196-197. Centro de Estudios Avanzados de Blanes, Barcelona.
- CHÍCHARO, M. A., B. LOPES & M. J. BEBIANNO (1994). Indicadores de poluição em mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*): ácidos nucleicos e proteínas. *In: VIII Simpósio Ibérico de Estudios del bentos Marino*, pp. 200-201. Centro de Estudios Avanzados de Blanes, Barcelona.

- CHÍCHARO, L. & M. A. T. CHÍCHARO (1995). The RNA/DNA ratio as a useful indicator of the nutritional condition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. *Sci. Mar.* 59 (Supl. 1): 95-101.
- CLARKE, A., P.G. RODHOUSE, L.J. HOLMES & P. L. PASCOE (1989). Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish, *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 133: 229-240.
- CLEMMESSEN, C.M.(1987a). A highly sensitive method to determine RNA and DNA contents in individual marine fish larvae. *ICES CM Biol. Oceanogr. Committee*, 13 p.
- CLEMMESSEN, C. M. (1987b). Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 43: 122-128.
- CLEMMESSEN, C. M. (1988). A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforsch*, 32: 134-143.
- CLEMMESSEN, C. M. (1989). RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. *J. Fish. Biol.*, 35(sA): 331-333.
- CLEMMESSEN, C. M. (1990). Improvements in the determinations of the RNA and DNA content in individual marine fish larvae. *ICES, CM Biol. Oceanogr. Comittee*, 98 , 14 p..
- CLEMMESSEN, C. M. (1993). Improvements in the fluorimetric determinations of the RNA and DNA content in individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 100: 177-183.
- CLEMMESSEN, C. M. (1994). The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Mar. Biol.*, 118: 377-382.
- CLEMMESSEN, C. M. & T. DOAN (1996). Does otolith structure reflect the nutritional condition of a fish larva? Comparison of otolith structure and biochemical index (RNA/DNA ratio) determined on the cod larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138: 33-39.

- COHEN, R.; R. LOUGH & J. MURPHY (1980). Larval herring gut content and morphological condition data from three spawning seasons (1974, 1975 and 1976) in the Georges Bank-Gulf of Maine area. NOAA, NMFS, NEFC, Woods Hole lab. Ref. no, 80-23, 143 p.
- COHEN, R. & R. LOUGH (1983). Prey field of larval herring *Clupea harengus* on a continental shelf spawning area. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10:211-222.
- COLTON, J. B.; J. GREEN; R. R. BYRON & J. L. FRISSELLA (1980). Bongo net retention rates as effected by towing speed and mesh size. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 606-623.
- CONWAY, D. V. P.; P. R. G. TRANTER; M. L. F. PUELLES & S. H. COOMBS (1991). Feeding of larval sprat (*Sprattus sprattus* L.) and sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum). *ICES C.M. Biol. Oceanog. Committee*, 76, 7p.
- CONWAY, D. V. P.; P. R. G. TRANTER & S. H. COOMBS (1993). Digestion of natural food by larval and post-larval turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 100: 221-231.
- CONWAY, D. V. P.; I. R. MCFADZEN & P. R. G. TRANTER (1994). Digestion of copepod eggs by larval turbot *Scophthalmus maximus* and egg viability following gut passage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 106:303-309.
- COOMBS, S. H. (1992). SARP cruise report. R.R.S. Challenger 92. 2 p.
- COWAN, J. H. Jr & E. D. HOUDE (1992). Size-dependent predation on marine fish larvae by ctenophores, scyphomedusae, and planktivorous fish. *Fisheries Oceanography*, 1(2):113-126.
- COWAN, J. H. Jr & E. D. HOUDE (1993). Relative predation potentials ctenophores, scyphomedusae, and planktivorous fish on ichthyoplankton in Chesapeake Bay. *Fisheries Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 95: 55-65.
- CRECCO, V. A. & T. A. SAVOY (1984). Effects of fluctuations in hydrographic conditions on year class strength of American shad (*Alosa sapidissima*) in the Connecticut River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41: 1216-1233

- CRECCO, V. A. & T. A. SAVOY (1987). Effects of climatic and density-dependent factors on intra-annual mortality of larval American shad (*Alosa sapidissima*). *Can. J. Fish. Soc. Symp*, 2:69-81.
- CUNHA, M. E. (1993) Variabilidade estacional do zooplâncton na plataforma continental portuguesa. *Bol. UCA U. Algarve, UCTRA*, 1: 229-241.
- CUSHING, D. H: (1958). The effect of grazing in reducing the primary production. A review. *Rapp. P.v. Reun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*, 144: 149-154.
- CUSHING, D. H. (1971). The dependence of recruitment on parent stock in different groups of fishes. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 33(3): 340-362.
- CUSHING, D. H. (1974). The possible density-dependence of larval mortality and adult mortality in fishes. *In: The early life history*, pp. 103-111. J. H. S. Blaxter, (ed). Berlin, Heidel, Springer-Verlag.
- CUSHING, D. H.(1975). *Marine Ecology and Fisheries*. Cambridge University. Press. 278 p.
- CUSHING, D. H.(1983). Are fish larvae too dilute to affect the density of their food organisms? *J. Plankton Research*, 5(3): 5-12.
- CUSHING, D. (1990). Plankton production and year class strength in fish populations: an update of the match/mismatch hypothesis. *Adv. mar. Biol.* 26: 249-293.
- CUSHING, D. (1995). A comment on Leggett & DeBlois. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 128: 305-310.
- DABROWSKI, K. (1982). Proteolytic enzyme activity decline in starvation fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.*, 7(1): 73-76.
- DAGG, M. J. & J. L. LITTLEPAGE (1972). Relationships between growth rate and RNA, DNA, protein and dry weight in *Artemia salina* and *Euchaeta elongata*. *Marine Biology*, 17: 162-170.
- DAVENPORT, J. (1985). Osmotic control in marine animals. *In: Physiological adaptations of marine animals*, pp.207-243. Society of Experimental Biology. U.K.
- DAWSON-SAUNDERS & TRAPP (1987). *Basic and clinical biostatistics*. A large medical Book Prentice-Hall International Inc. 136 p.

- DEBEBOISE, A. E. & G. T. TAGHOM (1988). RNA:DNA ratios of the hydrothermal-vent vestimentiferans, *Ridgeia piscesae* and *R. phaeophia* indicate variations in the growth rates over small spatied scales. *Mar. Biol.*, 97: 412-426.
- DIAS, C. A.; E. SOARES & V. MARQUES (1989). Acoustic abundance and estimation of sardine (*Sardina pilchardus*, Walb.) off the Portuguese Coast, July-August 1988. *ICES, CM*, H:52, 42 p.
- DICKSON, R.; P. KELLY; J. COLEBROOK; S. WOOSTER & D. CUSHING (1988). North winds and productions in the eastern North Atlantic. *J. Plankton Res.*, 10(1): 151-169.
- DORTCH, Q.; J. ROBERTS, J. CLAYTON & S. AHMED (1983). RNA/DNA ratios and DNA concentrations as indicators of growth rate and biomass in planktonic marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13:61-71.
- DUARTE, A. P. (1986). Estudo do ictioplâncton da Lagoa de Albufeira como estrutura isolada e em comunicação com o oceano. *Recursos Hídricos*, 7(2): 21-35.
- DUARTE, A. P. (1991). Ictioplâncton do estuário do Rio Sado- 1987/1988. estrutura, dinâmica e impactes antropogénicos. *Relatório LNETI*, publicação DEII 18/91, 136 p.
- EHRlich, K. E.(1974). Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. *In: The early life history*, pp. 301-323. J. H. S. Blaxter, (ed). Berlin, Heidel, Springer-Verlag.
- EHRlich, K. F. , J. H. S. BLAXTER & R. PEMBERTON (1976). Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar. Biol.*, 35: 105-118.
- FAGE, L.(1920). Engraulidae, Clupeidae. *Rep. Dan. Oceanogr. Exped. 1908-1910 Medit. adjac. Seas*, 2 Biology A9:140 p.
- FERREIRA, P. L. & P. RÉ (1993). Feeding of larval anchovy *Engraulis encrasicolus* (L.) in the Mira Estuary (Portugal). *Portugaliae Zoologica*. Vol. 2(3): 25-37.
- FERREIRO, M. J. & U. LABARTA (1984). Spawning areas and seasons of three clupeid species (*Sardina pilchardus*, *Sprattus sprattus* and *Engraulis encrasicolus*) in the Ria de Vigo (Galician coasts, NW Spain). *Cybiurn*, 8(3): 79-96.

- FERNÁNDEZ de PUELLES (1996). Diel variations in the vertical distribution of copepods off the north coast of Spain. *ICES J. mar. Sci.*, 97-106.
- FIÚZA, A. F. (1980) The Portuguese coastal upwelling system. *In: Actas do Seminário "Actual problems of oceanography in Portugal"*, pp.45-71. 20-21Nov., 1980, Lisboa.
- FIÚZA, A. F. (1983). Upwelling patterns off Portugal. *In: Coastal upwelling: It's sediment record. Part A: Responses of the sedimentary regime to present coastal upwelling.* E. Suess & J. Thiede (eds.). Plenum Press, New York.
- FIÚZA, A. F., M. E. MACEDO & M. R. GUERREIRO (1982). Climatological space and time variation of the Portuguese coastal upwelling. *Oceanologica Acta*, 5: 31-40.
- FOLKVORD, A. & E. MOKSNESS (1995). RNA/DNA ratios and growth of herring larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 121:311-312.
- FORTIER, L. & W. C. LEGGETT (1985). A drift study of larval fish survival. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25: 245-257.
- FORTIER, L., D. PONTON & M. GILBERT (1995). The match/mismatch hypothesis and the feeding success of fish larvae in ice-covered south-eastern Hudson Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 120: 11-27.
- FRAGO, F.; C. MORINO & M. MANRÍQUEZ (1982). Las masas de água en la costa de Galicia: Julio-Octubre. *Invest. Pesq. Res. Exp. Cient.*, 10: 55-77.
- FRANCO, C. & A. SOLÁ (1988). Contribution to the study of ichthyoplankton of commercial species on the continental shelf off Spain. *ICES, CM Pelagic Fish Committee*, H:74, 6 p.
- FRANK, K. T. (1988). Independent distribution of fish larvae and their prey: natural paradox or sampling artefact?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 48-59.
- FRANK, K. T. & W. C. LEGGETT (1981). Wind regulation of emergence times and early larvae survival in capelin (*Mallotus villosus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 215-223.
- FRANK, K. T. & W. C. LEGGETT (1982). Environmental regulation of growth rate, efficiency and swimming performance in larval capelin (*Mallotus villosus*) and its application to the match/mismatch hypothesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 691-699.

- FRANK, K. T. & W. C. LEGGETT (1985). Reciprocal oscillations in densities of larval fish and potential predators: A reflection of present or past predation?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1841-1849.
- FRANK, K. T. & J. K. MCRUER (1989). Nutritional status of field-collected haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae from south-western Nova Scotia: an assessment based upon morphometric and vertical distribution data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46(1):125-133
- FRASER, A. J. (1985). Thin-layer chromatography-flame ionization detection and quantification of marine neutral lipids and phospholipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 88: 91-99.
- FRONTIER, S. (1974). L'analyse factorielle est-elle heuristique en ecologie du plancton? *Cach. O. R.S.T.O.M. Sér. Oceanogr.*, 12(1):77-81.
- FUIMAN, L.A. & J. C. GAMBLE (1989). Influence of experimental manipulations on predation of herring larvae by juvenile herring in large enclosures. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 191: 359-365.
- FUKUDA, M., H. NAKANO & K. YAMAMOTO (1986). Biochemical changes in pacific herring during early development stages. *Hokkaido Daigaku Fac. Fish Bull.*, 37: 30-37.
- FURNESTIN, J. (1952). Biologie des clupeidés méditerranéés. *Vie et Milieu*, Suppl. 2:96-116.
- GAMBLE, J. C. & L. A. FUIMAN (1987). Evaluation of in situ enclosures during a study of the importance of starvation on to the vulnerability of herring larvae to a piscine turbot predator. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 113: 91-103.
- GARCIA-SOTO, C.; N. C. HALLIDAY; S. B. GROOM; A. LAVIN & S. H. COOMBS (1991). Satellite imagery, hydrography and plankton distributions off the NW coast of Spain in April-May 1991. *ICES C.M. Hydrography*, 17, 10 p.
- GONÇALVES, F. (1991). Zooplâncton e ecologia larvar de crustáceos decápodes no estuário do Rio Mondego. *Tese de doutoramento*. Departamento de Zoologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 330 p.

- GOOLISH, E. M.; M. G. BARRON & I. R. ADELMAN (1984). Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycerine uptake by scales. *Can. J. Zool.*, 62: 2164-2170.
- GRAHAM, J. J. (1972). Retention of larval herring within the Sheepscot estuary of Maine. *Fish. Bull. US*, 70(2): 244-305.
- HAINES, T. A. (1973). An evaluation of RNA/DNA ratio as a measure of long term growth in fish population. *J. Fish. Res. Board Can.*, 30(2): 195-199.
- HAKANSON, J.(1984). The long and short term feeding conditions in field-caught *Calanus pacificus*, as determined from the lipid content. *Limnol. Oceanogr.*, 29(4): 194-804
- HAKANSON, J.(1988). The condition of larval anchovy, *Engraulis mordax*, in the southern California Bight, as measured through lipid analysis. *ICES, Early life history Symposium*, 109p.
- HARTEE, E. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric responses. *Anal. Biochem.*, 48: 422-427.
- HASHIMOTO, K; S. WATABE; M. KONO & K. SMIRO (1979). Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bull. Jap. Soc. Fish. Sci*, 45(1):1435-1441.
- HAY, D. E. (1981). Fixation shrinkage of herring larvae: effects of salinity, formalin concentration and others factors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 1138-1143.
- HEATH, M. (1990). Segregation of herring larvae from inshore and offshore spawning grounds in the north-western North Sea - implication for the stock structure. *Netherlands Journal of Sea Research*, 25(1/2): 267-278.
- HEMPEL, G. (1965). On the importance of larval survival for the population dynamics of marine food fish. *Calif. Coop. Oceanic. Fish. Invest. Rep.*, 10: 13-23.
- HEMPEL, G. (1974). Summing-up of the symposium on the early life history. *In* : The early life history of fish, pp. 755-759. H. S. Blaxter, (ed.) Berlin, Heidel, Springer Verlag.
- HEMPEL, G. & J. H. S. BLAXTER (1963). On the condition of herring larvae. *Rapp. P-v. Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer*, 154: 35-40.

- HERRERA, G.; E. AGUILERA; G. CASTILLO & P. BERNAL (1985). Growth of anchovy larvae *Engraulis ringens* in the central Chile, determined by daily increment counts in otoliths. *Biologia Pesquera*, 14:11-15.
- HERSHKO, A. & A. CIECHANOVER (1982). Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu. Rev. Biochem.*, 51:335-364.
- HEUFELDER, G. R.; D. J. JUDE & F. J. TESAR (1982). Effects of upwelling on local abundance and distribution of larval alewife (*Alosa pseudoharengus*) in the eastern lake Michigan. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 1531-1537.
- HEWITT, R. P.; G. H. THEILACKER & N. C. LO (1985). Causes of mortality in young jack mackerel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 26: 1-10.
- HINEGARDNER, R. & D. E. ROSEN (1972). Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *The American Naturalist*, 106:621-644.
- HJELMELAND, K.; I. HUSE; T. JORGENSEN; G. MOLVIK & J. RAA (1984). Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In: Flodevigen Rapport, vol. 1, pp. 189-202. The Propagation of cod *Gadus morhua*. E. Dalh et al.. Institute of Marine Research Flodevigen Biological Station, Norway.
- HJORT, J. (1914). Fluctuation in the great fisheries of northern Europe. Viewed in the light of biological research. *Rapp. P. -v Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer.*, 20: 1-228.
- HJORT, J. (1926). Fluctuations in year classes of important food fishes. *Journal du Conseil*, 1: 5-38.
- HOLL, W. W. & R. L. WEBB (1989). Fluorescence methods for the analysis of nucleic acids in recombinant biological products. In: Luminescence application in biological chemical environmental and hydrological sciences, 41-54 pp. Goldberg (ed). ACS Symposium Series 383. Am. Chem. Soc. Washington
- HOUDE, E. D. (1977). Food concentration and stocking density effects on survival and growth of laboratory reared larvae, *Anchoa mitchilli*. *Mar. Biol.*, 43: 333-341.
- HOUDE, E. D. (1987). Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symposium*, 2: 17-29.

- HOUDE, E. D. (1989a). Comparative growth, mortality and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fish. Bull.*, 87(3): 471-496.
- HOUDE, E. D. (1989b). Subtleties and episodes in the early life history of fishes. *J. Fish. Biol.*, 35 (supplement. A):29-38.
- HOUDE, E. D. & R. C. SCHEKTER (1980). Feeding by marine fish larvae: developmental and functional response. *Env. Biol. Fish.*, 5(4): 315-334.
- HOUDE, E. D. & C. E. ZASTROW (1993). Ecosystem- and taxon-specific dynamic and energetics properties of larval fish assemblages. *Bull. Mar. Sci.*, 53(2):290-335.
- HOULIHAN, D. F. (1991). Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics. *In: Advances in comparative and environmental physiology*, vol. 7, pp.1-43. R. Gilles (ed.) Springer-Verlag, Berlin.
- HOULIHAN, D. F., D. M. MCMILLAN & P. LAURENT (1986). Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: effect of body. *Physiol. Zool.*, 59:482-493.
- HOULIHAN, D. F., D. M. MCMILLAN; C. AGNISOLA; T. T. GENOINO & L. TOTI (1990). Protein synthesis and growth in *Octopus vulgaris*. *Mar. Biol.*, 106: 251-259.
- HOULIHAN, D. F.; E. M. MATHERS & E. M. FOSTER (1993). Biochemical correlates of growth rate in fish. *In: Fish ecophysiology*, vol. 7: 45-71. J. C. Rankin & P. B. Jensen (eds.). Chapman and Hall, London.
- HOVENKAMP, F. (1990). Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the southern bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58: 205-215.
- HOVENKAMP, F. & WITTE (1991). Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 to 1989. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 70: 105-116.
- HUNT, T. (1983). The initiation of protein synthesis. *In: DNA makes RNA makes Protein*, 205-212. T. Hunt *et al.* (ed). Elsevier Biomedical Press, Oxford.
- HUNTER, J. R. (1972). Swimming and feeding behaviour of larval anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 70(3):821-838.

- HUNTER, J. R. (1981). Feeding ecology and predation of marine fish larvae. *In: Marine Fish Larvae: morphology, ecology and relation to fisheries*, pp.34-40. R. Lasker, (ed.). Washington Sea Grant (2ed).
- IBANEZ, M. (1984). Oceanografía física del golfo de Vizcaya. Caja de ahorros Vizcaína. *Col. temas vizcaínos*, 109, 55p.
- IRIGOIEN, X., J. CASTEL & S. GASPARINI (1996). Gut clearance rate as predictor of food limitation situations. Applications of two estuarine copepods: *Acartia bifilosa* and *Eurytemora affinis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 159-163
- JONES, R. (1987). Population regulation in marine teleost. *ICES CM Mini*, 9, 13 p.
- JONES, C. & E. BROTHERS (1987). validation of the otolith increment ageing technique for striped bass, *Morone saxatilis*, larvae reared under suboptimal feeding conditions. *Fish. Bull., U.S.*, 85(2): 171-178.
- KARLOVAC, J. (1967). Etude de l'écologie de la sardine *Sardina pilchardus* Walb. dans la phase planctonique de sa vie en Adriatique moyenne. *Acta Adriatica*, 13:1-109.
- KARSTEN, U. & A. WOLLENBERGER (1972). Determination of DNA and RNA in homogenized cells and tissue by surface fluorometry. *Anal. Biochem.*, 46: 135-148.
- KARSTEN U. & A. WOLLENBERGER (1977). Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 77: 464-470.
- KASHUBA, S. A. & W. J. MATTHEWS (1984). Physical condition of larval shad during spring-summer in a southwestern reservoir. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113: 199-204.
- KENDALL, A. W.; E. H. AHLSTROM; E. G. MOSER (1984). Early life history stages of fishes and their characters. *In: Ontogeny and systematic of fishes*. H. G. Moser et al. (ed.). Special number 1. pp. 11-22 American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- KIM, S. & BANG (1990). Oceanic dispersion of larval fish and its implication for mortality estimates: case study of walleye pollock larvae in Shelikof strait, Alaska. *Fish. Bull. U.S.* 88:303-311.
- KONDO, K. (1980). The recovery of the Japanese sardine. The biological basis of stock-size fluctuations. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 177: 332-354.

- KOSLOW, J.; A. S. BRAULT; J. DUGAS; R. O. FOURNIER & P. HUGHES (1985). Condition of larval cod (*Gadus morhua*) off Southwest Nova Scotia in relation to plankton abundance and temperature. *Mar. Biol.*, 86: 113-121.
- KUHLMANN, D. (1977). Laboratory studies on the feeding behaviour of the chaetognaths *Sagitta setosa* and *S. elegans* with special reference to fish eggs and larvae as food organisms. *Berichte der Deutschen Wissenschaftlichen Kommission für Meeresforschung* Bd. 25: 163-171.
- LANZÓS, A.; C. FRANCO & A. SOLA (1988). Comparative study of the annual variation in the spawning intensity of sardine of the Cantabric and NW Spain. *ICES, Pelagic Committee*, H:73, 5p.
- LAPRISE, R. & P. PEPIN (1995). Factors influencing the spat-temporal occurrence of fish eggs and larvae in the northern occurrence of fish eggs and larvae in a northern, physically dynamic coastal environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 122: 73-92.
- LASKER, R. (1975). Field criteria for survival of anchovy larvae: the relation between inshore chlorophyll maximum layers and successful first feeding. *Fish. Bull. U.S.*, 73: 453-462.
- LASKER, R. (1981). The role of a stable ocean in larval fish survival and subsequent recruitment. *In: Marine fish larvae: morphology, ecology and relation to fisheries*, pp. 80-85. R. Lasker, (ed.) Washington Sea Grant (2ed).
- LASKER, R. (1987). Use of fish eggs and larvae in probing some major problems in fisheries and aquaculture. *American Fisheries Society Symposium*, 2: 1-16.
- LAUF, M. & R. HOFER (1984). Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.
- LAVIN, A.; J. M. CABANAS & G. D. RIO (1992a). Hydrography in N-NW Spanish coastal waters. M.P.H. Saracus 0488 Cruise. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 8(1):41-55.
- LAVIN, A.; J. M. CABANAS; G. D. RIO & R. CARBALLO (1992b). SARP. Area cruise. Hydrography and nutrients. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 8(1):7-26.
- LEBOUR, M. V. (1918). The food of post-larval fish. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 11(4): 433-469.

- LEBOUR, M. V. (1919). The food of young fish. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 12: 261-365.
- LEBOUR, M. V. (1921). The larval and post-larval stages of the pilchard, sprat, and herring from the Plymouth district. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 12: 427-365.
- LEBOUR, M. V. (1923). The food of planktonic organisms II. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 13: 70-92.
- LEGENDRE, L. & P. LEGENDRE (1979). *Ecologie numerique. Le traitement multiple des donnés ecologiques, I et II*, Masson, Paris, 179+245 p.
- LEGGETT, W. C. & E. DEBLOIS (1994). Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages. *Neth. J. Sea Res.*, 32: 119-134.
- LEHNINGER, A. L. (1981). *Curso breve de bioquímica*. Ed. omega, S.A., Barcelona, 447 p.
- LE PECQ, J.-B. & C. PAOLETTI (1966). A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem.*, 17: 100-107.
- LE PECQ, J.-B. (1972). Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurements of their associated enzymes. *Methods of Biochemical Analysis*, 20: 41-86.
- LILLELUND, K. & R. LASKER (1971). Laboratory studies of predation by marine copepods on fish larvae. *Fish. Bull. U. S.*, 69(3): 655-667.
- LINO, P. (1992). Abundância e distribuição espacial de ovos e larvas de peixe na costa algarvia. 2º Encontro de Planctonologistas Portugueses. Universidade do Algarve. 2-4 Dezembro de 1992, Faro, Resumo.
- LITVAK, M. K. & W. C. LEGGETT (1992). Age and size-selective predation on larval fishes: the bigger-is-better hypothesis revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 81:13-24.
- LO, N. C. H.; J. R. HUNTER & R. P. HEWITT (1989). Precision and bias of estimates of larvae mortality. *Fish. Bull. U. S.*, 87(3): 399-416.
- LONE K. & W. INCE (1983). Cellular growth responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed different levels of dietary protein, and an anabolic steroid ethylestrenol. *General and Comparative Endocrinology*, 49:32-49.

- LOPEZ-JAMAR, E. (1977). Estudio preliminar del ictioplancton de la Ria de Arosa. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 2 (234): 42-74.
- LOPEZ-JAMAR, E. *et al.* (1991). A SARP pilot study for sardine (*Sardina pilchardus*) off north and Northwest Spain/May 1991. *ICES Biol. Oceanog. Committee*, 69, 36 p.
- LOUGHAN P.T. & G. GOLDSPIK (1984). The effects of starvation upon protein turnover in red and white myotomal muscle of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.*, 25: 223-230.
- LOVE, R. M. (1970). The chemical biology of fishes. Academic Press, London and New York, 547 p.
- LOVE, R. M. (1980). The chemical biology of fishes. Academic Press, New York, 346 p.
- LOWRY, O.; N. ROSEBROUHG; A. FARR & D. RANDALL (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- LUDWIG, L. & R. REYNOLDS (1988). Statistical ecology. A primer on methods and computing. John Wiley & Sons , New York, 337 p.
- MACKENZIE, B. R.; W. C. LEGGETT & R. H. PETERS (1990). Estimating larval fish ingestion rates: can laboratory derived values be reliably extrapolated to the wild?. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 67: 209-225.
- MACKENZIE, B. R. & W. C. LEGGETT (1991). Quantifying the contribution of small-scale turbulence to the encounter rates between larval fish and their zooplankton prey: effects of wind and tide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 73:149-160.
- MACKENZIE, B. R. & T. K. KJØRBOE (1995). Encounter rates and swimming behaviour of pause-travel and cruise larval fish predators in calm and turbulent laboratory environments. *Limnol. Oceanogr.*, 40 (7): 1278-1289.
- MACKENZIE, B. R.; M. St. JOHN & K. WIELAND (1996). Eastern Baltic cod: perspectives from existing data on processes affecting growth and survival of eggs and larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 134: 265-281.
- MAILLET, G. L. & D. M. CHECKLEY, Jr. (1990). Effects of starvation on the frequency of formation and width of growth increments in sagittae of laboratory-reared Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*, larvae. *Fish. Bull. U.S.*, 88: 155-165.

- MANIATIS, T.; E. FRITSCH & J. SAMBROOK (1982). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 521 p.
- MARGALEF, R. (1986). Ecologia. Ed. Omega, Barcelona, 949 p.
- MARGULIES, D. (1993). Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: Scombridae) in the Panamá Bight. *Mar. Biol.*, 115: 317-330.
- MARR, J. C. (1956). The "critical period" in the early history of marine fishes. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 21(1): 160-170.
- MARSHALL, S. M.; A. G. NICHOLLS & A. P. ORR (1937). On the growth and feeding of the larvae and postlarval of the Clyde herring. *J. mar. biol. Assoc. U. K.*, 22: 245-267.
- MARTIN, F. D.; D. A. WRIGHT; J. C. MEANS & E. M. SETZLER- HAMILTON (1984). Fatty acids and starvation in larval striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B(4): 785-790.
- MARTIN, F. D.; D. A. WRIGHT; J. C. MEANS & E. M. SETZLER- HAMILTON (1985). Importance of food supply to nutritional state of larval striped bass in the Potomac river estuary. *Trans. American. Fish. Society*, 114: 137-145.
- MARTIN, F. D. & D. A. WRIGHT (1987). Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. *Am. Fis. Soc. Symp.*, 2: 109-114.
- MATHERS, E. M.; D. F. HOULIHAN; I. D. MCCARTHY & L. J. BURREN (1993). Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of age and temperature. *J. Fish. Biol.*, 43:245-263.
- MATHERS, E. M.; D. F. HOULIHAN & L. J. BURREN (1994). RNA, DNA and protein concentrations in fed and starved herring *Clupea harengus* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 107:223-231.
- MAY, R. C. (1974). Larval mortality in the critical period concept. *In: The early life history of fish*. J. H. S. Blaxter (ed.). Berlin, Heidel, Springer-Verlag.

- MCCLAIN, C. R.; S. Y. CHAO; L. P. ATKINSON; J. O. BLANTON & F. F. CASTILLEJO (1986). Wind-driven upwelling in the vicinity of Cape Finisterre, Spain. *J. Geophys. Res.*, 91, C7: 8470-8486.
- MCCORMICK, M. I. & B. W. MOLONY (1995). Influence of water temperature during the larval stage on size, age and body condition of a tropical reef fish at settlement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 118: 59-68.
- MCGURK, M. D. (1984). Ring deposition in the otolith of larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Fish. Bull. U. S.*, 82: 113-120.
- MCGURK, M. D. (1985). Multivariate analysis of morphometry and dry weight of Pacific herring larvae. *Mar. Biol.*, 86: 1-11.
- MCGURK, M. D. (1986). Natural mortality of marine pelagic fish eggs and larvae: role of spatial patchiness. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 34: 227-242.
- MCGURK, M. D. & W. KUSSER (1992). Comparison of three methods of measuring RNA and DNA concentrations of individual pacific herring, *Clupea pallasii*, larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 967-974.
- MCGURK, M. D.; H. D. WARBURTON, M. GALBRAITH & W. KUSSER (1992). RNA-DNA ratio of herring and sand lance larvae from Port Moller, Alaska: Comparison with prey concentration and temperature. *Fish. Oceanogr.*, 1(3):193-207.
- MENDIOLA, B. (1974). Food of the larval Anchoveta, *Engraulis ringens* J. In: The early life history, pp.277-285. J. H. S. Blaxter, (ed). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- MENEZES, I. & P. RÉ (1991). Infection of sardine eggs by parasitic dinoflagellate *Ichthyodinium chabelardi* (Holland & Cachon) off Portuguese coast. *Int. Counc. Explor. Sea*, C. M. 1991/L:5 Session V, 8 pp.
- METHOD, Jr. D. R. (1983). Seasonal variation in survival of larval northern anchovy, *Engraulis mordax* estimated from the age distribution of juveniles. *Fish. Bull. U. S.*, 81(4): 741-750.
- MILLER, J. & J. MILLER (1988). Statistics for analytical chemistry. Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, New York, 227 p.

- MIRANDA, A.; R. CAL & J. IGLESIAS (1990). Effect of temperature on the development of eggs and larvae of sardine *Sardina pilchardus* Walbaum in captivity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 140:69-77
- MOLLER, H. (1984). Reduction of a larval herring population by jellyfish predator. *Science*, 224: 621-622.
- MONTEIRO, J. H.; F. G. ABRANTES; J. M. A. DIAS & L. C. GASPAR (1983). Upwelling records in recent sediments from southern Portugal: a reconnaissance survey *In: Coastal Upwelling: It's sediment record. Part A: Responses of sedimentary regime to present coastal upwelling.* pp. 146-162. E. Suess & J. Thiede (eds.), Plenum Press, New York.
- MORRIS, R. W.(1954). Some considerations regarding the nutrition of marine larvae. *Journal du Conseil*, 20: 255-265.
- MOSER, H. G. & E. H. AHLSTROM (1976). Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and fisheries. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.*, 40(3): 379-398.
- MUNRO, H. & A. FLECK (1966). The determination of nucleic acids. *Methods of Biochemical Analysis*, 14: 114-165.
- MURPHY, G. I. (1961). Oceanography and variations in the Pacific Sardine populations. *Calif. Coop. Oceanic. Fish. Invest. Rep.*, 8: 55-64.
- MURRAY, H. & J. HJORT (1912). The depth of the ocean. MacMillan London (ed), 821 p.
- MUSTAFA, S. (1979). RNA and synthesis of protein in relation to "biological condition" of freshwater teleost, *Channa punctatus*. *Comparative Physiology and Ecology*, 4: 118-120.
- MYERS, R. A. & N. G. CADIGAN (1993). Is juvenile natural mortality in marine demersal fish variable? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1576-1590.
- MYERS, R. A., J. A. HUTCHINGS; N. J. BARROWMAN (1996). Hypotheses for the decline of cod in the North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138: 293-308.
- NELLEN, W. (1992). SARP Cruise Report. R.V. Valdivia cruise 124. 2 p.
- NELSON, W. R.; M. C. INGHAM & W. E. SCAAF (1977). Larval transport and year-class strength of Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Fish. Bull.*, 75 (1):23-41.

- NOMURA, M.; D. DEAN & J. L. YATES (1983). Feedback regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*. In: DNA makes RNA makes Protein, 240-245. T. Hunt *et al.* (ed). Elsevier Biomedical Press, Oxford.
- O'CONNELL, C. (1976). Histological criteria for diagnosing the starving condition in the early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* G.. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 25: 285-312.
- O'CONNELL, C. P.(1980). Estimation by histological methods of the percent of starving larvae of the northern anchovy (*Engraulis mordax*) in the sea. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 178: 357-360.
- O'DOR, R. K. & M. J. WELLS (1987). Energy and nutrient flow. In: Cephalopod life cycles , vol 2, pp. 34-54 P.R. Boyle (ed.). Academic Press, London.
- OLIVAR, M. P. (1990). Spatial patterns of ichthyoplankton distribution in relation to hydrographic features in the Northern Benguela region. *Mar. Biol.*, 106 : 39-48
- OOZEKI, Y.; T. ISHII & R. HIRANO (1989). Histological study of the effects of starvation on reared and wild-caught larval stone flounder, *Kareis bicoloratus*. *Mar. Biol.*, 100: 269- 275.
- OSBORN, T. & A. SCOTTI (1996). Effects of turbulence on predator prey contact rates: where do we go from here? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 302-303.
- OWEN, R. W.; N. C. H. LO; J. L. BUTLER; G. H. THEILACKER; A. ALVARINO; J. R. HUNTER & Y. WATANABLE (1989). Spawning and survival patterns of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, in contrasting environments - a site intensive study. *Fish. Bull. U. S.*, 87(3):673-688.
- PAIN, V. M. & M. J. CLEMENS (1980). Protein synthesis in mammalian systems. In: Protein metabolism, vol.19B, part I. M. Florkin *et al.* (eds.) Elsevier, Amsterdam.
- PALOMERA, I.; B. MORALES-NIN & J. LLEONART (1988). Larval growth of anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the western Mediterranean Sea. *Mar. Biol.* 99: 283-291.
- PARKER, R. & W. VANSTONE (1966). Changes in chemical composition of Central British Columbia pink salmon during early sea life. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 23 (9): 1353-1379.

- PARRISH, R. H.; C. S. NELSON & A. BAKUN (1981). Transport mechanisms and reproductive success of fishes in the California current. *Biological Oceanography*, 1(2): 175-204.
- PASTOR, X.; C. PORTEIRO, F. ALVAREZ & J. MIGUEL (1986) Acoustic abundance estimation of sardine (*Sardina pilchardus* Walb.) off Cantabric and Galician waters. March 1986. ICES, CM, H:20.
- PAUL, J. H. & B. MYERS (1982). Fluorometric determination of DNA in aquatic microorganisms by use of H33258. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(6): 1393-1399.
- PAUL, A. J.; K. O. COYLE & L. HALDORSON (1991). Interannual variations in copepods nauplii prey of larval fish in an Alaskan Bay. *ICES J. mar. Sci.*, 48: 157-165.
- PEDERSEN, B. H.; E. M. NILSSEN & K. HJELMELAND (1987). Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring digesting copepods nauplii. *Mar. Biol.*, 94: 171-181.
- PEDERSEN, B. H. & K. HJELMELAND (1988). Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring following digestion of copepods. *Mar. Biol.*, 97: 467-476.
- PEPIN, P. (1989a). Predation and starvation of larval fish: a numerical experiment of size- and growth-dependent survival. *Biological Oceanography*, 6:23-44.
- PEPIN, P. (1989b). Using growth histories to estimate larval fish mortality rates. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 191: 324-329.
- PEPIN, P. (1991). Effects of temperature and size on development, mortality and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 508-518.
- PEPIN, P.; T. H. SHEARS & Y. de LAFONTAINE (1992). Significance of body size to the interaction between a larval fish (*Mallotus villosus*) and a vertebrate predator (*Gasterosteus aculeatus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 81:1-12.
- PEPIN, P. & T. H. SHEARS (1995). Influence of body size and alternate prey abundance on the risk of predation to fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 128: 279-285.
- PESTANA, M. G. (1989). Manacial ibérico-atlântico de sardinha (*Sardina pilchardus*, Walb.) Sua avaliação e medidas de gestão. *Dissertação*. Instituto Nacional de Investigação Científica. Lisboa. 192 p.

- PETERMAN, R. M. & M. GATTO (1978). Estimation of functional responses of predators on juvenile salmon. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 797-808.
- PETERMAN, R. M.; M. J. BRADFORD; N. LO & R. METHOT (1988). Contribution of early life stages to interannual variability in recruitment of northern anchovy (*Engraulis mordax*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 8-16.
- PETERSON, C. H.(1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem*, 83: 346-356.
- PETERSON, C. H. & R. BLACK (1994). An experimentalist's challenge: when artefacts of intervention interact with treatments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 11:289-297.
- PIELOU, E. C. (1984). The interpretation of ecological data, John Wiley & Sons, New York, 263 p.
- PITTMAN, K. (1991). Aspects of the early life history of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): Embryonic and larval development and the effects of temperature. *Dr. Scient. Thesis*. University of Bergen. Noruega, 34 p.
- PITTMAN, K.; A. B. SKIFFTESVIK & T. HARBOE (1989). Effect of temperature on growth rates and organogenesis in the larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Rapp. P-v.Reun. Cons. Int. Explor. Mer.*, 191: 421-430.
- PITTMAN, K.; O. BERGH; I. OPSTAD; A. B. SKIFFTESVIK; L. SKOLDDAL & H. STRAND (1990). Development of eggs and yolk sac larvae of halibut *Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 6: 142-160.
- POWELL, A. B. & J. CHESTER (1985). Morphometric indices of nutritional condition and sensitivity to starvation of spot larvae. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 114: 338-347.
- PURCELL, J. E. (1989). Predation on fish larvae and eggs by hydromedusae *Aquorea victoria* at a herring spawning grounds in British Columbia. *Can. MS. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1871: 139-140.
- PURCELL, J. E. (1990). Soft-bodied zooplankton predators and competitors of larval herring (*Clupea harengus pallasii*) at herring spawning grounds in British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 505-515.
- PUTTER, A. (1909). "Die ernahrung der wassertiere und der stoffhaushalt der gewasser. *Gustav. Fischer*, Jena, 168 p.

- RAAE, A.; I. OPSATAD; P. KVENSETH & B. WALTHER (1988). RNA, DNA and protein during development in feeding and starved cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture*, 73: 247-254.
- RAMALHO, A. (1927). A sardinha em Portugal. Notas biológicas. *Trav. Stn. Biol. marit.* Lisboa, 14: 29 p.
- RAMALHO, A. (1929). Contribution à l'étude des races de la sardine (*Sardina pilchardus*) au Portugal, à Madeira et aux Açores. *Rapp. P.-v Réun. Cons. int. Explor. Mer.*, 54: 46-55
- RAMALHO, A. (1933). Notice sur la pêche et biologie de la sardine au Portugal. *Rapp. P.-v Réun. Cons. int. Explor. Mer.*, 94: 29-39.
- RAYMONT, J. E. G. (1983). Plankton and productivity in the oceans. Vol. 2. Zooplankton. Pergamon Press, Oxford, 783 p.
- RÉ, P. (1978). Os ovos e estados planctónicos dos peixes marinhos portugueses. I- Ictioplâncton da costa algarvia (Maio, 1977). II- Ictioplâncton do estuário do Tejo. III- Ictioplâncton do estuário do Sado. *Relatório de estágio*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 120 p.
- RÉ, P. (1981). Seasonal occurrence, mortality and dimensions of sardine eggs (*Sardina pilchardus*) off Portugal. *Cybium*, 3^a série, 5 (4): 41-48
- RÉ, P. (1984). Ictioplâncton da região central da costa portuguesa e do estuário do Tejo. Ecologia da postura e da fase planctónica de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) e de *Engraulis encrasicolus* (Linné, 1758). *Tese de doutoramento*. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 425 p.
- RÉ, P. (1986). Otolith microstructure and the detection of life history events in sardine and anchovy larvae. *Ciênc. Biol. Ecol. Syst. (Portugal)*, 6:9-17.
- RÉ, P. (1987). Ecology of the planktonic phase of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (L.), within Mira estuary (Portugal). *Inv. Pesq.*, 51(4):581-598.
- RÉ, P. (1990). Diversidade, abundância e composição do ictioplâncton nos estuários do Tejo e do Mira. *In: Actas do I Congresso do Tejo*, vol. 2, Associação dos Amigos do Tejo, Lisboa, 231-236.

- RÉ, P. (1991). SARP related studies on anchovy in Portuguese estuaries. *ICES*, CM, L:5, 10 p.
- RÉ, P. (1994). Anchovy spawning in Mira Estuary. *Arquivos do Museu Bocage*, Nova série, Vol. II, 27: 423-454
- RÉ, P.; H. C. ROSA & M. T. DINIS (1988). Daily microgrowth increments in otoliths of *Solea senegalensis*, Kaup, larvae reared in the laboratory. *Ciência Biológica. Ecology and Systematic*, 8(1/2):37-41.
- RÉ, P.; R. C. SILVA; E. CUNHA; A. FARINHA; I. MENEZES & T. MOITA (1990) Sardine spawning off Portugal. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas*, 15: 31-44.
- RIBEIRO, R. (1991). Ecologia do ictioplâncton e reprodução da anchova, *Engraulis encrasicolus*, no estuário do Rio Mondego. *Tese de doutoramento*. Departamento de Zoologia. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra 356 p.
- RICE, J. A.; L. B. CROWDER & F. P. BINKOWSKI (1987). Evaluating potential sources of mortality for larval bloater (*Coregonus hoyi*). Starvation and vulnerability to predation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 467-472.
- RICHARD, P.; J.-P. BERGERON; M. BOULHIC; R. GALOIS & J.P.-LE RUYET (1991). Effect of starvation on RNA/DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juvenile of *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72:69-77.
- ROBINSON, S. M. C. & D. W. WARE (1988). Ontogenetic development of growth rates in larval Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*, measured with RNA/DNA ratios in the Strait of Georgia, British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1422-1429.
- ROBLES, R.; C. PORTEIRO & J. M. CABANAS (1992). The stock of Atlanto-Iberian sardine: possible causes of variability. *ICES mar. Sci. Symp.*, 195: 418-423.
- ROSCH, R. & H. SEGNER (1990). Development of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus*. Development of dry food digestion and fat absorption. *Aquaculture*, 91: 101-115.
- ROTHSCHILD, B. J.; E. D. HOUDE & R. LASKER (1982). Causes of fish stock fluctuation: Problem setting and perspectives. *In: Fish Ecology III. A foundation for Recruitment Experiment*, pp. 39-86. B. Rothschild (ed.) Woods Hole M. A. USA.

- ROY, C.; C. PORTEIRO & J. CABANAS (*in press*). The optimal environmental window hypothesis in the ICES area: the example of the Iberian sardine. *ICES Mar. Sci. Symp.*
- RUSSEL, F. S. (1926). The vertical distribution of marine macroplankton. II- The pelagic young of teleostean fishes in daytime in Plymouth area, with a note on the eggs of certain species. *J. mar. biol. Ass. U. K.* , 14: 101-159.
- SAMEOTO, D. D. (1972). Distribution of herring (*Clupea harengus*) larvae along the southern coast of Nova Scotia with observations on their growth and condition factor. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 29: 507-515.
- SCHMIDT, G. & S. J. THANNHAUSER (1945). A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161: 83-89.
- SCHNACK, D. (1972). Nahrungsökologische untersuchungen an heringslarven. Ber. dt. wiss. komm. meeresforsch, 22:273-343 (Translated by E. Parson, 1977. Dep. Agr. Fish for Scotland, Marine Laboratory, Aberdeen.
- SCURA, E. & C. JERDE (1977). Various species of phytoplankton as food for larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and relative nutritional value of the dinoflagellates. *Fish. Bull. U.S.*, 75(3): 577-583.
- SEGNER, H.; R. ROSCH; J. VERRETH & U. WITT (1993). Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2):121-134.
- SETTE, O. E. (1943). Biology of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) of north America. Part I. Early life history, including the growth, drift, and mortality egg and larval populations. *Fish. Bull.*, 50: 149-237.
- SETZLER - HAMILTON, E. M.; D. A. MARTIN; F. D. MILLSAPS & C. V. WHITLOW (1987). Analysis of nutritional condition and its use in predicting stripe bass recruitment: field studies. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 2: 115-128.
- SHARP, G. D. (1981). Colonisation in fishes - some inferences concerning requirements and opportunism in the sea. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 178: 158-160.

- SHELBOURNE, J. E. (1957). The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. *J. mar. biol. Ass.U. K*, 36: 539-552.
- SHIMIZU, H.; K. NAKATA & H. NAKANO (1989). Comparison of nutritional condition of sardine larvae, *Sardinops melanostictus* (T & S) taken from the coastal and offshore region of the Kuroshio current. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1): 179.
- SIEG, A.; C. CLEMMESSEN & B. UEBERSCHAR (1989). Comparison of chemical and histological methods for the evaluation of the *in situ* nutritional condition of marine fish larvae. *ICES, CM Biol. Oceanogr. Committee*, 12 p.
- SILVA, A. (1990) Histomorphology of digestive system of sardine *Sardina pilchardus* larvae. *Portugaliae Zoologica*, 1(5):37-41.
- SILVA, M. C. (1993). Multiple regression. Biomathematics: theory and applications. *Graduate Interdisciplinary Courses in Biology*. December (6-17) Instituto de Ciências Abel Salazar, Porto.
- SILVA, A. & A. MIRANDA (1992). Laboratory rearing of sardine larvae, *Sardine pilchardus* (Walb.), early effects of starvation: a preliminary experiment. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 8(1): 163-174.
- SINCLAIR, M. (1988). Marine populations. An essay on population regulation and speciation. Books in Recruitment Fishery Oceanography. Washington Sea Grant. 252 p.
- SINCLAIR, M. & T. D. ILES (1985). Atlantic herring (*Clupea harengus*) distributions in the Gulf of Maine-Scotian shelf area in relation to oceanographic features. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 880-872.
- SINCLAIR, M.; M. J. TREMBLAY & T. D. ILES (1985). El Nino events and variability in a Pacific mackerel (*Scomber japonicus*) survival index: support for Hjort's second hypothesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 602-608.
- SKJOLDAL, H. R. & W. MELLE (1989). Nekton and plankton: some comparative aspects of larval ecology and recruitment processes. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer*, 191:330-338.
- SMITH, P. E. (1985). Year-class strength and survival of 0-group clupeoids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42(s1): 69-82.

- SMITH, P. & S. RICHARDSON (1977). Standard techniques for pelagic fish egg and larva surveys. *Fao Fisheries Technical Papers*, no. 175, 100 p.
- SNEDECOR, G. & W. COCHRAN (1989) Statistical methods. Iowa State University press, Ames, Iowa, 503 p.
- SOBRAL, M. C. (1975). Contribution à l'étude du plancton et reproduction de la sardine et anchois dans la côte portuguais. *ICES, C.M. J:11*, 24 p.
- SOKAL, R. R. & F. J. ROHLF (1981). Biometry. W.H. Freeman, New-York, 573 p.
- SOLA, A.; L. MOTOS; C. FRANCO & A. L. LANZOS (1990). Seasonal occurrence of pelagic fish eggs and larvae in the Cantabrian sea (VIIIc) and Galicia (IXa) from 1987 to 1989. *ICES, C.M. H:25*, 38 p.
- SOUTAR, A. & J. D. ISAACS (1974). Abundance of pelagic fish during the 19 th and 20 th centuries as recorded in anaerobic sediment off the California. *Fish. Bull.*, 72(2): 257-273.
- St. JOHN, M. A. & T. LUND (1996). Lipid biomarkers: linking the utilisation of frontal plankton biomass to enhanced condition of juvenile North Sea cod. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 75-85.
- STEINHART, M. & R. ECKMANN (1992). Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.*, 40: 791-799.
- STIRLING, H. P. (1976). Effects of experimental feeding on the proximate composition of European Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mar. Biol.*, 34: 85-91.
- STRUSSMANN, C. A. & F. TAKASHIMA (1990). Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejrrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish. Biol.*, 36: 59-65.
- STRUSSMANN, C. A. & F. TAKASHIMA (1992). Larval growth and point-of-no-return in fish. *Océanis*, 18 (1):27-39.
- SUNDBY, S. (1996). Turbulence-induced contact rates in plankton: the issue of scales. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 305-307.
- SUNDBY, S. & P. FOSSUM (1990). Feeding conditions of Arcto-Norwegian cod larvae compared with the Rothschild-Osborn theory on small-scale turbulence and plankton contact rates. *J. Plankton Res.*, 12: 1153-1162.

- SUTCLIFFE, W. R. Jr. (1972). Some relations of land drainage, nutrients, particulate material and fish catch in the two eastern Canadian bays. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 29: 357-362.
- SUTCLIFFE, W. H., Jr. (1973). Correlation between seasonal river discharge and local landings of American lobster (*Homarus americanus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in the Gulf of St. Lawrence. *J. Fish. Res. Board Can.*, 30: 856-859.
- SUTHERS, I.M. (1992). The use of condition indices in larval fish. *Bureau of Rural Resources Proceedings*, 15:49-55.
- SUTHERS, I. M.; A. FRASER & K. T. FRANK (1992). Comparison of lipid, otolith and morphometric condition indices of pelagic juvenile cod *Gadus morhua* from the Canadian Atlantic. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, 84:31-40.
- SUTHERS, I. M. & S. SUNDBY (1993). Dispersal and growth of pelagic juvenile Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*), inferred from otolith microstructure and water temperature. *ICES, J. mar. Sci.*, 50:261-270.
- TABACHNICK, B. & L. FIDELL (1989). Using multivariate statistics. Harper Collins Publishers, New York, 747 p.
- TANASICHUK, R.W. & D. M. WARE (1987). Influence of interannual variations in winter sea temperature on fecundity and egg size in Pacific herring. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44:1485-1495.
- TARGGART, C. T. & W. C. LEGGETT (1987). Short-term mortality in post-emergent larval capelin *Mallotus villosus*. II. Importance of food and predator density, and density-dependence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 41:219-229.
- THEILACKER, G. H.(1978). Effect of starvation on the histological and morphological characteristic of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Fish. Bull.*, 6(2): 403-413.
- THEILACKER, G. H. (1980a.). Rearing container size affects morphology and nutritional condition of larvae jack mackerel (*Trachurus symmetricus*). *Fish. Bull.*, 78(3): 789-792.

- THEILACKER, G.(1980b). Changes in body measurements of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other fishes due to handling and preservation. *Fish. Bull.*, 78(3): 685-692.
- THEILACKER,G. H. (1981). Effect of feeding history and egg size on the morphology of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.*, 178: 432-444.
- THEILACKER, G. H. (1986). Starvation induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fish. Bull.*, 84(1): 1-17.
- THEILACKER,G. H. & R. LASKER (1974). Laboratory studies of predation by euphausiid shrimps on fish larvae. *In: The early life history of fish*. J. H. S. Blaxter, (ed.). Berlin,Heidel, Springer-Verlag.
- THEILACKER, G.H.; A. S. KIMBALL & J. S. TRIMMER (1986). Use of an ELISPOT immunoassay to detect euphausiid predation on larval anchovy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 30: 127-131.
- THEILACKER, G. H. & Y. WATANABLE (1989). Midgut cell height defines nutritional status of laboratory raised larval northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.*, 87(3): 457-470.
- THEILACKER, G. H. & S. M. PORTER (1995). Condition of larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma* in the western Gulf of Alaska and shrinkage indices. *Fish. Bull. U.S.*, 93: 333-344.
- TOCHER, D. R.(1985). Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Lipids*, 20(2): 84-89.
- TOWNSEND, D. W.; R. L. RADTKE; M. A. MORRISON & S. D. FOLSON (1990). Recruitment implications of larval herring overwintering distributions in Gulf of Maine inferred using a new otolith technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 55:1-13.
- TROADEC, J. P. (1978). La pêche et la evaluation des stocks. *In: Les modeles d' evaluation des stocks halieutiques*. FAO, circulaires des pêches, 701: 3-11.
- TZENG, W. N. & S. Y.- YU (1989). Validation of daily growth increments in otolith of milkfish larvae by oxytetracycline labelling. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 118: 168-174.

- UEBERSCHAR, B. F. R. (1987). A highly sensitive method for the determination of proteolytic enzyme activities in individual marine fish larvae. *ICES, C.M. Biol. Oceanog. Committee*, 7p.
- UEBERSCHAR, B. F. R. (1988). A highly sensitive method for the determination of proteolytic enzyme activities in individual marine fish larvae. *Meeresforsch*, 32: 144-154.
- UEBERSCHAR, B. F. R. (1993). Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. *In: Physiological and biochemical aspects of fish development*, pp. 233-239. Walther & Fyhn (eds) University of Bergen, Noruega.
- UEBERSCHAR, B. F. R. & C. CLEMMESSEN (1992). A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods- tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES J.mar.Sci.*, 49: 245-249.
- UITTO, A. (1996). Summertime herbivory of coastal mesozooplankton and metazoan microplankton in the northern Baltic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 132: 47-56.
- VEER, H. (1985). Impact of coelenterate predation on larval plaice, *Pleuronectes platessa* and flounder, *Platichthys flesus* stock in the western Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25: 229-238.
- VEER, H. (1986). Immigration, settlement and density-dependent mortality of a larval and early postlarval 0-group plaice (*Pleuronectes platessa*) population in the western Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 29: 223-236.
- VILELA, M. H. & J. J. ZIJLSTRA (1971). On the condition of herring larvae in the central and southern North Sea. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Perm. int. Explor. Mer.*, 160: 137-141.
- WALFORD, L. A. (1938). Effect of currents on distribution and survival of the eggs and larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) on Georges bank. *Fish. Bull.*, 29: 1-71.
- WARE, D. M. (1975). Relation between egg size, growth and natural mortality of larval fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 2503-2512.

- WERNER, R. G. & J. H. S. BLAXTER (1980). Growth and survival of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to prey density. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1063-1069.
- WERTERMAN, M. & G. HOLT (1988). The RNA/DNA ratio measurement of nucleic acid in larval *Sciaenops ocellatus*. *Cont. mar. Sci.*, 30 (suppl.):117-124.
- WESTERNHAGEN, H. v. (1988). Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae. In: W. S. Hoar & D. J. Randall (eds) *Fish Physiology*, vol. 11A, Academic Press, London, 253-346.
- WESTERNHAGEN, H. v. & H. ROSENTHAL (1981). On condition factor measurements in Pacific herring larvae. *Helgolander Meeresunters*, 34: 257-262.
- WIBORG, K. F. (1976). Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. *J. Cons. int. Explor. Mer*, 37(1): 111.
- WILDER, L. & V. STANLEY (1983). RNA-DNA ratio as an index to growth in salmonid fish in the laboratory and in streams contaminated by carboxyl. *Journal of Fish Biology*, 22: 165-172.
- WOOSTER, W.S.; A. BAKUN & D. L. MCLAIN (1976). The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the north Atlantic. *J. Mar. Res*, 34:131-141.
- WRIGHT, D. A. & E. HETZEL (1985). Use of RNA:DNA ratios as an indicator of nutritional stress in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25: 199-206.
- WRIGHT, D. A. & F. D. MARTINS (1985). The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Fish. Biol.*, 27: 479-485.
- WROBLEWSKI, J. S.; J. G. RICHMAN & G. L. MELLOR (1989). Optimal wind conditions for the survival of larval northern, *Engraulis mordax*: a modelling investigation. *Fish. Bull.*, 87(3): 387-398.
- WYATT, T.(1974). The feeding of plaice and sand-eel larvae in the southern bight in relation to the distribution of their food organisms. In: *The early life history of fish*. pp.245-251, J. H. S. Blaxter (ed.). Berlin,Heidel, Springer-Verlag.
- WYATT, T. (1985). Distribution of European sardine SARP Seminar SARP. Seminar October 1985. ICES, Vigo, Spain 12 p.

- YAMAZAKI, Y. (1996). Turbulence problems for planktonic organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 304-305.
- YIN, M. C. & J. H. S. BLAXTER (1986). Morphological changes during growth and starvation of larval cod (*Gadus morhua*) and flounder (*Platichthys flesus*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 104: 215-228.
- YIN, M. C. & J. H. S. BLAXTER (1987). Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 105: 73-83.
- YOUNG, V. R. (1970). The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. *In: Mammalian protein metabolism*, pp. 585-674. H.H. Munro (ed.) Academic Press. London.
- ZAR, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, 718 p.
- ZEITOUN, I. H.; D. E. ULLREY; W. G. BERGEN & W. T. MAGEE (1977). DNA, RNA, protein, and free aminoacids during ontogenesis of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fis. Res. Board Can.*, 34:83-88.
- ZWEIFEL, J. & R. LASKER (1976). Prehatch and posthatch growth of fishes. A model. *Fish. Bull. U. S.*, 74: 609-621.

ANEXO I

Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos aos índices bioquímicos nas larvas provenientes da experiência de validação

Tabela 1 - Médias dos índices bioquímicos analisados nas larvas da experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 µm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm).

\bar{x}	RNA/l	RNA/mg	DNA/l	DNA/mg	Pins/l	Pins/DNA	RNA/Pins	RNA/DNA
C1	6.778	190.39	2.241	61.395	76.528	33.676	227.619	3.049
S1	2.685	121.12	2.352	109.179	74.447	31.843	67.599	1.145
C6	10.261	46.247	3.399	15.399	81.144	24.403	143.697	3.058
S6	3.687	62.853	2.743	46.979	76.293	27.611	67.303	1.355
N	9.255	53.662	2.953	17.279	77.767	26.344	161.839	3.12

Tabela 2- Desvios padrões dos índices bioquímicos analisados nas larvas da experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 µm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm).

s	RNA/l	RNA/mg	DNA/l	DNA/mg	Pins/l	Pins/DNA	RNA/Pins	RNA/DNA
C1	1.001	72.675	.166	19.058	47.459	20.03	341.548	.552
S1	.826	35.550	.116	26.018	57.244	24.492	67.639	.354
C6	1.852	15.046	.379	4.769	25.941	8.885	69.685	.643
S6	.740	16.044	.251	10.618	41.77	13.703	58.713	.298
N	1.205	14.459	.505	5.770	44.078	13.013	128.087	.641

Tabela 3 - Coeficiente de variação (%) dos índices bioquímicos analisados nas larvas da experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 µm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm).

Vx	RNA/l	RNA/mg	DNA/l	DNA/mg	Pins/l	Pins/DNA	RNA/Pins	RNA/DNA
C1	30.749	38.172	7.414	31.042	62.015	59.477	150.052	18.110
S1	14.775	29.351	4.926	23.830	76.892	76.915	100.059	30.924
C6	18.055	32.533	11.155	30.971	31.968	36.410	48.495	21.018
S6	20.059	25.526	9.151	22.601	54.749	49.629	87.237	21.950
N	13.022	26.945	17.113	33.396	56.679	49.398	79.144	20.037

Tabela 4 - Resultados da análise de variância aplicada aos índices bioquímicos da experiência de validação

	MS efeito	MS erro	F(df _x ,y): 4,45	p
DNA/larva	2.2	.1	21.843	.000
DNA/mg	14772.6	241.8	61.098	.000
RNA/larva	110.7	1.4	77.761	.000
RNA/mg	37252.2	1447.7	25.732	.000
RNA/DNA	10.4	.3	38.671	.000
Pins/larva	61.8	1977.9	.031	.998
Pins/DNA	149.5	287.4	.520	.721
RNA/Pins	46226.0	29187.9	1.584	.195

Tabela 5 - Probabilidades do teste *Post hoc* Tukey (HSD) para a variável DNA/l na experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 µm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm).

	C1	S1	C6	S6	N
C1		.933	.000	.008	.000
S1	.933		.000	.061	.001
C6	.000	.000		.000	.023
S6	.008	.061	.000		.582
N	.000	.001	.023	.582	

Tabela 6 - Probabilidades do teste *Post hoc* Tukey (HSD) para a variável DNA/mg na experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 µm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 µm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 µm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 µm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 µm).

	C1	S1	C6	S6	N
C1		.000	.000	.249	.000
S1	.000		.000	.000	.000
C6	.000	.000		.001	.998
S6	.249	.000	.000		.001
N	.000	.000	.998	.001	

Tabela 7 - Probabilidades do teste *Post hoc* Tukey (HSD) para a variável RNA/I na experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 μm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 μm).

	C1	S1	C6	S6	N
C1		.000	.000	.000	.000
S1	.000		.000	.344	.000
C6	.000	.000		.001	.399
S6	.000	.344	.000		.000
N	.000	.000	.399	.000	

Tabela 8 - Probabilidades do teste *Post hoc* Tukey (HSD) para a variável RNA/mg na experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 μm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 μm).

	C1	S1	C6	S6	N
C1		.002	.000	.000	.000
S1	.002		.001	.011	.002
C6	.000	.001		.865	.992
S6	.000	.011	.865		.983
N	.000	.002	.992	.983	

Tabela 9 - Probabilidades do teste *Post hoc* Tukey (HSD) para a variável RNA/DNA na experiência de validação (C1- câmara com rede de 10 μm e com alimento, S1- câmara com rede de 10 μm e sem alimento, C6- câmara com rede de 60 μm e com alimento, S6- câmara com rede de 60 μm e sem alimento, N- câmara com rede de 500 μm).

	C1	S1	C6	S6	N
C1		.000	1.000	.000	.966
S1	.000		.000	.893	.000
C6	1.000	.000		.000	.973
S6	.000	.893	.000		.000
N	.967	.000	.973	.000	

ANEXO II

Coordenadas das estações amostradas na costa algarvia e espanhola

Tabela 1- Coordenadas e profundidade das estações amostradas na costa algarvia.

ESTAÇÕES	LATITUDE	LONGITUDE	PROFUNDIDADE
G1	37° 07,5'	007° 27,8'	18 m
G2	37° 06,4'	007° 28,7'	22 m
G3	37° 05,4'	007° 28,6'	34 m
G4	37° 04,2'	007° 28,1'	50 m
G5	37° 02,6'	007° 28,9'	79 m
G6	36° 56,1'	007° 29,6'	250 m
R1	36° 59,5'	007° 46,9'	34 m
R2	36° 58,5'	007° 46,9'	73 m
R3	36° 57,5'	007° 46,9'	84 m
R4	36° 56,2'	007° 46,6'	121 m
R5	36° 54,7'	007° 46,5'	283 m
R6	36° 53,9'	007° 51,1'	203 m
A1	37° 01,7'	008° 17,7'	24 m
A2	37° 00,6'	008° 17,9'	37 m
A3	36° 59,7'	008° 17,8'	46 m
A4	36° 58,7'	008° 17,8'	54 m
A5	36° 56,4'	008° 17,8'	80 m
A6	36° 48,5'	008° 17,8'	254 m
S1	37° 02,6'	008 50,5'	23 m
S2	37° 01,6'	008 50,3'	53 m
S3	37° 00,6'	008° 50,3'	55 m
S4	36° 59,6'	008° 50,3'	72 m
S5	36° 51,5'	008° 50,3'	261 m
TC1	37° 00,6'	008° 50,4'	57 m
TC2	37° 04,0'	008° 39,6'	35 m
TC3	37° 03,2'	008° 26,2'	32 m
TC4	37° 02,4'	008° 13,5'	26 m
TC5	37° 00,9'	008° 04,6'	20 m
TC6	36° 56,8'	007° 57,3'	29 m
TC7	36° 57,5'	007° 52,0'	12 m
TC8	37° 00,6'	007° 43,5'	38 m

Tabela 2- Coordenadas das estações amostradas na costa espanhola em Maio de 1991 .

ESTAÇÕES	LATITUDE	LONGITUDE	ÁREA
E2	43° 60,5'	005° 70,8'	2
E4	43° 90,4'	005° 70,7'	2
E5	44° 05,4'	005° 70,6'	2
E6	44° 14,2'	006° 28,1'	2
E8	43° 82,6'	006° 28,9'	2
E19	43° 56,1'	007° 29,6'	2
E30	43° 59,5'	008° 76,9'	3
E31	43° 68,5'	008° 86,9'	3
E33	43° 45,5'	008° 46,9'	3
E35	43° 86,2'	008° 66,6'	3
E41	43° 14,7'	009° 90,5'	3
E42	43° 00,9'	009° 61,1'	3

Tabela 3- Coordenadas das estações amostradas na costa espanhola em Março e Abril de 1992.

ESTAÇÕES	LATITUDE	LONGITUDE	ÁREA	MÊS
E5	43° 60,5'	003° 14,8'	1	Março
E19	43° 45,4'	004° 70,7'	1	Março
E47	43° 89,1'	007° 10,6'	2	Março
E6	43° 62,0'	002° 38,1'	1	Abril
E8	43° 32,6'	002° 20,9'	1	Abril
E31	43° 59,5'	004° 16,9'	1	Abril
E34	43° 60,5'	004° 66,9'	1	Abril
E42	43° 65,5'	006° 26,9'	2	Abril

Tabela 4- Coordenadas das estações amostradas na costa espanhola em Maio de 1992.

ESTAÇÕES	LATITUDE	LONGITUDE	ÁREA
E2	44° 04,7'	001° 42,2'	1
E4	44° 04,8'	002° 13,1'	1
E7	43° 43,0'	001° 44,8'	1
E9	43° 29,7'	001° 52,8'	1
E10	43° 35,5'	001° 54,3'	1
E11	43° 42,6'	001° 57,2'	1
E12	43° 35,0'	002° 10,0'	1
E13	43° 28,0'	002° 10,0'	1
E18	43° 35,0'	002° 41,0'	1
E23	43° 34,0'	003° 09,2'	1
E26	43° 40,3'	003° 39,6'	1
E36	43° 51,8'	005° 08,3'	2
E37	43° 49,7'	005° 09,7'	2
E40	43° 39,9'	005° 39,5'	2
E41	43° 47,1'	005° 38,5'	2
E43	43° 52,0'	006° 09,9'	2
E46	43° 36,4'	006° 09,9'	2
E47	43° 36,7'	006° 39,8'	2
E48	43° 44,0'	006° 40,2'	2
E49	43° 52,4'	006° 40,2'	2
E50	44° 01,7'	006° 38,0'	2
E51	44° 08,0'	006° 40,1'	2
E52	43° 60,0'	007° 05,0'	2
E55	43° 52,2'	007° 04,9'	2
E56	43° 45,0'	007° 04,1'	2
E57	43° 38,3'	007° 05,0'	2
E60	43° 38,9'	006° 40,0'	2
E71	43° 50,1'	008° 08,9'	3
E72	43° 44,0'	008° 04,7'	3
E74	43° 38,3'	008° 30,0'	3
E79	43° 38,3'	008° 48,7'	3
E80	43° 22,1'	008° 57,8'	3
E84	43° 19,0'	009° 20,9'	3
E85	43° 15,2'	009° 12,9'	3

Tabela 5- Coordenadas das estações amostradas na costa espanhola em Junho de 1992.

ESTAÇÕES	LATITUDE	LONGITUDE	ÁREA
E5	43° 26,6'	003° 11,0'	1
E21	43° 51,5'	004° 10,4'	1
E23	43° 36,5'	004° 10,7'	1
E24	43° 28,2'	004° 10,4'	1
E31	43° 48,4'	005° 10,9'	2
E32	43° 55,9'	005° 11,6'	2
E34	43° 56,5'	005° 39,4'	2
E50	43° 16,4'	007° 03,9'	2
E62	43° 34,5'	008° 24,3'	3

ANEXO III

Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos aos comprimento, índices bioquímicos obtidos para as larvas de sardinha recolhidas na costa algarvia e parâmetros ambientais acompanhantes

Tabela 1- Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos nos vários dias de recolha em Dezembro de 1991.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/mg	µgRNA/larva	RNA/mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Taxa Crescim	n
20/12/91	6.926	1.512	48.059	7.327	223.413	5.277	113.188	3953.93	72.125	83.025	20.835	30
23/12/91	7.722	1.885	38.423	8.032	169.216	4.599	113.935	2418.12	82.862	38.423	17.6148	39
27/12/91	11.182	1.345	7.066	6.368	44.585	5.369	149.629	1292.04	52.423	7.066	19.898	14
29/12/91	13.5	1.759	3.871	8.018	18.144	4.746	521.307	1187.44	20.818	3.871	18.315	13

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/mg	µgRNA/larva	RNA/mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Taxa Crescim	n
20/12/91	1.107	.451	33.424	1.698	118.029	1.98	35.705	3961.90	33.139	40.12	9.405	30
23/12/91	1.21	.505	26.37	1.765	119.659	1.809	34.06	1830.43	58.482	26.37	8.592	39
27/12/91	2.857	.653	6.297	3.369	72.428	2.621	85.421	2449.49	41.914	6.298	12.789	14
29/12/91	1.958	.465	1.555	1.578	8.155	1.161	256.538	842.409	13.963	1.555	5.515	13

Tabela 2 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos nas diferentes estações realizadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/mg	µgRNA/larva	RNA/mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Tx. Cres	n
G2	11.739	5.793	28.609	14.444	67.520	2.253	255.098	1422.60	120.042	75.773	7.521	20
G3	10.257	4.972	30.893	11.252	70.640	2.27	200.595	1225.72	134.061	40.921	7.434	22
R1	8.285	2.773	32.039	7.784	82	2.907	31.2199	431.844	249.138	11.271	11.28	24
A1	10.855	2.801	12.89	11.56	57.042	4.525	83.019	378.590	265.147	31.683	18.27	36
A2	11.524	4.308	16.178	17.303	70.184	4.654	92.462	295.832	381.933	20.472	20.27	69
A3	11.86	3.317	11.722	14.431	62.178	5.1815	75.768	280.489	279.805	24.399	21.08	57
A4	10.548	3.279	16.796	12.741	69.522	4.244	120.041	704.822	148.696	50.594	16.99	22
A5	9.533	1.895	15.287	10.334	82.883	5.4199	57.610	439.680	202.711	29.936	22.79	17
A6	9.4564	1.355	12.889	7.158	68.487	5.5523	50.377	363.098	197.717	40.202	23.35	11
S1	10.4	5.145	37.933	13.273	81.667	2.8359	63.333	122.350	254.333	12.523	12.26	24
TC2	10.069	3.743	38.958	13.129	138.438	3.982	24.45	122.370	668.634	5.792	14.41	27
TC3	12.088	5.334	16.12	13.869	44.713	2.927	41.655	113.826	686.343	7.812	9.984	16
TC4	11.399	2.87	15.697	11.798	65.896	4.657	83.932	381.390	250.489	33.148	18.72	34
TC5	11.857	6.606	38.438	19.482	143.489	3.734	46.9	215.284	784.924	9.455	14.71	17
TC6	12.275	5.723	16.853	22.322	72.033	3.957	56.604	162.478	439.311	9.853	15.96	5
TC7	10.104	4.567	41.387	13.093	109.171	2.803	28.615	262.244	767.265	9.373	11.09	10
TC8	9.018	4.226	40.195	10.947	102.698	2.568	17.610	150.904	450.679	3.773	10.29	6

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/mg	µgRNA/larva	RNA/mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Tx. Cres	n
G2	4.495	4.348	25.823	14.416	67.266	.529	279.051	1714.07	131.226	106.75	2.552	20
G3	1.54	2.009	13.157	4.593	30.983	.229	167.542	1034.88	190.909	28.466	1.086	22
R1	.403	.134	.677	.62	1.414	.222	.3294	2.469	17.3507	4.25	8.492	24
A1	2.311	1.791	6.838	5.854	28.608	1.004	86.0148	423.956	268.864	30.223	4.710	36
A2	2.594	2.963	9.694	11.76	46.519	2.134	139.213	266.739	305.530	25.213	12.91	69
A3	2.566	1.676	6.057	6.922	37.953	2.155	53.803	270.328	197.827	14.07	10.14	57
A4	1.46	1.653	7	4.703	34.731	1.073	69.358	601.014	105.169	52.43	5.069	22
A5	1.526	.605	5.124	3.668	29.478	.577	23.891	157.761	86.4890	8.58	2.660	17
A6	1.561	.338	7.017	.944	40.563	1.439	25.704	69.213	144.024	30.93	6.836	11
S1	1.552	.287	.404	1.122	4.726	.367	3.512	2.325	14.8436	.844	1.192	24
TC2	3.371	2.296	42.439	9.718	219.92	2.995	30.921	117.526	567.772	4.36	14.23	27
TC3	1.2167	2.749	7.314	5.004	21.845	1.092	37.708	97.038	731.697	5.892	5.384	16
TC4	2.42	1.391	16.623	6.305	65.501	2.716	53.023	401.55	289.629	28.965	12.90	34
TC5	3.252	3.17	67.075	10.638	240.914	2.925	32.954	351.915	875.127	10.214	13.89	17
TC6	.827	.223	3.679	15.734	63.495	2.904	13.342	3.435	381.505	1.947	13.79	5
TC7	3.326	3.632	50.444	15.321	104.140	1.47	24.67	339.16	892.24	11.903	6.386	10
TC8	.602	1.414	12.0189	4.127	31.146	.235	15.134	129.752	93.722	2.766	1.116	6

Tabela 3 - Resultados da análise de variância aplicada ao comprimento e dados bioquímicos das larvas de sardinha obtidas nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

	MS efeito	MS erro	F(df x,y): 3,247	p
Comprimento	6.	6.8	.875	.455
µg DNA/larva	50.	6.2	8.14	.000
DNA/mg	3237.	123.1	26.292	.000
µg RNA/larva	39.	80.6	.486	.692
RNA/mg	407.	1723.4	.236	.871
RNA/DNA	77.	2.7	28.99	.000
µg Pins/larva	242121.	16696.7	14.501	.000
Pins/mg	1057157	468592.2	22.561	.000
RNA/Pins	273011.	53783.2	5.076	.002
Pins/DNA	11451.	1959.8	5.843	.001
Taxa de crescimento	1798.	77.1	23.307	.000

Tabela 4 - Resultados da análise de variância aplicada aos dados bioquímicos e comprimento das larvas de sardinha obtidas nas estações realizados paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992

	MS efeito	MS erro	F(dfx,y):6, 86	p
Comprimento	11.8	7.5	1.561	.168
µg DNA/larva	27.2	5.5	4.967	.000
DNA/mg	2115.6	1417.1	1.493	.190
µg RNA/larva	126.5	76.6	1.651	.143
RNA/mg	23202.5	23971.5	.968	.452
RNA/DNA	7.2	6.7	1.08	.380
µg Pins/larva	9719.7	1641.9	5.92	.000
Pins/mg	200104.5	87055.9	2.299	.042
RNA/Pins	744426.2	354129.3	2.102	.061
Pins/DNA	2312.6	326.8	7.076	.000
Taxa de crescimento	152.892	150.14	1.018	0.419

Tabela 5 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados bioquímicos e comprimento obtidos em Dezembro de 1991.

	H(3,n=85)	p
Comprimento	46.842	.000
µg DNA/larva	13.388	.004
DNA/mg	47.831	.000
µg RNA/larva	13.814	.003
RNA/mg	45.47	.000
RNA/DNA	1.673	.643
µg Pins/larva	25.061	.000
Pins/mg	29.389	.000
RNA/Pins	30.91	.000
Pins/DNA	60.37	.000
Taxa de crescimento	1.673	0.64

Tabela 6- Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores do índice DNA/larva nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A- Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.711	.001	.999
R {2}	.711		.995	.776
A {3}	.001	.995		.824
S {4}	.999	.776	.824	

Tabela 7- Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores do índice DNA/mg nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A - Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.996	.000	.797
R {2}	.996		.389	.952
A {3}	.000	.389		.048
S {4}	.797	.952	.048	

Tabela 8 - Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores do índice RNA/DNA nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A- Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.979	.000	.973
R {2}	.979		.661	1.000
A {3}	.000	.661		.464
S {4}	.973	1.000	.464	

Tabela 9 - Probabilidades do teste Post Hoc Tukey relativos aos valores do índice Pins/larva nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A- Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.412	.000	.388
R {2}	.412		.972	.995
A {3}	.000	.972		.995
S {4}	.388	.995	.995	

Tabela 10 - Probabilidades do teste Post Hoc Tukey relativos aos valores do índice RNA/Pins nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A- Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.952	.013	.906
R {2}	.952		.999	1.000
A {3}	.013	.999		.999
S {4}	.906	1.000	.999	

Tabela 11 - Probabilidades do teste Post Hoc Tukey relativos aos valores do índice Pins/DNA nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A- Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.689	.010	.554
R {2}	.689		.975	1.000
A {3}	.010	.975		.964
S {4}	.554	1.000	.964	

Tabela 12 - Resultados da análise de variância aplicada aos dados das variáveis ambientais obtidas nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

	MS efeito	MS erro	F(dfx,y) 3,14	p
Temperatura	2.2	.01	7.673	.003
Profundidade	216.1	264.1	.818	.505
Vel.Vento	3.1	.03	3.531	.043
Turbulência	.02	.01	3.168	.058
Presas	1210675328	883263104	1.371	.292
Nauplii	532890400	526721088	1.012	.417
Predadores	54515152	22829278	2.388	.113
Quetogntas	702034	73907	9.499	.001

Tabela 13 - Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores da temperatura nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A - Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.999	.293	.006
R {2}	.999		.573	.008
A {3}	.293	.573		.092
S {4}	.006	.008	.092	

Tabela 14 - Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores da velocidade do vento nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A - Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.237	.050	.693
R {2}	.237		.995	.812
A {3}	.050	.995		.682
S {4}	.693	.812	.682	

Tabela 15 - Probabilidades do teste *Post Hoc* Tukey relativos aos valores da densidade de quetognatas nos vários transectos (G- Guadiana, R- Ria, A - Albufeira e S- Sagres)

	{1}	{2}	{3}	{4}
G {1}		.998	.005	1.000
R {2}	.998		.041	.994
A {3}	.005	.041		.026
S {4}	1.000	.994	.026	

ANEXO IV

Correlações entre os vários parâmetros analisados na costa algarvia

Tabela 1 - Correlações de Spearman com correcção de Bonferroni entre vários parâmetros analisados na costa algarvia (*- p<0.1;**- p<0.05)

	Tempe- ratura	Vento	Turbu- lência	Compri- mento	Presas	Nauplii	Preda- dores	Queto- gnatas	DNA/ larva	DNA/mg	RNA/ larva	RNA/mg	Pins/ larva	Pins/ mg	RNA/ DNA	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx. cresc	Cabe- ça	Peito- ral	O/C	O/P
Tempe- ratura	1.000	-.252	-.177	-.072	-.568	-.008	-.615*	-.009	.309	.344	-.226	.195	-.009	.257	-.310	-.034	-.048	-.192	-.159	.141	.502*	.171
Vento	-.252	1.000	.550*	-.135	.010	.246	.478*	.587*	-.708	-.349	-.027	.155	-.349	-.261	.773**	-.101	.334	.773**	-.117	-.380	-.027	.263
Turbu- lência	-.177	.550	1.000	-.075	.053	.321	.139	.144	-.316	.013	-.024	.201	-.292	-.188	.254	.119	.097	.240	-.192	-.387	.250	.331
Com- pimento	-.072	-.135	-.075	1.000	.118	.198	.348	.032	.482*	-.447	.724	-.445	.286	-.212	.160	-.057	.257	.199	.327	.490*	-.253	-.519*
Presas	-.568	.010	.053	.118	1.000	.514*	.444	.374	-.170	-.433	.057	-.448	.413	.161	.186	-.092	.299	.155	.347	.023	-.409	.021
Naupli	-.008	.246	.321	.198	.514*	1.000	.288	.813*	-.272	-.621*	-.005	-.411	.516*	.452	.403	-.468	.617	.436	-.031	-.075	.103	.194
Preda- dores	-.615*	.478*	.139	.348	.444	.288	1.000	.538*	-.432	-.598*	.260	-.288	.086	-.214	.664*	-.154	.501	.598*	.220	.076	-.329	-.172
Queto- gnatas	-.009	.587**	.144	.032	.374	.613*	.538*	1.000	-.604*	-.474*	-.129	-.098	.102	.117	.672**	-.356	.725	.707**	.249	-.033	-.197	.201
DNA/ larva	.309	-.708	-.316	.482*	-.170	-.272	-.432	-.604*	1.000	.304	.539*	-.042	.218	-.018	-.585*	.265	-.397	-.534*	-.007	.370	.183	-.381
DNA/ mg	.344	-.349	.013	-.447	-.433	-.621*	-.598*	-.474*	.304	1.000	-.199	.732*	-.488*	-.183	-.569	.478*	-.567*	-.567*	-.075	-.103	.238	.123
RNA/ larva	-.226	-.027	-.024	.724*	.057	-.005	.260	-.129	.539*	-.199	1.000	-.023	.039	-.425	.285	.295	-.173	.295	-.062	.035	.050	-.252
RNA/ mg	.195	.155	.201	-.445	-.448	-.411	-.288	-.096	-.042	.732*	-.023	1.000	-.649	-.342	.071	.342	-.366	.071	-.358	-.543	.313	.461
Pins/ larva	-.009	-.349	-.292	.286	.413	.516*	.086	.102	.218	-.488*	.039	-.649	1.000	.818	-.162	-.631*	.529	-.152	-.030	.234	-.135	-.323
Pins/ mg	.257	-.261	-.188	-.212	.161	.452	-.214	.117	-.018	-.183	-.425	-.342	.818*	1.000	-.273	-.690*	.505	-.265	-.228	-.003	.067	-.022
RNA/ DNA	-.310	.773**	.254	.160	.186	.403	.664**	.672**	-.585*	-.569	.285	.071	-.162	-.273	1.000	-.100	.395	.983**	-.133	-.428	-.051	.342
RNA/ Pins	-.034	-.101	.119	-.057	-.092	-.468	-.154	-.356	.265	.478*	.295	.342	-.631*	-.690	-.100	1.000	-.717	-.127	.086	-.093	.207	.158
DNA/ Pins	-.048	.334	.097	.257	.299	.617	.501	.725	-.397	-.567*	-.173	-.366	.529*	.505	.395	-.717*	1.000	.399	.232	.155	-.387	-.160
Tx. cresc	-.192	.773**	.240	.199	.155	.436	.598**	.707**	-.534	-.567	.295	.071	-.152	-.265	.983**	-.127	.399	1.000	-.115	-.377	-.015	.342
Cabe- ça	-.159	-.117	-.192	.327	.347	-.031	.220	.249	-.007	-.075	-.062	-.358	-.030	-.228	-.133	.086	.232	-.115	1.000	.733	-.734*	-.496*
Peito- ral	.141	-.380	-.387	.490*	.023	-.075	.076	-.033	.370	-.103	.035	-.643*	.234	-.003	-.428	-.093	.155	-.377	.733*	1.000	-.385	-.795*
O/C	.502*	-.027	.250	-.253	-.409	.103	-.329	-.197	.183	.238	.050	.313	-.135	.067	-.051	.207	-.387	-.015	-.734*	-.385	1.000	.505*
O/P	.171	.263	.331	-.519*	.021	.194	-.172	.201	-.381	.123	-.252	.461	-.323	-.022	.342	.168	-.160	.342	-.496*	-.795	.505*	1.000

ANEXO V

Médias, desvios padrões e resultados da análise de variância relativos aos comprimentos e aos índices bioquímicos obtidos para as larvas de sardinha recolhidas na costa espanhola

Tabela 1 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos obtidos nas larvas de sardinha nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio de 1991.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/ mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E2	13.75	4.882	9.457	25.626	41.123	4.966	162.76	307.58	147.694	33.901	16.848	11
E4	12.3	5.115	15.392	16.488	46.58	3.2	85.886	229.58	221.167	16.255	8.4605	8
E5	11.818	4.739	16.217	12.08	40.048	2.626	58.627	184.84	230.546	12.064	5.7364	14
E6	11.375	3.505	15.653	12.403	45.43	3.463	75.418	321.61	162.318	23.279	9.7072	11
E8	11.955	4.149	13.252	13.591	41.713	3.36	74.734	235.34	191.701	18.202	9.2181	14
E19	12.787	6.093	15.126	24.74	52.080	3.851	67.493	165.1	344.787	12.1	11.366	10
E30	15.333	10.54	13.11	45.654	52.961	4.232	210.20	331.92	248.236	18.474	11.865	6
E31	12.25	3.444	10.582	20.740	62.077	6.063	78.623	310.55	485.095	28.339	22.245	7
E33	13.625	6.24	12.790	21.182	39.195	3.41	154.85	274.92	183.666	28.235	9.4551	11
E35	20.2	18.81	7.935	96.069	38.694	5.02	412.25	157.85	266.772	20.828	17.290	8
E41	17.428	10.48	8.059	48.19	36.043	4.602	188.92	145.44	294.121	17.854	15.828	13
E42	9.071	2.986	26.538	6.497	54.873	2.111	38.382	365.32	160.786	13.529	3.8432	10

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E2	2.712	2.403	3.59	18.13	8.574	2.071	80.347	103.91	52.545	6.728	9.834	11
E4	2.613	2.276	6.56	8.495	15.847	.5512	60.159	85.930	76.786	6.934	2.618	8
E5	1.991	1.924	5.445	4.986	10.767	.6942	33.832	52.213	73.437	3.327	3.297	14
E6	2.066	1.654	10.978	8.186	16.474	1.26	34.204	174.06	62.410	12.336	5.985	11
E8	1.929	2.029	4.608	7.063	11.088	.803	40.74	75.642	56.478	3.877	3.814	14
E19	2.58	3.814	6.938	18.547	16.869	1.102	35.736	66.908	133.73	5.181	5.235	10
E30	2.082	3.282	3.221	18.462	3.867	.717	131.68	228.09	74.506	7.186	3.132	6
E31	3.202	2.0230	4.668	11.446	26.104	.574	60.725	232.99	625.27	16.775	2.727	7
E33	1.866	2.18	4.988	9.768	9.83	1.137	164.638	181.47	77.332	35.743	5.399	11
E35	2.95	7.155	1.718	39.529	7.125	.459	278.684	36.953	96.084	7.648	2.18	8
E41	1.018	1.319	2.034	6.61	8.017	.39	80.794	69.239	116.59	7.092	1.77	13
E42	1.902	1.855	6.038	4.341	18.567	.457	19.449	126.39	42.907	2.545	2.171	10

Tabela 2 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos obtidos nas larvas de sardinha nas diferentes estações realizadas na costa espanhola em Março de 1992.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E5	17.7	15.877	11.479	43.212	30.104	2.799	244.392	192.557	183.402	16.51	6.46	10
E19	11.3	5.389	20.565	14.367	59.818	3.110	142.784	653.936	123.499	30.468	8.21	10
E47	15.2	7.103	9.342	40.268	48.742	5.538	134.274	174.276	317.924	18.751	19.8	10

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E5	2.541	5.617	3.45	19.959	13.674	1.058	87.374	108.958	61.278	7.096	5.02	10
E19	1.338	3.008	5.157	4.392	20.997	1.165	77.213	535.737	64.238	18.032	5.53	10
E47	1.814	1.686	2.568	14.415	7.962	1.043	56.431	72.208	116.973	5.332	5.21	10

Tabela 3 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos nas larvas de sardinha nas diferentes estações realizadas na costa espanhola em Abril de 1992.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E6	9.4	3.102	29.072	7.927	59.887	2.56	71.922	683.535	107.523	25.111	5.63	10
E31	9.85	3.698	27.193	9.891	73.481	2.79	55.177	520.299	193.461	17.179	6.42	20
E34	12.2	5.206	15.997	14.414	40.981	2.719	110.118	336.421	131.866	21.498	6.08	10
E42	16.7	10.977	10.8	44.801	39.198	4.005	257.294	231.679	186.933	22.42	12.1	10
E51	14.1	7.471	13.089	31.814	50.311	4.309	111.804	235.808	309.067	17.581	13.9	10

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx Cres	n
E6	1.506	.976	17.23	4.328	15.101	1.096	9.624	340.3	50.85	7.432	2.52	10
E31	1.893	1.711	15.128	3.788	41.55	.53	20.316	492.267	86.017	7.146	4.59	20
E34	1.317	1.168	5.094	5.282	7.275	.493	32.424	110.193	37.173	4.987	2.34	10
E42	4.029	5.402	5.883	22.485	13.317	.967	180.065	112.531	57.274	6.302	6.24	10
E51	2.183	3.174	5.854	14.387	11.914	1.3145	25.276	146.354	188.294	8.446	5.43	10

Tabela 4 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos obtidos nas larvas de sardinha nas diferentes estações realizadas na costa espanhola em Maio de 1992.

X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Tx. Cres	n
E2	10	5.042	34.152	13.877	97.257	3.139	53.071	806.761	277.085	17.382	10.4	5
E4	10.778	4.624	21.394	22.341	84.964	4.409	33.199	188.652	563.574	8.62	16.434	3
E7	4.833	.58	25.652	1.391	61.060	2.497	9.145	1284.18	216.529	47.895	7.911	5
E9	12.	4.611	15.774	18.912	52.247	4.273	80.11	446.395	232.030	26.033	16.344	4
E10	10.75	5.016	37.264	20.081	121.166	3.528	59.588	347.584	351.025	10.313	12.808	3
E11	9.5	2.658	21.247	8.457	64.394	3.191	22.088	171.503	382.843	8.334	11.205	3
E13	11	2.447	10.681	13.393	57.598	5.547	86.923	458.071	160.436	40.021	22.395	3
E18	11.7	4.447	22.854	16.199	68.874	3.513	16.449	52.595	1506.50	3.159	12.179	4
E25	12.273	3.775	9.017	10.915	27.962	3.432	84.23	230.461	124.154	32.793	12.353	16
E26	8.18	1.625	22.34	6.849	96.818	4.676	15.36	264.151	1401.90	12.963	17.7	9
E36	10.5	3.771	26.305	13.886	87.897	3.505	38.605	211.795	391.055	9.545	12.975	3
E37	11.9	5.987	21.052	16.208	53.6101	2.741	42.846	123.493	436.783	7.516	9.348	8
E40	10.167	3.7	23.761	13.270	91.91	3.878	43.425	198.201	4670.31	9.901	14.747	13
E41	10	3.437	21.901	9.437	58.970	2.755	19.719	125.642	479.540	5.765	9.415	3
E43	8.5	3.330	55.531	11.008	149.184	3.185	49.56	804.117	250.311	14.047	10.619	9
E46	12.647	8.428	20.859	25.940	49.994	2.728	66.557	182.596	349.908	8.601	8.449	20
E47	13.5	11.410	22.018	35.485	71.225	3.253	56.126	131.355	595.914	5.586	11.502	3
E48	12	4.925	15.009	13.773	40.416	2.938	44.419	130.900	471.173	9.87	9.448	22
E49	9.667	3.845	34.788	7.796	68.010	2.049	21.809	247.123	361.076	6.12	5.225	5
E50	11.25	3.616	14.779	14.048	52.76	3.874	22.567	54.413	825.727	6.62	13.892	22
E51	12.5	7.733	16.675	15.149	46.524	2.901	60.714	171.075	264.948	10.413	9.272	4
E52	10.93	3.497	15.9904	13.375	53.253	3.679	34.64	114.002	527.237	8.402	12.968	8
E55	9.75	1.967	16.874	8.587	61.987	4.209	19.6	108.089	699.886	8.775	16.322	4
E56	9.875	3.603	30.26	9.873	77.021	2.715	15.736	120.638	638.361	4.345	9.222	4
E57	10.333	2.873	20.358	9.414	46.279	2.961	84.4	431.012	143.461	23.516	10.393	5
E60	13.286	10.167	25.901	27.3623	55.275	2.457	65.846	108.898	468.637	5.885	7.999	6
E72	15	8.815	12.763	50.158	56.026	5.017	125.098	173.644	358.492	13.867	19.044	3
E74	13.6	7.176	17.666	39.332	71.419	4.772	109.216	393.088	313.958	20.387	17.877	4
E80	14.125	8.076	13.622	29.669	44.232	3.434	49.264	103.714	648.808	7.163	11.244	3
E85	17.75	12.229	8.68	57.037	39.15	4.642	115.123	82.844	503.617	9.408	16.983	3

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/Pins	Pins/DNA	Tx. Cres	n
E2	3.279	5.523	34.0016	12.662	96.64	1.15	31.4138	1414.92	250.16	10.4457	5.462	5
E4	4.147	4.439	11.2932	33.666	42.45	1.866	33.1722	145.468	207.21	4.4931	8.865	3
E7	2.041	1.131	4.0263	2.710	10.585	.674	12.4825	2492.29	114.78	90.7576	3.203	5
E9	3.984	4.509	9.1130	18.468	27.272	2.395	15.245	336.495	218.26	11.527	11.377	4
E10	5.737	4.433	28.7449	23.085	98.535	.877	67.315	271.301	78.59	2.783	4.165	3
E11	.707	.074	6.5683	1.492	7.004	.65	3.885	18.754	.22	1.6936	3.089	3
E13	1.826	.998	3.1661	5.334	14.797	.664	28.744	291.178	69.86	16.871	3.155	3
E18	3.701	2.316	24.5851	11.251	63.250	1.238	15.558	41.659	1043.37	2.202	5.88	4
E25	1.104	3.998	4.5947	7.729	12.935	1.371	29.392	17.866	63.43	15.72	6.511	16
E26	.783	.54	6.5737	.914	26.523	1.664	12.178	323.748	2693.84	17.471	7.903	9
E36	3.535	1.426	21.4916	5.9	67.705	.239	27.407	108.940	124.80	3.657	1.135	3
E37	1.853	2.481	12.6310	7.195	26.885	.716	17.126	36.709	241.26	3.057	3.399	8
E40	3.015	2.919	13.9116	11.01	82.93	1.445	57.34	96.411	18203.9	4.229	6.863	13
E41	0.0000	.215	1.3693	.473	2.956	.31	1.85	11.787	21.00	.8986	1.472	3
E43	2.369	1.676	49.8751	6.840	107.426	.958	44.522	840.690	106.61	4.831	4.549	9
E46	4.107	7.789	8.5451	30.335	12.348	.889	73.85	95.090	161.67	2.488	4.224	20
E47	4.822	8.493	11.3641	24.095	40.709	.431	34.815	96.519	88.58	1.377	2.048	3
E48	1.951	2.544	4.9186	7.565	10.062	.919	45.576	65.814	473.04	6.772	4.366	22
E49	2.517	1.378	25.6458	2.640	44.794	.422	2.722	255.429	133.27	2.039	2.002	5
E50	2.768	3.241	8.0435	15.667	35.88	1.403	30.51	21.365	333.71	6.083	6.664	22
E51	3.536	7.381	.9521	6.147	29.579	1.974	35.355	79.585	53.04	5.367	9.378	4
E52	2.36	1.895	6.0817	9.658	13.602	1.153	32.592	40.137	202.55	4.419	5.478	8
E55	2.062	.472	11.6818	3.526	25.034	.898	22.745	55.448	327.50	8.408	4.263	4
E56	2.323	1.174	21.8292	3.507	48.007	.243	5.818	66.601	83.69	.9682	1.152	4
E57	3.327	2.235	16.6175	10.263	23.037	1.173	109.534	379.709	67.15	11.153	5.572	5
E60	3.861	5.139	19.0674	18.656	30.53	.758	44.431	40.175	169.18	2.499	3.598	6
E72	5.657	6.63	7.7305	49.037	15.638	1.79	99.55	96.165	106.71	.8642	0.0000	3
E74	4.722	4.527	17.0441	29.255	57.693	1.694	49.781	433.177	191.90	11.231	8.501	4
E80	3.065	4.156	4.2863	19.963	9.726	.668	23.319	86.134	456.55	3.919	8.044	3
E85	.957	1.12	1.4179	10.479	4.070	.464	19.786	24.040	100.54	1.406	3.174	3

Tabela 5 - Médias e desvios padrões do comprimento e dos índices bioquímicos obtidos nas larvas de sardinha nas diferentes estações realizadas na costa espanhola em Junho 92.

— X	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx. Cres	n
E5	12.6	6.05	16.535	26.059	63.377	4.278	30.11	78.91	1073.11	4.874	18.69	8
E21	11	4.035	18.562	15.191	62.643	3.682	53.544	236.478	281.368	13.05	15.86	7
E23	12	6.63	22.656	29.84	81.412	4.048	82.985	326.153	341.004	13.61	17.60	9
E24	11.833	6.95	37.518	24.899	104.096	3.277	90.311	442.204	260.344	12.90	13.93	9
E31	12.5	7.37	19.799	20.019	52.281	2.752	60.824	164.181	329.698	8.503	12.18	7
E32	17.667	23.294	14.815	98.070	53.396	3.846	153.773	161.907	544.132	9.55	17.38	6
E34	11.571	6.314	23.07	14.735	50.325	2.231	76.955	326.935	190.029	13.52	9.716	10
E50	13.179	8.01	17.015	28.015	50.187	3.166	125.306	238.66	229.406	14.39	13.41	17
E62	8.625	2.584	32.494	8.252	103.416	3.263	21.401	222.62	594.06	8.26	13.12	11

S	Comprimento	µgDNA/larva	DNA/ mg	µgRNA/larva	RNA/ mg	RNA/ DNA	µgPins/larva	Pins/mg	RNA/ Pins	Pins/ DNA	Tx. Cres	n
E5	1.14	.963	5.281	10.946	12.225	1.687	14.478	41.366	643.443	2.063	8.011	8
E21	1.155	.54	5.35	6.44	8.671	1.17	16.363	53.181	71.010	2.304	5.557	7
E23	2.55	2.615	8.43	22.962	21.107	1.547	9.782	172.467	224.62	3.701	7.346	9
E24	3.817	3.383	42.126	16.947	106.755	.918	46.676	459.178	81.113	3.226	4.359	9
E31	.577	1.671	3.141	4.429	2.584	.518	10.478	20.416	55.411	1.984	2.460	7
E32	5.86	16.506	4.913	76.013	5.675	.775	66.496	156.881	327.146	6.307	3.681	6
E34	1.718	2.207	5.738	8.245	18.64	.633	9.375	183.656	96.271	4.774	3.008	10
E50	2.072	3.812	3.645	20.992	11.808	1.09	94.557	75.311	62.921	4.871	5.175	17
E62	1.847	1.175	15.224	4.181	61.812	.901	18.423	138.672	426.273	5.448	4.279	11

Tabela 6 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados obtidos entre áreas em Abril e Maio de 1991 na costa espanhola.

	H(1,n=123)	p
Comprimento	6.831	.009
µg DNA/larva	7.904	.005
DNA/mg	1.042	.307
µg RNA/larva	9.044	.003
RNA/mg	0.12	.913
RNA/DNA	4.167	.041
µg Pins/larva	6.032	.014
Pins/mg	.697	.792
RNA/Pins	.505	.477
Pins/DNA	.007	.935
Taxa de crescimento	3.999	.042

Tabela 7 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados obtidos entre áreas em Março 1992 na costa espanhola.

	H(1,n=30)	p
Comprimento	.1056	.745
µg DNA/larva	1.956	.162
DNA/mg	7.946	.005
µg RNA/larva	2.468	.116
RNA/mg	1.204	.273
RNA/DNA	16.541	.000
µg Pins/larva	3.505	.061
Pins/mg	2.468	.116
RNA/Pins	11.124	.001
Pins/DNA	.204	.651
Taxa de crescimento	15.899	.000

Tabela 8 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados obtidos entre áreas em Abril de 1992 na costa espanhola.

	H(1,n=60)	p
Comprimento	27.112	.000
µg DNA/larva	23.708	.000
DNA/mg	20.68	.000
µg RNA/larva	28.931	.000
RNA/mg	4.683	.003
RNA/DNA	21.691	.000
µg Pins/larva	21.691	.000
Pins/mg	25.536	.000
RNA/Pins	12.067	.001
Pins/DNA	7.791	.005
Taxa de crescimento	19.09	.000

Tabela 9 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados obtidos entre áreas em Maio de 1992 na costa espanhola.

	H(2,n=208)	p
Comprimento	19.555	.000
µg DNA/larva	30.437	.000
DNA/mg	9.578	.008
µg RNA/larva	23.467	.000
RNA/mg	3.781	.151
RNA/DNA	13.16	.000
µg Pins/larva	20.636	.000
Pins/mg	10.598	.005
RNA/Pins	4.878	.087
Pins/DNA	19.521	.001
Taxa de crescimento	12.988	.000

Tabela 10 - Resultados do teste Kruskal-Wallis aplicado aos dados obtidos entre áreas em Junho de 1992 na costa espanhola.

	H(2,n=84)	p
Comprimento	14.812	.001
µg DNA/larva	18.274	.000
DNA/mg	5.146	.076
µg RNA/larva	12.059	.002
RNA/mg	17.814	.000
RNA/DNA	4.947	.084
µg Pins/larva	18.45	.000
Pins/mg	.216	.898
RNA/Pins	6.36	.042
Pins/DNA	.3.641	.162
Taxa de crescimento	3.79	.088

ÍNDICE DAS TABELAS E FIGURAS

Índice das Tabelas:**CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO**

Tabela I.1 - Comparação dos principais métodos de determinação do estado nutricional em larvas de peixe.

Tabela I.2 - Estudos de ecologia do icteoplâncton na costa portuguesa e espanhola.

CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PROTEÍNAS EM LARVAS DE PEIXE

Tabela II.1 - Comparação de duas técnicas para determinação de ácidos nucleicos em larvas de peixe.

Tabela II.2 - Comparação dos procedimentos de homogeneização para posterior determinação do conteúdo em ácidos nucleicos das larvas com 18 dias e alimentadas.

CAPÍTULO III - VALIDAÇÃO DOS ÍNDICES BIOQUÍMICOS ATRAVÉS CULTIVO DE LARVAS DE *SARDINA PILCHARDUS* NA NATUREZA

Tabela III.1 - Condições resumidas da experiência de validação.

Tabela III.2 - Níveis críticos da razão RNA/DNA em diferentes espécies.

CAPÍTULO IV- CONDIÇÃO LARVAR DE *SARDINA PILCHARDUS* NA COSTA SUL DE PORTUGAL E NORTE DE ESPANHA

Tabela IV.1- Distribuição das estações amostradas na costa espanhola.

Tabela IV.2 - Descrição resumida dos amostragem efectuada e dos parâmetros analisados.

Tabela IV.3- Percentagem de ocorrência dos principais taxa de micropilâncton nas amostras recolhidas na costa algarvia.

Tabela IV.4 - Dimensões médias das presas potenciais das larvas de peixe recolhidas durante as recolhas realizadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Tabela IV.5 - Percentagem de ocorrência dos principais taxa de mesozoplâncton, considerados potenciais predadores de larvas de peixe nas amostras recolhidas na costa algarvia.

Tabela IV.6 - Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos e do comprimento.

Tabela IV.7 - Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos dos dados bióticos e abióticos.

Tabela IV.8 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: velocidade do vento, densidade de zoetognatas.

Tabela IV.9 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: velocidade do vento, densidade de zoetognatas e (zoetognatas)².

Tabela IV.10 - Sumário da regressão múltipla relativa à variável dependente RNA/DNA e às variáveis independentes: temperatura, densidade de zoetognatas e (densidade de zoetognatas)².

Tabela IV.11 - Percentagens de inanição das larvas de sardinha na costa algarvia por transecto e por classe de comprimento.

Tabela IV.12- Percentagens de inanição das larvas de sardinha na costa algarvia nas estações paralelas à costa por classe de comprimento.

Tabela IV.13- Percentagens de inanição das larvas de sardinha na costa algarvia nas estações do transecto de Albufeira por classe de comprimento.

Tabela IV.14- Valores próprios e percentagens de variância associados aos principais eixos e que resultam da análise por componentes principais dos dados bioquímicos e dos comprimentos larvares na costa espanhola.

Tabela IV. 15 - Percentagens de inanição em Espanha em 1992 por mês e por classe de comprimento.

Tabela IV.16- Médias e desvios padrões de vários parâmetros analisados nas larvas de sardinha provenientes quer da costa portuguesa quer da costa espanhola em 1991 e 1992.

Tabela IV.17 - Resultados do teste de Kruskal-Wallis a vários parâmetros analisados nas larvas de sardinha provenientes quer da costa portuguesa quer da costa espanhola em 1991 e 1992.

Tabela IV.18- Estudos recentes no meio natural que detectaram variações na condição larvar entre zonas e para as seguintes espécies: a) *Clupea harengus*, b) *Engraulis mordax*, c) *Gadus morhua*, d) *Trachurus symmetricus*, e) *Melanogrammus aeglefinus*, f) *Morone saxatilis*, g) *Sardinops melanostictus*, h) *Theragra chalcogramma* e i) *Coregonus* spp.

Índice das Figuras:**CAPÍTULO II - TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PROTEÍNAS EM LARVAS DE PEIXE**

Figura 2.1 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação das concentrações em ácidos nucleicos pela técnica espectrofotométrica.

Figura 2.2 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação da concentração das larvas em ácidos nucleicos na técnica fluorimétrica.

Figura 2.3 - Variação das unidades de fluorescência com diferentes concentrações de ácido desoxirribonucleico (dia: 22-5-92).

Figura 2.4 - Variação das unidades de fluorescência com diferentes concentrações de ácido ribonucleico (dia: 22-5-92).

Figura 2.5 - Variação da absorvância com diferentes concentrações de proteína (dia: 6-6-92).

Figura 2.6 - Fluxograma do procedimento analítico utilizado na determinação da concentração das larvas em proteínas insolúveis.

Figura 2.7 - Electroforese em gel de agarose de amostras de DNA e RNA purificado de larvas de arenque. Nos poços 2, 5 e 7 não se usou a RNase, tendo-se aplicado nos restantes.

CAPÍTULO III - VALIDAÇÃO DOS ÍNDICES BIOQUÍMICOS ATRAVÉS CULTIVO DE LARVAS DE SARDINA PILCHARDUS NA NATUREZA

Figura 3.1- **A.** Fotografia de uma das câmaras utilizadas na experiência de validação, **B.** Esquema geral da experiência onde se indica a malha das várias câmaras.

Figura 3.2 - Variação do conteúdo de DNA em μg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.3 - Variação do conteúdo de DNA em μg por mg de peso seco da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.4 - Variação do conteúdo de RNA em μg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.5 - Variação do conteúdo de RNA em μg por mg de peso seco da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.6 - Variação do conteúdo de Proteína insolúvel em μg por larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.7 - Variação da relação RNA/Pins da larva nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.8 - Variação da razão Pins/DNA nas câmaras com rede de diferente malhagem.

Figura 3.9 - Variação da relação RNA/DNA nas câmaras com rede de diferente malhagem.

CAPÍTULO IV- CONDIÇÃO LARVAR DE SARDINA PILCHARDUS NA COSTA SUL DE PORTUGAL E NORTE DE ESPANHA

Figura 4.1 - Localização das zonas amostradas: A- Norte de Espanha e B-Sul de Portugal (Algarve).

Figura 4.2- Mapa da costa algarvia com a localização das estações.

Figura 4.3 - Medições realizadas nas larvas de sardinha

Figura 4.4 - Variação do peso seco em função do comprimento da larva de *S. pilchardus*.

Figura 4.5 - Estações amostradas na costa espanhola em 1991.

Figura 4.6 - Estações amostradas na costa espanhola em Março de 1992.

Figura 4.7- Estações amostradas na costa espanhola em Abril de 1992.

Figura 4.8 - Estações amostradas na costa espanhola em Maio de 1992.

Figura 4.9 - Estações amostradas na costa espanhola em Junho de 1992.

Figura 4.10- Variação da temperatura da água superficial e do ar na zona da Barra de Faro-Olhão ao longo dos meses de recolha.

Figura 4.11 - Comparação da temperatura da água nos diferentes transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

Figura 4.12- Variação da temperatura da água com a profundidade nas estações dos diferentes transectos, Guadiana, Albufeira e Sagres e nas estações realizadas paralelamente à costa.

Figura 4.13- Variação da temperatura superficial da água ao longo das estações efectuadas nos transectos do Guadiana, Albufeira e Sagres e nas estações efectuadas paralelamente à costa.

Figura 4.14 **a** - Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona sul da Península Ibérica, nos dias 29 e 30 de Abril de 1992. **b**- Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona sul da Península Ibérica, nos dias 1 e 2 de Maio de 1992. **c**- Imagens de satélite da temperatura superficial da água na zona sul da Península Ibérica, nos dias 3 e 4 de Maio de 1992. A coloração mais escura corresponde aos valores de temperatura mais elevados.

Figura 4.15 - Variação da velocidade do vento nos vários transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.

- Figura 4.16 - Variação do rumo do vento nos vários transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.17 - Variação da turbulência da água nos vários transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.18- Variação da turbulência da água pelas estações dos vários transectos e pelas estações efectuadas paralelamente à costa, entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.19 - Abundância relativa dos grupos taxonómicos de microplâncton nos diferentes transectos realizados na costa algarvia.
- Figura 4.20 - Variação do número de presas pelos diferentes transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.21 - Variação da densidade de presas pelas estações realizadas na costa algarvia durante o cruzeiro entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.22 - Abundância relativa dos vários grupos taxonómicos de mesozooplâncton, predadores potenciais de larvas de peixe, nos diferentes transectos realizados na costa algarvia.
- Figura 4.23 - Variação da densidade de mesozooplâncton, considerado potencial predador das larvas de peixe ao longo das estações estudadas durante o cruzeiro realizado na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.24- Variação da densidade total de predadores nos transectos realizados na costa algarvia durante o cruzeiro de Abril/Maio de 1992.
- Figura 4.25 - Percentagem de larvas sardinha com tubo digestivo vazio e percentagem de larvas com alimento.
- Figura 4.26 - Percentagem de larvas de sardinha que continham o tipo de presas indicado, podendo cada larva conter mais do que um tipo de presas.
- Figura 4.27 - Variação do comprimento das larvas de *S. pilchardus* ao longo dos dias de recolha de Dezembro de 1990.
- Figura 4.28 - Variação dos comprimentos das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.29- Variação do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.30 - Variação da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.31 - Variação da profundidade do corpo na zona de inserção das barbatanas peitorais das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.32 - Variação da relação olho/cabeça das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.33 - Variação da razão olho/peitoral nas larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.34 - Distribuição de frequências de comprimento das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.35- Distribuição de frequências do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.36- Distribuição de frequências da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.37- Distribuição de frequências da altura do corpo das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.38 - Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.39- Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura do corpo das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.40- Distribuição de frequências de comprimento das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.41- Distribuição de frequências do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.42- Distribuição de frequências da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.43 - Distribuição de frequências da altura do corpo das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.44 - Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.

- Figura 4.45 - Distribuição de frequências da relação diâmetro do olho/altura do corpo das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.46- Variação dos comprimentos das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.47- Variação do diâmetro do olho das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.48- Variação da altura da cabeça das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.49 - Variação da profundidade do corpo na zona de inserção das barbatanas peitorais das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.50- Variação da razão olho/cabeça das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.51- Variação da relação olho/peitoral das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.52 - Relação entre o diâmetro do olho e o comprimento da larva em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.53 - **A.** Relação entre a altura da cabeça e o comprimento da larva. **B.** Relação entre a profundidade do corpo na zona de inserção da barbatana peitoral e o comprimento da larva em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.54- Relação entre: **A.** o índice Olho/Cabeça e o comprimento das larvas de *S. pilchardus* e **B.** o índice Olho/Peitoral e o comprimento das larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.55- Variação dos diferentes parâmetros analisados nos vários dias de recolha em Dezembro de 1990.
- Figura 4.56- Variação da razão RNA/DNA nas larvas recolhidas em Dezembro de 1991.
- Figura 4.57 - Dendograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa algarvia (Abril/Maio 1992) com base nos índices bioquímicos das larvas de sardinha recolhidas.
- Figura 4.58 - Variação dos diferentes parâmetros analisados em larvas de sardinha provenientes dos vários transectos realizados entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.59 - Variação da razão RNA/DNA analisada em larvas de sardinha provenientes dos diferentes transectos realizados entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.60 - Variação dos diferentes parâmetros analisados em larvas de sardinha provenientes das diferentes estações realizadas paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.61 - Variação da razão RNA/DNA analisada em larvas de sardinha provenientes das diferentes estações realizadas paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.62 - Distribuição de frequências de μg DNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.63 - Distribuição de frequências de DNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.64 - Distribuição de frequências de μg RNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.65- Distribuição de frequências de RNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.66 - Distribuição de frequências de RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.67 - Distribuição de frequências de μg Pins/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.68 - Distribuição de frequências de Pins/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.69 - Distribuição de frequências de RNA/Pins em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.70 - Distribuição de frequências de Pins/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto do Guadiana.
- Figura 4.71 - Distribuição de frequências de μg DNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.72 - Distribuição de frequências de DNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.73 - Distribuição de frequências de μg RNA/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.

- Figura 4.74 - Distribuição de frequências de RNA/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.75 - Distribuição de frequências de RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.76 - Distribuição de frequências de μg Pins/larva em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.77 - Distribuição de frequências de Pins/mg em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.78 - Distribuição de frequências de RNA/Pins em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.79 - Distribuição de frequências de Pins/DNA em larvas de *S. pilchardus* nas estações do transecto de Albufeira.
- Figura 4.80 - Análise por componentes principais dos dados bioquímicos e do comprimento, nas larvas de sardinha analisadas na costa algarvia. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.
- Figura 4.81 - Análise por componentes principais dos dados bioquímicos, dos dados bióticos e abióticos. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.
- Figura 4.82- Relação entre os valores de RNA/DNA médios observados para as larvas de sardinha e os valores previstos pela regressão múltipla.
- Figura 4.83 - (A). Frequências relativas da razão RNA/DNA e do (B). comprimento dos dados globais referentes às larvas de sardinha analisadas na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.84 - Variação geral da taxa de crescimento proteico (%/dia) com o comprimento das larvas de sardinha capturadas na costa algarvia.
- Figura 4.85 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia em Dezembro de 1990.
- Figura 4.86 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus* nos transectos realizados na costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.87 - Distribuição das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto do Guadiana pelas classes de taxa de crescimento proteico (%/dia), entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.88-Distribuição das larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas estações do transecto de Albufeira pelas classes de taxa de crescimento proteico (%/dia) entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.89 - Variação da taxa de crescimento proteico (%/dia) das larvas de *S. pilchardus* nas recolhas realizadas paralelamente à costa algarvia entre Abril e Maio de 1992.
- Figura 4.90 - Relação exponencial entre μg de DNA/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.
- Figura 4.91 - Relação exponencial entre μg de RNA/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.
- Figura 4.92- Relação exponencial entre μg de Pins/larva e o comprimento em larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa algarvia.
- Figura 4.93 - Relação entre a razão RNA/DNA e o comprimento nas larvas recolhidas na costa algarvia.
- Figura 4.94 - Variação da temperatura da água ao longo dos meses amostrados em 1992 na costa espanhola, apenas nas estações onde se recolheram larvas de sardinha.
- Figura 4.95 - Comparação entre o número de larvas de sardinha com e sem alimento no tubo digestivo nas diferentes estações analisadas (E2 a E85) durante o mês de Maio de 1992.
- Figura 4.96 - Comparação entre o número de larvas com e sem alimento no tubo digestivo nas diferentes estações analisadas (E5 a E62) durante o mês de Junho de 1992.
- Figura 4.97 - Dendograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991 em função dos índices de condição analisados.
- Figura 4.98 - Variação dos restantes índices analisados nas larvas capturadas em diferentes áreas da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991.
- Figura 4.99- Variação do comprimento e razão RNA/DNA nas larvas capturadas em diferentes áreas da costa espanhola entre Abril e Maio de 1991.
- Figura 4.100 - Distribuição de frequências de comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.101 - Distribuição de frequências de μg DNA/larva de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.102 - Distribuição de frequências de DNA/mg de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.103 - Distribuição de frequências de μg RNA/larva de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.

- Figura 4.104 - Distribuição de frequências de RNA/mg de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.105 - Distribuição de frequências de RNA/DNA de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.106 - Distribuição de frequências de μ gPins/larva de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.107 - Distribuição de frequências Pins/mg de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.108 - Distribuição de frequências de RNA/Pins de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.109 - Distribuição de frequências de Pins/DNA de larvas de *S. pilchardus* recolhidas nas diferentes estações realizadas na costa espanhola entre Abril e Maio 1991.
- Figura 4.110 - Dendograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa espanhola estudadas em Maio de 1992.
- Figura 4.111 - Dendograma por classificação (análise hierárquica) das estações da costa espanhola estudadas em Junho de 1992.
- Figura 4.112 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Março 1992.
- Figura 4.113 - Variação dos restantes índices analisados nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Março 1992.
- Figura 4.113 - Variação dos restantes índices analisados nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Março 1992.
- Figura 4.114- Variação do comprimento e da razão RNA/DNA nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Abril 1992.
- Figura 4.115 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Maio 1992.
- Figura 4.116- Variação dos restantes índices analisados nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Abril 1992.
- Figura 4.117 - Variação dos restantes índices analisados nas larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Maio 1992.
- Figura 4.118 - Distribuição de frequências de comprimentos das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola .
- Figura 4.119 - Distribuição de frequências de μ gDNA/larva das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.120 - Distribuição de frequências de DNA/mg das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.121 - Distribuição de frequências de μ g RNA/larva das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.122 - Distribuição de frequências de RNA/mg das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.123 - Distribuição de frequências de RNA/DNA das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.124- Distribuição de frequências de μ gPins/larva das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.125- Distribuição de frequências de Pins/mg das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.126 - Distribuição de frequências de RNA/Pins das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.127 - Distribuição de frequências de Pins/DNA das larvas de *S. pilchardus* nas diferentes estações realizadas em Maio de 1992 na costa espanhola.
- Figura 4.128 - Variação do comprimento e da razão RNA/DNA em larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Junho 1992.
- Figura 4.129 - Variação dos restantes índices analisados em larvas de *S. pilchardus* capturadas em diferentes áreas da costa espanhola em Junho 1992.
- Figura 4.130- Análise por componentes principais dos dados bioquímicos e do comprimento das larvas de *S. pilchardus* na costa espanhola. Representação espacial segundo os três primeiros eixos.
- Figura 4.131 - Frequências relativas da razão RNA/DNA (A.) e do comprimento das larvas de sardinha (B.) em função dos dados globais na costa espanhola em Março, Abril, Maio e Junho de 1992.
- Figura 4.132 - Variação geral da taxa de crescimento proteico (%/dia) com o comprimento das larvas de sardinha na costa espanhola.

- Figura 4.133 - Variação da taxa de crescimento proteico das larvas de sardinha entre áreas nas diferentes épocas de recolha na costa espanhola.
- Figura 4.134 - Relação entre μg de DNA/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola em Abril de 1991 e Março, Abril, Maio e Junho de 1992.
- Figura 4.135 - Relação entre μg de RNA/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola entre Março, Abril, Maio e Junho de 1992.
- Figura 4.136 - Relação entre μg de Pins/larva e o comprimento de larvas de *S. pilchardus* recolhidas na costa espanhola em Abril de 1991 e Março, Abril, Maio e Junho de 1992.
- Figura 4.137 - Relação entre a razão RNA/DNA e o comprimento de larvas recolhidas na costa espanhola nos meses de Março, Abril, Maio e Junho de 1992.
- Figura 4.138- Desvio padrão em função da média da taxa de crescimento proteico individual das larvas de sardinha. Linha contínua e círculos preenchidos - Espanha, 1992 e linha a tracejado e círculos não preenchidos - Espanha, 1991.
- Figura 4.139- Desvio padrão em função da média da taxa de crescimento proteico individual das larvas de sardinha. Linha contínua e círculos preenchidos - Espanha, 1992 e linha a tracejado e círculos não preenchidos - Portugal, 1992.

