

**Universidade do Algarve**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**Limites de distribuição vertical da espécie**  
***Patella depressa*: padrões e processos**

Daniela Nobre da Silva

Dissertação

**Mestrado em Biologia Marinha**

Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Professora Doutora Maria Alexandra Teodósio  
Professora Doutora Teresa Cruz

Faro, 2015

Limites de distribuição vertical da espécie  
*Patella depressa*: padrões e processos

**Declaração de autoria de trabalho**

*Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.*

---

Copyright em nome de Daniela Nobre da Silva

*A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*

À minha mãe,  
por ser o pilar da minha vida e pelo seu apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Esta tese representa uma odisséia para mim. Foi uma jornada de descobertas, ao longo da qual tive a sorte de conhecer várias pessoas e de criar e fortalecer amizades que foram importantes para a realização do meu trabalho.

Em primeiro lugar um sincero obrigado pelo apoio e orientação às professoras Alexandra Teodósio e Teresa Cruz, que se mostraram sempre disponíveis e me deram a oportunidade e proporcionaram os meios para estudar um tema do meu interesse. Estou grata por terem sempre acreditado em mim e me terem ajudado a crescer tanto pessoal como profissionalmente.

À Inês e à Joana, por estarem presentes em todas as etapas, pela vossa constante ajuda e pelo bom ambiente e boa disposição que sempre reinaram durante todo o processo. Nada disto teria sido possível sem vocês, foram e sempre serão uma peça fundamental. Diversas aventuras ocorreram na maré, e relembro-as todas com um sorriso.

À Teresa Silva pela paciência e apoio ao longo deste processo de aprendizagem, desde trabalho no campo a orçamentos – nunca fiquei desamparada.

A todos os colegas do laboratório CIEMAR, que me proporcionaram algo que nunca esquecerei e pela qual estarei eternamente grata: uma família no mundo da ciência. Todos se mostraram disponíveis a ajudar, contribuíram com ideias e sugestões e fizeram desta tese uma experiência memorável.

Ao pessoal do laboratório ECOREACH que se disponibilizaram para me ajudar, não só com as minhas análises e dados, mas com tudo o que fosse necessário; partilhando a sua experiência e sugestões de ideias para o tema.

Obrigado à Inês e à Jessica, as duas estudantes da Escola Secundária de Sines, que passaram comigo parte dos seus estágios.

Aos colegas de curso, um grupo de pessoas fantásticas. Obrigado por me terem proporcionado dois anos únicos. Mesmo estando em cidades diferentes, vivenciámos juntos e apoiámo-nos nesta aventura que é realizar uma tese.

Aos meus amigos, por nunca se terem cansado de ouvir falar sobre lapas e por mostrarem interesse naquilo que me é querido. Foi um longo caminho, fico feliz por vos ter tido sempre do meu lado.

Por fim à minha família, que fazem parte de mim e são a minha rede de suporte. Por serem os meus alicerces, fundamentais para a minha tese mas não só, também na vida em geral. Estou-vos grata por terem mergulhado num mundo de redes, parafusos, etiquetas e marés comigo. Um carinho especial à minha mãe, que provavelmente viveu esta tese tão intensamente como eu.

Obrigado por me fazerem sorrir todos os dias.

*“The sea, once it casts its spell, holds one in its net of wonder forever.”*

**Jacques-Yves Cousteau**

---

## RESUMO

Foi realizado um trabalho com o intuito de compreender os padrões associados aos limites de distribuição vertical de lapas da espécie *Patella depressa* e analisar processos possivelmente associados a estes padrões. Para tal, realizaram-se diversos estudos relacionados com o gradiente de alturas de distribuição e com a ecologia desta espécie.

A execução prática deste trabalho decorreu na zona intertidal rochosa da Praia da Oliveirinha (sudoeste de Portugal), onde é abundante a espécie em estudo. Foram efetuadas observações relativas aos limites de distribuição vertical assim como à abundância e aos padrões de movimento em dois níveis verticais de ocorrência da espécie. Também se executaram experiências manipulativas *in situ* para testar a variação da sobrevivência, do crescimento e da condição fisiológica das lapas em diferentes níveis verticais da zona intertidal.

Observou-se um decréscimo dos limites superior e inferior de distribuição da espécie na transição do inverno para o verão. A abundância de lapas foi em geral superior no nível de maré médio comparativamente ao nível superior. Ocorreram mais deslocações no nível superior comparativamente ao nível médio. A sobrevivência e condição ecofisiológica de lapas adultas não variou entre os níveis médio e superior.

Verificou-se que os indivíduos junto ao limite superior têm a capacidade de percorrer grandes distâncias e que a diminuição da altura deste limite poderá ser devido a deslocações das lapas para locais de refúgio. A mortalidade de lapas grandes no nível superior pode ser em parte influenciada pela temperatura ambiental, sugerindo a existência de estratégias de regulação de temperatura corporal possivelmente eficazes na manutenção das funções vitais destas lapas.

Apesar de ter havido um particular interesse nos potenciais efeitos da temperatura na distribuição vertical da espécie há que ter em conta que outros fatores poderão estar associados às reações observadas (e.g., a humidade e disponibilidade de alimento).

**Palavras-chave:** Gastropoda / Limites verticais / Padrão temporal / Padrão espacial / Ecologia intertidal / Sudoeste Portugal

---

---

## ABSTRACT

A research work was conducted to understand the patterns and processes associated with the vertical limits of the limpet *Patella depressa* distribution. In order to accomplish that, several studies were carried out related with the species' distribution gradient across the vertical axis and with its ecology.

The practical work took place in the rocky intertidal zone at Praia da Oliveirinha (SW Portugal) where this species is abundant. Observations were made in relation to the vertical limits of the distribution and the abundance and movement patterns on areas where this species occurs. It was also performed *in situ* experiments to test growth, survival and physiological condition of this species.

A decrease within the lower and upper levels of this species' distribution occurred from winter to summer. The abundance of limpets was overall greater in the mid-tidal level, when comparing to the upper level. More displacements occurred on the upper level comparing to the mid-level. The survival and ecophysiological condition of limpets with big dimensions were considered equivalent between the mid-tidal and upper levels.

It was found that the specimens existing nearby the upper limit have the ability to move long distances and the drop of the limit height might be due to the displacement of limpets to refuge places. The mortality of limpets with big dimensions on the upper level of distribution could be partially influenced by temperature, suggesting the existence of temperature control strategies possibly effective in maintaining the vital functions of these limpets.

Even though there was a particular interest on the potential effects of temperature on the species' vertical distribution, it must be taken into account other factors that may be associated with the observed reactions (e.g, humidity and food availability).

**Keywords:** Gastropoda / Vertical limits / Temporal pattern / Spacial pattern / Intertidal ecology / SW Portugal

---

## ÍNDICE

<b>Dedicatória</b> .....	I
<b>Agradecimentos</b> .....	II
<b>Epígrafe</b> .....	III
<b>Resumo</b> .....	IV
<b>Abstract</b> .....	V
<b>Índice de Figuras</b> .....	VIII
<b>Índice de Tabelas</b> .....	XIII
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	XIV
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	4
<b>3. Metodologia</b> .....	7
<b>3.1. Área de estudo</b>	7
<b>3.2. Limites da distribuição vertical</b>	9
<b>3.3. Padrões de abundância</b>	10
<b>3.4. Movimentos de lapas</b>	11
<b>3.5. Temperatura associada aos níveis de distribuição</b>	16
<b>3.6. Experiências manipulativas</b>	18
<b>3.7. Crescimento em lapas pequenas</b>	23
<b>3.8. Sobrevivência de lapas pequenas e grandes</b>	26
<b>3.9. Condição ecofisiológica em lapas grandes</b>	27
<b>3.10. Análise estatística de dados</b>	29
<b>4. Resultados</b> .....	32

<u>4.1. Padrões</u>	<b>32</b>
4.1.1. Limites inferior e superior da distribuição vertical	32
4.1.2. Abundância nos níveis médio e superior da distribuição	34
4.1.3. Movimentos de P. depressa nos níveis médio e superior	35
4.1.4. Ambiente térmico nos níveis médio e superior	46
<u>4.2. Processos</u>	<b>49</b>
4.2.1. Caracterização térmica e de abundância das áreas experimentais	49
4.2.2. Crescimento em lapas pequenas	52
4.2.2.1. Medição com craveira (físico)	52
4.2.2.2. Método da calceína (químico)	54
4.2.3. Sobrevivência em lapas pequenas e grandes	57
4.2.4. Condição ecofisiológica em lapas grandes a curto e médio prazo	60
5. Discussão.....	63
6. Conclusão .....	72
7. Considerações finais.....	74
8. Referências bibliográficas .....	75
9. Anexos.....	79
9.1. Anexo A	<b>79</b>
9.2. Anexo B	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** – Distribuição (representada pelo contorno espesso) no Atlântico nordeste de *Patella depressa*. Fonte: Southward et al., 1995 ..... 2
- Figura 3.1** – Localização da Praia da Oliveirinha. (A) Vista geral, com indicação da posição da região de estudo em relação à costa portuguesa; (B) Destaque para o trecho (assinalado a vermelho) em particular onde decorreram as experiências. Fonte: Google Earth ..... 7
- Figura 3.2** – Zona intertidal rochosa da Praia da Oliveirinha, ilustrando uma porção da área onde decorreram os diversos estudos efetuados..... 8
- Figura 3.3** – Exemplificação do processo de marcação do limite inferior da distribuição vertical. Círculos assinalam as últimas lapas da espécie *P. depressa* avistadas e a seta indica a posição da marca feita de cola (utilizada como referência para medir a altura em relação ao zero hidrográfico)..... 10
- Figura 3.4** – Um exemplar, marcado no nível médio da distribuição vertical, localizado em dois tipos de habitat distintos ao longo do período do estudo dos padrões de movimentos da espécie *P. depressa*. (A) No refúgio, em fresta coberta por algas (24-Maio-2014); (B) Em local emerso e exposto ao sol (27-Outubro-2014). ..... 11
- Figura 3.5** – (A) Exemplo de uma lapa marcada no nível superior, em ambiente emerso, e respetivo conjunto de pontos de referência utilizados nas medições de deslocação. (B) Destaque para uma das colas de referência, com o ponto onde era efetuada a medição assinalado a vermelho. (C) Focagem numa das lapas do estudo, onde se evidencia o código individual identificativo, com o ponto onde era efetuada a medição – no apex – assinalado a vermelho..... 12
- Figura 3.6** – Esquematisação das medições realizadas e do cálculo das distâncias percorridas, para determinar as distâncias percorridas, durante o estudo dos movimentos em lapas da espécie *P. depressa*. As letras ‘A’, ‘B’ e ‘C’ indicam os pontos de referência utilizados para calcular as distâncias. Os círculos vermelhos representam a região das etiquetas e da lapa a partir da qual eram efetuadas as medições. A distância entre cada par de pontos de referência encontra-se a azul (dAB, dAC, dBC). Exemplo: A medição da lapa a cada ponto de referência para a primeira data ( $t_1$ ) está descrita a verde (dAt<sub>1</sub>, dBt<sub>1</sub>, dCt<sub>1</sub>), enquanto para o segundo tempo ( $t_2$ ) está a laranja (dAt<sub>2</sub>, dBt<sub>2</sub>, dCt<sub>2</sub>). A distância percorrida pela lapa entre as duas datas consecutivas (obtida através do cálculo por trilateração) encontra-se a vermelho (dt<sub>1</sub>t<sub>2</sub>). Fonte da imagem da lapa: <http://www.sciwebhop.net> ..... 15
- Figura 3.7** – “Robolapa” colada numa rocha da zona do limite inferior, na zona intertidal. (A) Panorama geral, com robolapa junto de lapas da espécie em estudo. (B) Ampliação para a posição exata da robolapa. .... 16
- Figura 3.8** – Esquematisação das experiências manipulativas colocadas em campo, nos três níveis estudados (médio, superior e extremo). Cada quadrado representa um tipo de tratamento – preenchimento a laranja corresponde aos testes com lapas pequenas (< 2cm) e a azul representado os ensaios com lapas grandes (> 2cm). Junto à abreviatura do tratamento

encontra-se especificado o número de réplicas (n) [e.g. n = 6 corresponde a 6 réplicas, que serão 6 jaulas com uma lapa marcada em cada]. Tratamentos: Nível médio / MedCN – controlo em densidade natural; MedTN – transplante para densidade natural; MedCalcN – transplante para densidade natural, marcado com calceína; MedC – controlo sozinho; MedT – transplante sozinho; MedCalc - transplante sozinho, marcado com calceína; Nível superior / SupT – transplante sozinho; SupCalc – igual mas marcado com calceína; Nível extremo / ExtT – transplante sozinho; ExtCalc – igual mas marcado com calceína..... 20

**Figura 3.9** – Montagem das jaulas utilizadas nas experiências com indivíduos com tamanhos inferiores a 2cm. (A) Reforço aplicado na base interior da jaula; (B) Reforço aplicado nos cantos das jaulas; (C) Reforço aplicado nas laterais das jaulas para diminuir a área da quadrícula da rede; (D) Jaula com o aspeto final, após montagem de todas as peças. .... 21

**Figura 3.10** – Identificação da posição das jaulas, em campo, em relação a cada nível..... 22

**Figura 3.11** – Exemplares da espécie *P. depressa* com dimensões inferior a 2cm, após serem retirados do banho de calceína, para serem marcados com cola e depositados dentro de jaulas na Praia da Oliveirinha. .... 23

**Figura 3.12** – Etapas de preparação das lapas recolhidas em campo para serem analisadas à lupa binocular, para medição do incremento individual marginal (A) Lapa intacta, com o aspeto original da altura da recolha – coberta por cracas e com a marca de cola; (B) Exemplar após estar submerso durante 2 horas em lixívia e ter sido polido – marca a lápis indica o comprimento máximo da concha; (C) Aparência final após tratamentos de limpeza e desbaste da concha – corte longitudinal corresponde ao comprimento máximo da concha, zona onde serão efetuadas as medições (I – zona posterior, II – zona anterior). .... 24

**Figura 3.13** – Exemplos de medições efetuadas, do crescimento marginal, no programa LAS (vista longitudinal – revelando a espessura da concha). (A) Zona posterior de uma lapa onde é possível observar tanto a medida interior (I) como a exterior (II). (B) Zona anterior de uma lapa onde a banda não é visível de um lado ao outro, só sendo possível definir a medida interior (III). .... 25

**Figura 3.14** – Jaulas colocadas na rocha, utilizadas nas experiências manipulativas (incluindo sobrevivência) – à esquerda para indivíduos com tamanho inferior a 2cm (pequenas) e à direita para lapas com dimensões superiores a 2cm (grandes)..... 26

**Figura 3.15** – (A) Exemplo de uma porção do músculo do pé da lapa liofilizada (dentro do eppendorf), utilizada nas análises de ácidos nucleicos; (B) A restante parte da lapa (após o corte para amostra representada em A), após secagem em estufa, para obtenção do peso seco total da lapa. .... 29

**Figura 4.1** – Variação sazonal (entre inverno e verão) da altura, em relação ao zero hidrográfico, dos limites inferior (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie *P. depressa* (média ± EP), em metros..... 33

**Figura 4.2** – Diferencial entre as alturas registadas no inverno e no verão (média ± EP) para o limite inferior e para o limite superior da distribuição vertical da espécie *P. depressa*, em metros (altura em relação ao zero hidrográfico). .... 34

- Figura 4.3** – Número total (média  $\pm$  EP) de lapas da espécie *P. depressa* por quadrado com dimensões de 50x50cm, pertencentes a quatro classes dimensionais (inferior a 1, entre 1 e 2, entre 2 e 3 e superior a 3cm), em dois níveis de distribuição vertical (médio e superior). [n = 6]..... 35
- Figura 4.4** – Percentagem de lapas paradas em relação ao total de lapas seguidas no respectivo nível, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. .... 37
- Figura 4.5** – Proporção de lapas paradas em dois tipos de habitats (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie..... 38
- Figura 4.6** – Percentagem de lapas em rotação em relação ao total de lapas seguidas no respectivo nível, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em rotação nessa data. .... 40
- Figura 4.7** – Proporção de lapas em rotação em dois tipos de habitats (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em rotação nessa data. .... 41
- Figura 4.8** – Distância de deslocação (média  $\pm$  EP) registada entre datas de amostragem sucessivas em lapas da espécie *P. depressa*, em centímetros, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco indicam que não existiram lapas em deslocação nessas datas. (C) Comparação do valor médio ( $\pm$  EP) do total de distâncias de deslocação para todo o período de estudo, em centímetros, entre os dois níveis. .... 43
- Figura 4.9** – Proporção de lapas em deslocação em dois tipos de habitat (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em deslocação nessa data. Categorias de transição: R – E, local de refúgio para emerso / R – R, local de refúgio para local de refúgio / E – R, emerso para local de refúgio / E – E, emerso para emerso. .... 45
- Figura 4.10** – Distâncias de deslocação mensais (média  $\pm$  EP), entre Abril e Outubro de 2014, percorridas pelas lapas *P. depressa*, em centímetros, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. .... 46
- Figura 4.11** – Temperatura registada (em grau Celsius) nos níveis médio (MED) e superior (SUP) da distribuição vertical da espécie, em dois transectos (NORTE e SUL), durante 08 de Maio de 2014 a 11 de Janeiro de 2015. (A) Temperatura mínima; (B) Temperatura média; (C) Temperatura máxima. [n = 1]..... 47
- Figura 4.12** – Temperatura registada (em grau Celsius) nos níveis médio (MED) e superior (SUP) da distribuição vertical da espécie, nas zonas onde decorreram as experiências manipulativas, durante 01 de Maio a 09 Outubro de 2014. (A) Temperatura mínima; (B)

Temperatura média; (C) Temperatura máxima. n = 2 (com exceção do intervalo de tempo de 24 de Julho a 09 Outubro para o nível médio, em todos os gráficos, n = 1)..... 49

**Figura 4.13** – Número total (média ± EP) de lapas da espécie *P. depressa* por quadrado com dimensões de 20x20cm, pertencentes a duas classes dimensionais (inferior e superior a 2cm), em dois níveis de distribuição vertical (médio e superior)..... 52

**Figura 4.14** – Incremento do CMC, em milímetros, em lapas da espécie *P. depressa* com tamanho inferior a 2cm por tratamento experimental (média ± EP). Tratamentos: MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedCalcN – Transplante para densidade natural, marcado com calceína, no nível médio; MedC – Controlo sozinho, no nível médio; MedT – Transplante sozinho, no nível médio; MedCalc - Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível médio; SupCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível superior; ExtCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível extremo. Devido à mortalidade total dos indivíduos durante o ensaio experimental, não se obteve os tamanhos finais para o tratamento ExtT, impossibilitando o cálculo do seu crescimento (ND – dados não disponíveis). ..... 53

**Figura 4.15** – Crescimento (média ± EP), em milímetros, em lapas da espécie *P. depressa* com tamanho inferior a 2cm utilizando dois procedimentos diferentes de medição – (A) Método da calceína e (B) Medição com craveira. Tratamentos: MedCalcN (transplante para densidade natural, marcado com calceína, no nível médio); MedCalc (transplante sozinho, marcado com calceína, no nível médio); SupCalc (transplante sozinho, marcado com calceína, no nível superior). ..... 56

**Figura 4.16** – Relação entre as variáveis de crescimento ‘AI’ (método da calceína, medida interior da zona anterior da lapa) e ‘CMC’ (medição com craveira, comprimento máximo da concha) em exemplares, com tamanho inferior a 2cm, da espécie *P. depressa*. Incremento em milímetros..... 57

**Figura 4.17** – Número de semanas de sobrevivência por tratamento (média ± EP), em lapas com tamanho inferior a 2cm da espécie *P. depressa*, durante o período de 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014. Tratamentos: MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedCalcN – Transplante para densidade natural, marcado com calceína, no nível médio; MedC – Controlo, sozinho, no nível médio; MedT – Transplante, sozinho, no nível médio; MedCalc – Controlo sozinho, marcado com calceína, no nível médio; SupCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível superior; ExtCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível extremo..... 58

**Figura 4.18** – Número de semanas de sobrevivência por tratamento (média ± EP), em lapas com tamanho superior a 2cm da espécie *P. depressa*, durante o período de 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. Tratamentos: MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedC – Controlo sozinho, no nível médio; MedT – Transplante sozinho, no nível médio; SupT – Transplante sozinho, no nível superior; ExtT – Transplante sozinho, no nível extremo. .... 60

**Figura 4.19** – Condição ecofisiológica a curto prazo (07 a 14 de Agosto de 2014) de lapas da espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm, por tratamento. Linha contínua espessa representa a mediana e a tracejado o maior e menor valor registado. Variáveis de estudo: (A)

$\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ , (B)  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$ , (C) comprimento máximo da concha (CMC) (em milímetros), (D) rácio RNA:DNA estandardizado (sRD). Tratamentos: MedControlo – Controlo no nível médio [n = 3], MedJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível médio [n = 3], SupControlo – Controlo no nível superior [n = 3], SupJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível superior [n = 3], ExtJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível extremo [n = 4]...... 61

**Figura 4.20** – Condição ecofisiológica a médio prazo (071 de Maio a 28 de Agosto de 2014) de lapas da espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm, por tratamento. Linha contínua espessa representa a mediana e a tracejada o maior e menor valor registado. Variáveis de estudo: (A)  $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ , (B)  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$ , (C) comprimento máximo da concha (CMC) (em milímetros), (D) rácio RNA:DNA estandardizado (sRD). Tratamentos: MedCN – Controlo, com densidade natural, no nível médio [n = 3]; MedTN – Transplante, sozinho, no nível médio [n = 3]; MedC – Controlo, sozinho, no nível médio [n = 3]; MedT – Transplante, sozinho, no nível médio [n = 3]; SupT – Transplante sozinho, no nível superior [n = 4]; ExtT – Transplante sozinho, no nível extremo [n = 1]...... 62

**Figura 8.1** – Deslocações realizadas (em centímetros) por duas lapas da espécie *P. depressa* (códigos individuais: M42 e M47), no nível médio da sua distribuição vertical. Marcadores com formato triangular representam as referências utilizadas para medir a distância percorrida pela lapa; Marcadores com formato circular retratam a localização da lapa na data associada a esse ponto; ao lado de cada data encontra-se o habitat correspondente nesse posicionamento (E – habitat ‘emerso’, R – habitat ‘locais de refúgio’)...... 79

**Figura 8.2** – Deslocações realizadas (em centímetros) por três lapas da espécie *P. depressa* (códigos específicos: S13, S31 e S49), no nível superior da sua distribuição vertical. Marcadores com formato triangular representam as referências utilizadas para medir a distância percorrida pela lapa; Marcadores com formato circular retratam a localização da lapa na data associada a esse ponto, ao lado de cada data encontra-se o habitat correspondente nesse posicionamento (E – habitat ‘emerso’, R – habitat ‘locais de refúgio’)...... 81

**Figura 8.3** – Número total de lapas vivas, da espécie *P. depressa*, com tamanho inferior a 2cm (eixo vertical principal) e temperatura registada, em grau Celsius (eixo vertical secundário) à escala semanal. Período de estudo: 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014. Temperatura mínima: (A) nível médio; (B) nível superior; (C) nível extremo. Temperatura máxima: (D) nível médio; (E) nível superior; (F) nível extremo. .... 84

**Figura 8.4** – Número total de lapas vivas, da espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm (eixo vertical principal) e temperatura registada, em grau Celsius (eixo vertical secundário) à escala semanal. Período de estudo: 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. Temperatura mínima: (A) nível médio; (B) nível superior; (C) nível extremo. Temperatura máxima: (D) nível médio; (E) nível superior; (F) nível extremo. Tratamentos médio: MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; Restantes – Controlos, em densidade natural e sozinho, e transplante sozinho, no nível médio. .... 85

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Número de lapas presentes (das marcadas para a experiência das deslocções) em cada data de amostragem, por nível. As datas de monitorização realizaram-se durante o ano de 2014, com a exceção da última data (05-Março) que pertence a 2015..... **15**
- Tabela 3.2** – Especificações de cada série de termómetros colocada na área de estudo. Discriminação do número de termómetros ativos recolhidos em cada nível, assim como as datas de início e de fim do registo de temperaturas. .... **17**
- Tabela 3.3** – Enumeração das séries obtidas por transecto de cada nível. .... **18**
- Tabela 3.4** – Esquema de preenchimento da multiplaca utilizada na leitura de fluorescência das amostras. Encontra-se indicado em cada poço o seu componente principal (e respetiva quantidade) [RNA, DNA ou “A” = amostra], cada poço foi completado com solução tampão e Gel Red (e no caso dos poços com DNA, também era adicionado RNase) até perfazer 100µl de volume total. Azul: primeiro replicado; Laranja: segundo replicado..... **28**
- Tabela 4.1** – Diferencial entre a temperatura mínima e máxima semanal registada durante o período de estudo de cada experiência, em grau Celsius, para cada nível estudado (média ± DP). Período de estudo: Lapas pequenas (inferior a 2cm) – 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014; Lapas grandes (superior a 2cm) – 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. .... **51**
- Tabela 4.2** – Diferencial entre as temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, em grau Celsius, para cada par de níveis (média ± DP). Período de estudo: Lapas pequenas (inferior a 2cm) – 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014; Lapas grandes (superior a 2cm) – 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. Níveis estudados: MED – Médio; SUP – Superior; EXT – Extremo ..... **51**
- Tabela 4.3** – Quatro medidas de crescimento (em milímetros) para os exemplares do tratamento ‘MedCalc’ utilizando o método da calceína. ND – dados não disponíveis devido à não existência de uma banda distinta de calceína. .... **54**
- Tabela 4.4** – Relações alométricas entre as quatro medidas retiradas utilizando o método da calceína, no tratamento ‘MedCalc’. n = 4 (AI-PE, AI-PI, PE-PI) e n = 3 (AE-AI, AE-PE, AE-PI). Medidas: AI – do lado interior da concha na zona anterior da lapa, AE – do lado exterior da concha na zona anterior da lapa, PI – do lado interior da concha na zona posterior da lapa, PE – do lado exterior da concha na zona posterior da lapa. .... **55**

## LISTA DE ABREVIATURAS

### A

**AE:** Medida do lado exterior da concha na zona anterior da lapa (experiência crescimento)

**AI:** Medida do lado interior da concha na zona anterior da lapa (experiência crescimento)

### C

**CMC:** Comprimento máximo da concha da lapa (experiência crescimento)

### D

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico (experiência condição ecofisiológica)

**DP:** Desvio-padrão

### E

**E:** Habitat 'emerso' (experiência movimentos)

**EP:** Erro-padrão

**EXT:** Nível extremo da distribuição vertical da espécie

**ExtCalc:** Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível extremo (tratamento experimental)

**ExtT:** Transplante sozinha, no nível extremo (tratamento experimental)

### M

**MED:** Nível médio da distribuição vertical da espécie

**MedC:** Controlo sozinha, no nível médio (tratamento experimental)

**MedCalc:** Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível médio (tratamento experimental)

**MedCalcN:** Transplante para densidade natural, marcada com calceína, no nível médio (tratamento experimental)

**MedCN:** Controlo em densidade natural, no nível médio (tratamento experimental)

**MedT:** Transplante sozinha, no nível médio (tratamento experimental)

**MedTN:** Transplante para densidade natural, no nível médio (tratamento experimental)

### N

**ND:** Dados não disponíveis

### P

**PE:** Medida do lado exterior da concha na zona posterior da lapa (experiência crescimento)

**PI:** Medida do lado interior da concha na zona posterior da lapa (experiência crescimento)

**R**

**R:** Habitat 'locais de refúgio' (experiência movimentos)

**RNA:** Ácido ribonucleico (experiência condição ecofisiológica)

**S**

**sRD:** rácio RNA:DNA estandardizado (experiência condição ecofisiológica)

**SUP:** Nível superior da distribuição vertical da espécie

**SupCalc:** Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível superior (tratamento experimental)

**SupT:** Transplante sozinha, no nível superior (tratamento experimental)

**U**

**UV:** Radiação ultravioleta

# **1 INTRODUÇÃO**

A zona intertidal rochosa encontra-se na interface entre o meio terrestre e o meio marinho e constitui um ambiente muito diversificado, que fornece habitat a uma grande variedade de organismos. Ao longo do eixo vertical mar-terra da zona entre-marés, cada espécie distribui-se numa determinada área definida nos extremos pelos limites inferior e superior de distribuição. Dentro desta área os indivíduos lidam diariamente com a mudança entre os regimes imerso e emerso, sendo que a razão entre o tempo que estão expostos à atmosfera e ao mar varia consoante a sua localização no eixo vertical (Helmuth & Hofmann, 2001; Boaventura et al., 2002; Araújo et al., 2005; Denny & Gaines, 2007). A extensão vertical da zona intertidal varia com base em diversos fatores, como o grau de hidrodinamismo, sendo mais extensa em locais mais expostos do que em locais mais abrigados (Hawkins & Jones, 1992). Os moluscos são um dos grupos mais abundantes na zona entre-marés das praias rochosas, sendo os gastrópodes herbívoros, como as lapas, organismos-chave no funcionamento do ecossistema (Branch, 1981; Boaventura et al., 2002).

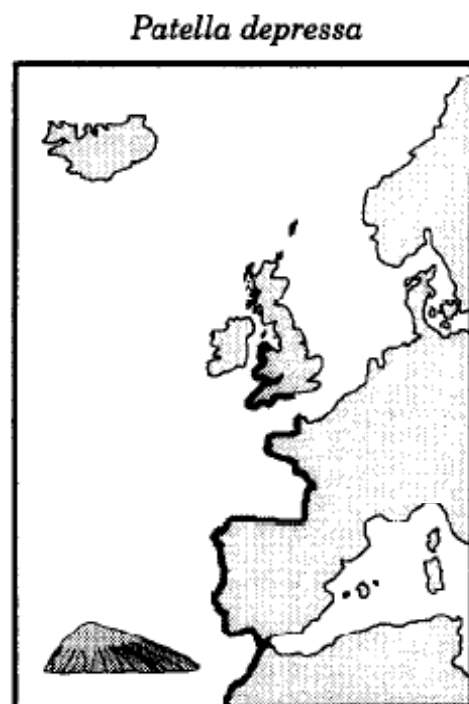
Em teoria, os fatores limitantes que determinam a sobrevivência e distribuição das populações de lapas ao longo da zona intertidal, são maioritariamente físicos para o limite superior (em níveis superiores, o período de imersão é comparativamente mais curto do que em níveis de altura mais baixos, podendo a prolongada exposição ao calor e ar durar vários dias em períodos de marés mortas e gerar problemas de dessecação para os organismos) e uma combinação entre físicos e biológicos para os níveis mais inferiores (onde os organismos se encontram numa localização hipoteticamente mais favorável, que nunca fica exposta ao ar por mais do que alguns minutos ou horas; e onde a importância da competição por espaço e alimento, predação e ação de ondas pode assumir maior importância relativa). Porém, existem várias exceções a este paradigma, sendo o sistema normalmente caracterizado por uma grande variabilidade natural a diferentes escalas espaciais e temporais (Wolcott, 1973; Denny & Gaines, 2007). Underwood & Denley (1984) exploraram os paradigmas existentes em relação à estrutura das comunidades intertidais e fatores determinantes dos limites de distribuição vertical das espécies na zona entre-marés. Como mencionado anteriormente, uma das generalizações mais conhecidas é a de que o limite superior é maioritariamente definido por fatores físicos, sendo que os organismos móveis que se deslocam até alturas elevadas sofrem mortalidade causada por dessecação, insolação ou exposição a altas temperaturas durante o período de emersão. No entanto, ainda é necessário aprofundar este tema e explorar este

modelo com testes experimentais. Os autores apresentam outras explicações, como por exemplo a de que os organismos herbívoros poderão ter a capacidade de existir em níveis superiores mas estar distribuídos de acordo com a disponibilidade do seu alimento, ou seja, se as algas forem afetadas por fatores físicos nestas regiões (e aqui os fatores físicos influenciam apenas indiretamente os herbívoros) ou ocorrerem períodos longos de emersão que impeçam o acesso ao alimento, a morte dos indivíduos será causada pela fome. Estes autores também salientam que a ocorrência de mortalidade em estudos onde são transplantados indivíduos para níveis superiores não revela quais as razões para a não existência dessa espécie naqueles níveis (apenas demonstra que estes não sobrevivem fora da sua zona normal de distribuição).

Apesar da sua extensão vertical variar de praia para praia, a lapa *Patella depressa* é muito abundante em toda a costa rochosa continental portuguesa (Boaventura, 2000; Araújo et al., 2005). *P. depressa* estende-se desde o norte de África até ao sudoeste de Inglaterra e País de Gales, sendo dominante tanto em praias expostas como abrigadas (Guerra & Gaudencio, 1986) (Fig. 1.1).

A maioria das lapas do género *Patella* ocupa posições específicas individuais na rocha, durante grande parte do seu tempo. Esta posição é marcada no substrato através de métodos físicos e químicos (dissolução da rocha através de libertação de substâncias químicas e escavação da mesma utilizando a rádula), formando a denominada ‘cicatriz’ na rocha que de uma forma geral adquire a função de casa do organismo (i.e., local fixo para o qual o indivíduo retorna após terminar a sua atividade) (Cook et al., 1969; Branch, 1981).

Como mencionado anteriormente as lapas são organismos herbívoros, alimentando-se da microflora e detritos existentes na superfície do substrato rochoso, no entanto algumas espécies são também capazes de ingerir macroalgas (Branch, 1981; Liu, 1992; Della Santina et al., 1993). A alimentação pressupõe a existência de períodos de atividade que implica a lapa distanciar-se da sua cicatriz na rocha para procurar alimento (Della Santina et al., 1995). Santini et al. (2004) compararam os padrões observados relativos à atividade de procura de



**Figura 1.1** - Distribuição (representada pelo contorno espesso) no Atlântico nordeste de *Patella depressa*. Fonte: Southward et al., 1995

alimento com variados estudos anteriores, para a espécie *Patella vulgata*, discutindo a plasticidade associada a esta atividade e demonstrando que este movimento pode ser influenciado por diversos fatores (incluindo estação do ano). Ainda assim, estes autores conseguiram detetar duas alturas do dia (associadas ao ciclo de marés) durante as quais a maioria dos indivíduos concentrava a sua atividade: preia-mar diurna e baixa-mar noturna. A possível explicação para este comportamento já foi discutida em outros artigos (exemplos dados em Santini et al., 2004), sendo a razão principal evitar o período onde os seus predadores estão ativos (no caso dos caranguejos e estrelas-do-mar durante a noite e das aves durante o dia). Outro motivo mencionado para explicar a não ocorrência de atividade durante a baixa-mar diurna foi a indução de stress físico, causando a dessecação.

A espécie intertidal *Patella depressa* está sujeita diariamente à variação de diversos fatores físicos e biológicos, a qual poderá ter efeitos ao nível da distribuição e ecofisiologia das populações. Localizada numa zona caracterizada por variações extremas de parâmetros físico-químicos e biológicos e tendo esta espécie mobilidade reduzida, torna-se importante analisar a tolerância e sobrevivência destes organismos semi-sésseis. Estudos anteriores indicam que a temperatura ambiental nos limites de distribuição vertical desta espécie poderá estar associada a variações espaciais da abundância nesses limites (Nobre, 2012). Para além da variação térmica diária, a sazonal tem também impacto nas temperaturas internas destes organismos. No inverno, esta espécie alterna entre temperaturas relativamente elevadas no mar e temperaturas muito baixas quando expostas ao ar, acontecendo o oposto no verão, época esta em que as temperaturas do ar são normalmente superiores às temperaturas do mar (Davies, 1970). Estudos revelaram que a exposição a estes extremos de temperatura atmosférica é a causa para grandes eventos de mortalidade (Helmuth & Hofmann, 2001). A constante variação de temperatura na zona intertidal afeta especialmente as lapas, pois consoante a altura do dia associada ao ciclo de marés, estes vivem alternadamente expostos ao ar ou submersos em água, sendo estes dois meios com características térmicas muito diferentes – o que potencialmente poderá causar stress térmico. Para contornar as adversidades e sobreviver num ambiente em constante variação, estes organismos possuem estratégias a nível comportamental, morfológico e fisiológico.

Cada organismo adapta-se de forma diferente às condições envolventes, e por isso, cada espécie tem valores de temperaturas óptimos e letais distintos ainda que habitando a mesma zona (Somero, 2002). Existe literatura descrevendo exemplos dos tipos de adaptações e estratégias de regulação da sua temperatura em patelogastrópodes. Estratégias a nível comportamental incluem reorientação do seu corpo e deslocação para microhabitats

favoráveis. Outro comportamento conhecido nas lapas é o denominado *mushrooming*, que consiste na elevação da concha para permitir a evaporação e consequente arrefecimento do corpo. Já os exemplares dispostos perto do limite superior apresentam maior capacidade de retenção de água entre marés. As características morfológicas da concha também influenciam o controlo sobre as trocas de calor – as conchas possuem uma forma cónica, que pode variar em cor, tamanho, altura e textura. Estudos indicam que estes atributos são plásticos e podem-se alterar (como o caso do aumento da altura, diminuindo a área exposta à radiação solar) se as lapas forem transplantadas para um ambiente diferente (Shotwell, 1950; Branch, 1985; Harley et al., 2009). A nível fisiológico, estes animais conseguem alterar as suas taxas metabólica e cardíaca, assim como o fluxo sanguíneo (Branch, 1985).

Existem diversos métodos que permitem quantificar e analisar a resposta fisiológica das lapas face às condições ambientais e possível stress físico (e.g., Williams et al., 2011; Pulgar et al., 2012; Bjelde & Todgham, 2013; Prusina et al., 2014). O rácio RNA:DNA é um dos indicadores bioquímicos utilizados nas análises de stress e metabolismo, já tendo sido aplicado em investigações relacionadas com outras espécies marinhas, como por exemplo em bivalves (ver Chícharo et al., 2001; Dalhoff, 2004). Este índice da condição ecofisiológica permite averiguar a relação entre o organismo e o ambiente circundante, em habitat natural; sendo representativo da condição nutricional e da atividade metabólica, que regulam outros parâmetros como o crescimento dos indivíduos, aquando da recolha das amostras em campo (Buckley, 1984; Chícharo & Chícharo, 1995; Buckley et al., 1999; Dahlhoff, 2004). A teoria associada a esta técnica explica que o DNA (portador da informação genética) mantém-se preservado mesmo quando exposto a condições ambientais stressantes enquanto a quantidade de RNA varia, perturbando assim a síntese proteica (Chícharo & Chícharo, 1995; Dahlhoff, 2004).

## **2 OBJETIVOS**

Este trabalho foi delineado com o intuito de compreender padrões associados ao gradiente de distribuição vertical de lapas da espécie *Patella depressa* e estudar processos explicativos desses padrões. Houve um particular interesse nos potenciais efeitos da temperatura na distribuição vertical da espécie, tendo as tarefas sido maioritariamente

realizadas durante a época de maior calor (fins de primavera e verão) – a altura em que seriam expectáveis variações térmicas mais extremas – e focadas no limite superior – região onde possivelmente se sentiriam mais essas mudanças.

Os dois objetivos gerais desta tese são: **(1) observação de padrões existentes na área de estudo relacionados com a distribuição** e ecologia da espécie (identificação dos limites de distribuição vertical; variação da abundância, movimento e condição fisiológica em diferentes níveis verticais e a sua relação com a temperatura a que as lapas estão sujeitas nestes níveis) e **(2) análise de processos possivelmente associados aos padrões identificados** (sobrevivência, crescimento e condição ecofisiológica). No âmbito do primeiro objectivo geral foram realizados estudos de carácter descritivo, enquanto o segundo objectivo geral foi abordado através de uma série de experiências manipulativas *in situ*. As principais questões e hipóteses de estudo encontram-se descritas seguidamente.

## 1. Padrões

- (a) Há variação sazonal na altura do limite superior e inferior de distribuição vertical da espécie? Espera-se que no inverno o limite superior destes organismos se encontre mais acima devido potencialmente às tempestades e a um ambiente mais húmido em geral e que na época de maior calor baixe (em relação à altura do zero hidrográfico). No entanto, não se esperam alterações no limite inferior porque, independentemente da estação, este encontra-se sempre próximo do mar.
- (b) Existem diferenças significativas na abundância de *P. depressa* entre níveis verticais? Observações preliminares sugerem que no nível superior existe uma menor densidade de lapas comparativamente com o nível médio e que a estrutura dimensional poderá variar entre níveis.
- (c) Os padrões de movimento de lapas desta espécie que ocorrem em substrato emerso variam entre os níveis verticais médio e superior? A hipótese é que no nível médio a maioria dos exemplares se mantem neste tipo de habitat, enquanto no nível superior, nos períodos de temperatura mais alta haverá uma maior frequência de mudança de habitat (deslocações para procura de locais potenciais de refúgio, como poças e frestas) por parte das lapas.
- (d) Existe relação entre os padrões biológicos observados e a variação espacial e temporal da temperatura média, mínima e máxima registada em diferentes níveis da distribuição vertical da espécie?

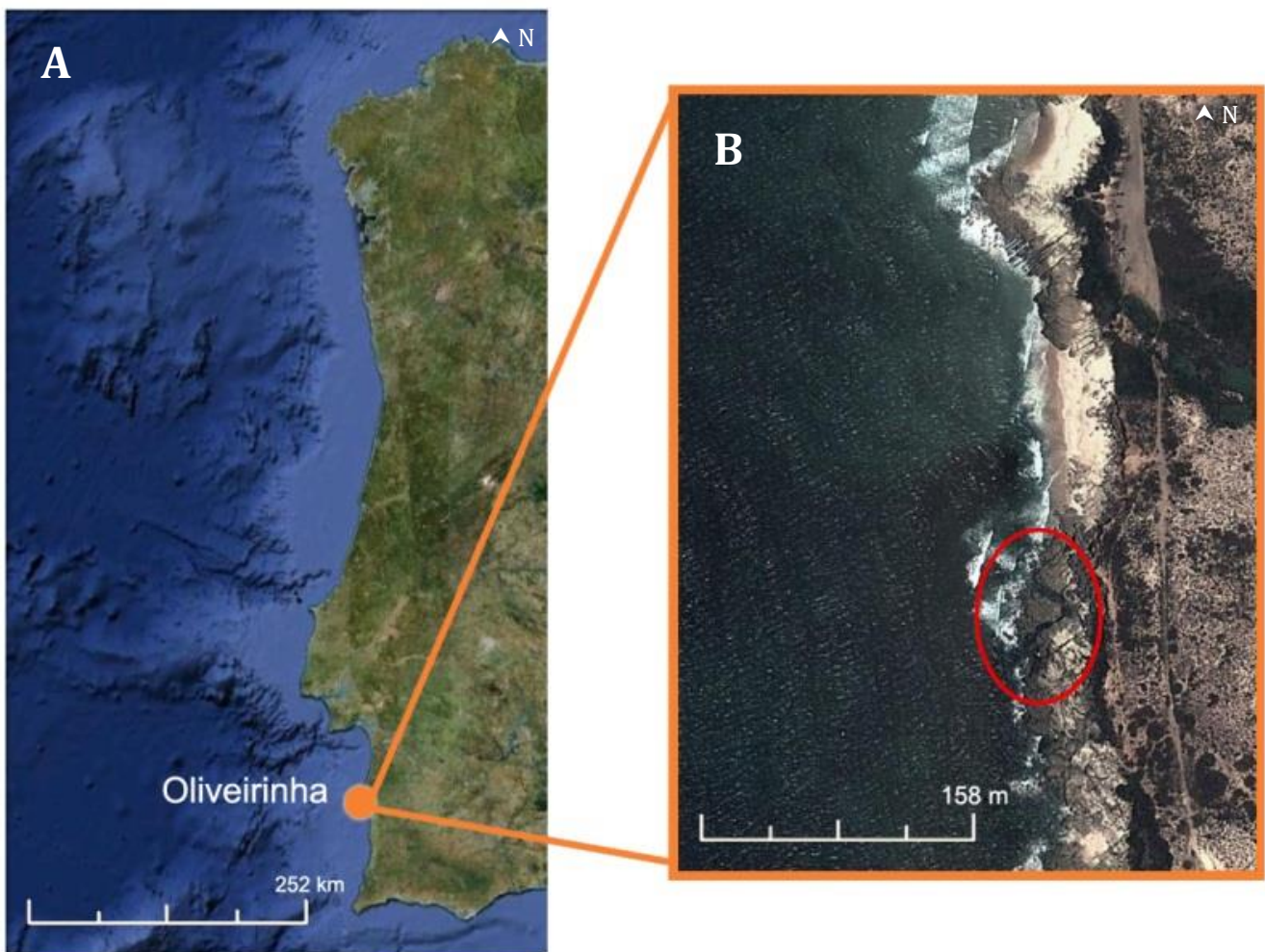
## 2. Processos

- (a) Estudo descritivo de caracterização térmica e de abundância das áreas experimentais.
- (b) A sobrevivência de *P. depressa* difere entre níveis verticais? E se sim, essas diferenças de sobrevivência entre níveis verticais são consistentes entre lapas de diferentes tamanhos? Hipótese biológica: *P. depressa* terá uma percentagem de sobrevivência maior no nível médio do que perto do limite superior da sua distribuição e do que no nível extremo (acima do limite superior desta espécie). No extremo dever-se-á obter a mortalidade mais elevada dos três níveis. Em termos de classes dimensionais, espera-se que as lapas maiores sejam mais resistentes que as lapas pequenas.
- (c) O crescimento de *P. depressa* varia entre níveis verticais e com a variação da densidade intraespecífica? Qual o método mais adequado para detetar incremento nesta espécie? Espera-se que as lapas existentes no nível médio tenham um maior crescimento comparativamente com as do superior. Também se esperam diferenças nos valores de crescimento entre os tratamentos com diferentes densidades no nível médio; nas jaulas em que se encontrar apenas uma lapa espera-se obter um maior crescimento porque estará sob melhores circunstâncias que os exemplares que partilharem a mesma área com mais lapas (e.g., terão uma área maior potencial de alimentação).
- (d) A condição ecofisiológica de *P. depressa* varia entre diferentes níveis verticais? E se sim, quanto tempo é necessário para se verificarem essas diferenças? Hipótese para a primeira questão: as lapas presentes no nível médio apresentam uma melhor condição ecofisiológica do que os exemplares existentes no nível superior da distribuição desta espécie. O nível extremo (acima do limite superior desta espécie) mostrará a pior condição ecofisiológica dos três níveis.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. ÁREA DE ESTUDO

A execução prática deste trabalho decorreu na zona intertidal rochosa da costa sudoeste portuguesa, na Praia da Oliveirinha localizada no concelho de Sines ( $37^{\circ}53' N$   $8^{\circ}48' W$ ) (Cruz, 1999) (Figura 3.1A). Neste local, o regime de marés é semi-diurno e o seu espetro de variação (amplitude de alturas relativamente ao zero hidrográfico) não ultrapassa os 3.5 – 4 metros (Araújo et al., 2005).



**Figura 3.1** – Localização da Praia da Oliveirinha. (A) Vista geral, com indicação da posição da região de estudo em relação à costa portuguesa; (B) Destaque para a área (assinalado a vermelho) em particular onde decorreram as experiências. Fonte: Google Earth

Nesta área é comum a espécie de estudo (Nobre, 2012), sendo considerada uma praia natural com características pertinentes no contexto dos objetivos deste projeto (e.g., substratos duros intertidais – essenciais para suportar as jaulas e toda a logística envolvida na fixação das mesmas à rocha – com frestas e poças – lugares de refúgio necessários para averiguar o padrão de movimentos e deslocações das lapas ao longo do tempo) (Fig. 3.2). Este local é limitado por afloramentos rochosos, descritos como extensas plataformas de xisto com declive suave (Silva et al., 2009). Os seus níveis de hidrodinamismo são relativamente menores em comparação com a maioria dos territórios circundantes, devido à proteção relativa proporcionada pelo Cabo de Sines que se localiza a norte desta praia.

As experiências decorreram ao longo da área assinalada na Figura 3.1B, com comprimento de aproximadamente 100 metros (medição linear), durante os meses de Abril a Outubro de 2014.



**Figura 3.2** – Zona intertidal rochosa da Praia da Oliveirinha, ilustrando uma porção da área onde decorreram os diversos estudos efetuados.

### 3.2. LIMITES DA DISTRIBUIÇÃO VERTICAL

Ao longo da área de estudo foram identificados os limites superior e inferior de distribuição vertical, com base na posição dos exemplares da espécie relativamente ao nível do mar.

Em Março foram escolhidos aleatoriamente, e em perpendicular com o mar, diversos transectos nos quais se procurou a última lapa existente na parte inferior e na superior do transecto. Quando não eram encontradas mais lapas, era efetuada uma delimitação com etiqueta feita à base de cola resistente à água, calor e ondulação (*Z-Spar Splash Zone Epoxy Compound*) nesse ponto (Fig. 3.3). Em Julho, utilizando como referência os pontos marcados em Março, repetiu-se o processo, marcando a cota de verão rente à rocha, nas mesmas áreas onde estavam as dispostas as etiquetas de inverno (identificados de forma equivalente, e.g., I1 e V1 correspondem às cotas de inverno e de verão, respetivamente, para o primeiro transecto amostrado). Realizaram-se medições em dois períodos distintos durante 2014, no inverno marítimo (onde ainda podem ocorrer esporadicamente tempestades, etc.) e no verão (clima seco e quente), de forma a ser possível uma comparação sazonal intra-anual.

A obtenção das altitudes dos pontos considerados foi conseguida utilizando um nível topográfico automático (Sokkia C330), que possui uma precisão de 2mm, apoiado num tripé. O nível foi mantido na mesma posição (colocado no cimo de uma rocha da qual fosse possível visualizar todos os pontos), enquanto uma régua graduada era deslocada e colocada sobre a marca de cada ponto, apontando-se o valor lido através da luneta. Aquando do início das medições, registou-se a hora e também a altura a que se encontrava o nível do mar. Para se obter a altura de cada ponto observado em relação ao zero hidrográfico (referente ao nível médio do mar) calculou-se a diferença entre a altura do nível do mar (registada em campo) a cada ponto e posteriormente adicionou-se o valor da altura da água previsto para o porto de Sines para a hora de cada data (utilizando os dados cedidos pelo Instituto Hidrográfico).

Com os valores obtidos calculou-se a altura média de cada limite tanto no inverno marítimo como no verão. Para assegurar a independência de dados, o conjunto de pontos de cada nível (sete no inferior e dez no superior) foi aleatoriamente dividido em dois grupos; num grupo foram utilizados os valores de verão e no outro os de inverno para a comparação temporal das alturas. Foi também subtraído aos valores de inverno os de verão, desta vez utilizando os dados na totalidade, com a finalidade de comparar o diferencial entre estações de cada nível para compreender se a alteração do limite populacional ocorre em igual proporção.



**Figura 3.3** – Exemplificação do processo de marcação do limite inferior da distribuição vertical. Círculos assinalam as últimas lapas da espécie *P. depressa* avistadas e a seta indica a posição da marca feita de cola (utilizada como referência para medir a altura em relação ao zero hidrográfico).

### 3.3. PADRÕES DE ABUNDÂNCIA

Foi também analisada a densidade de *Patella depressa* nos níveis de estudo. A estimativa da abundância desta espécie foi conseguida através da contagem de indivíduos por uma área específica.

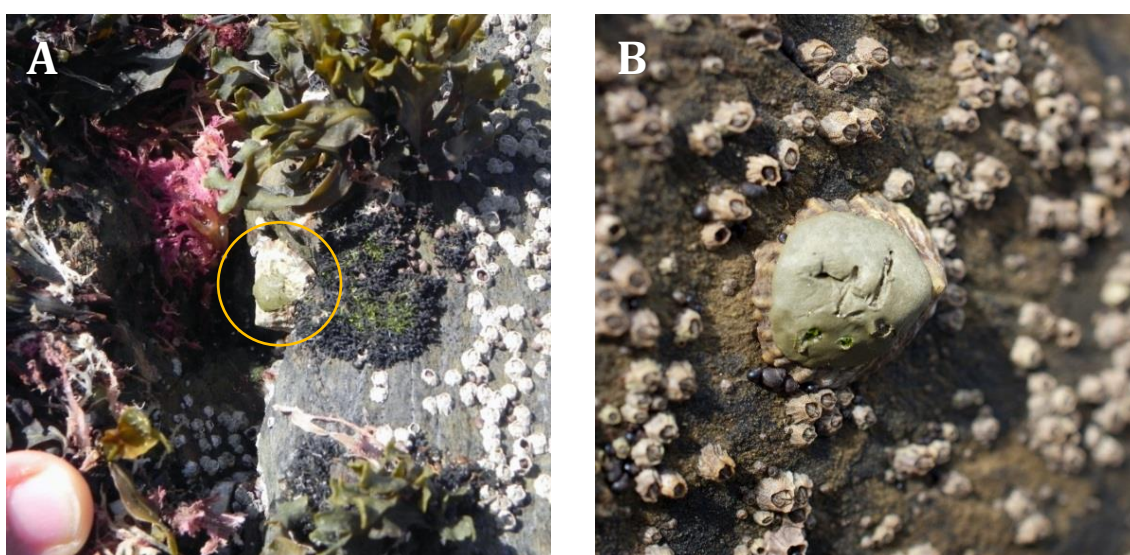
Para a tarefa referente à observação de padrões existentes na Praia da Oliveirinha, relacionados com a distribuição vertical, contabilizou-se o número total de indivíduos desta espécie contidos num quadrado de 50x50cm (ou 0.25m<sup>2</sup>), tendo sido realizadas seis réplicas no nível médio e outras seis no superior. Em cada réplica, com a ajuda de uma craveira, foi categorizado cada exemplar amostrado numa das quatro classes dimensionais consideradas – inferior a 1 cm, entre 1 e 2 cm, entre 2 e 3 cm e, por último, superior a 3 cm.

O estudo da abundância foi repetido para um habitat específico (emerso) e utilizando duas classes dimensionais mais abrangentes (inferior e superior a 2cm) para caracterizar as áreas experimentais, pois estes foram os dois critérios empregados nas experiências manipulativas relacionadas com os processos. Foram consideradas, para réplicas, as jaulas utilizadas nas experiências – com dimensões 20x20cm (ou 0.04m<sup>2</sup>) – que correspondem a uma área mais pequena que alberga apenas o habitat de interesse, isolando este dos restantes.

Para isso, registaram-se as lapas contidas numa porção de jaulas (23 para a região do médio, 10 para o superior e 10 para o extremo), separando-as pelas categorias de tamanho.

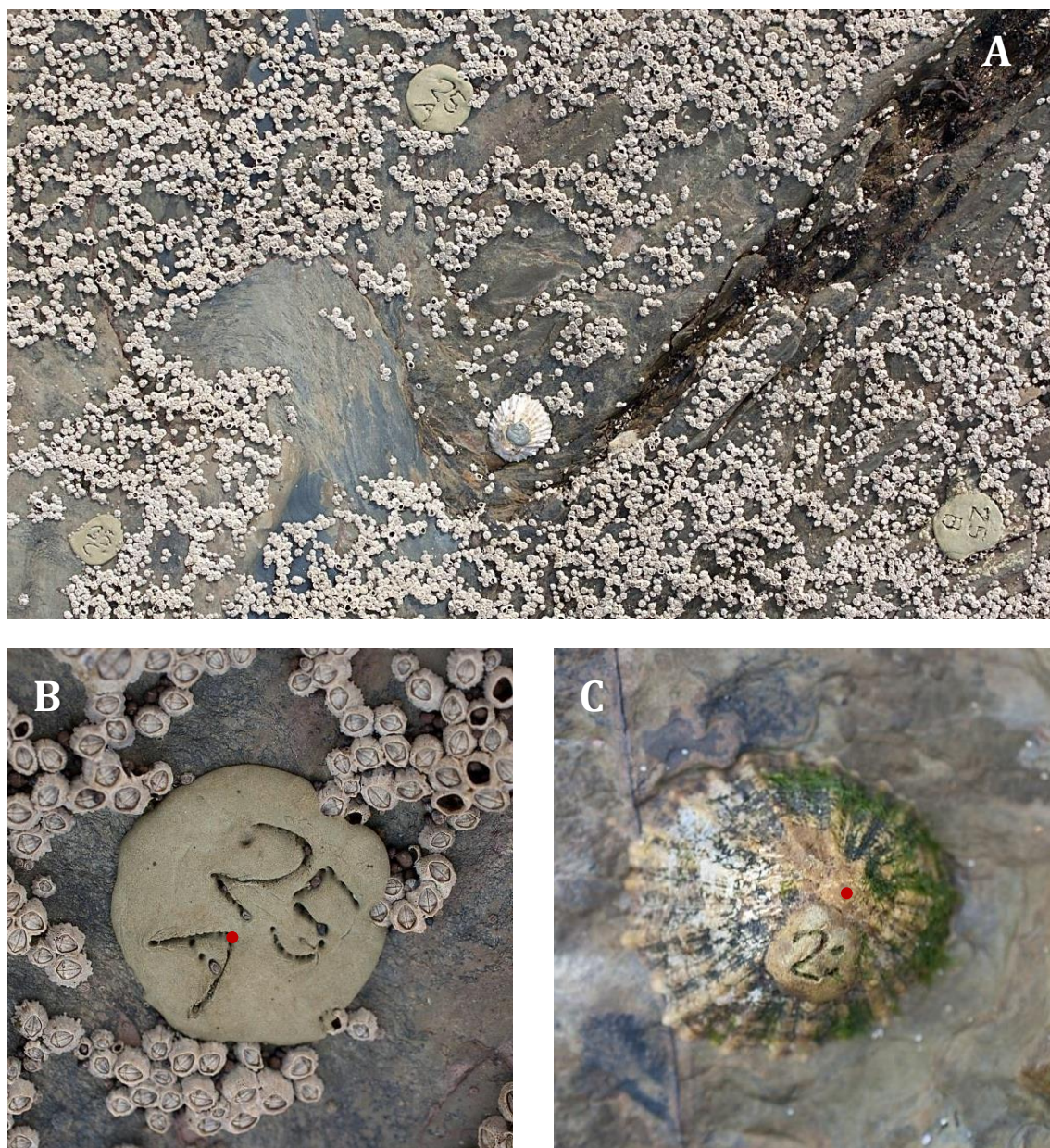
### 3.4. MOVIMENTOS DE LAPAS

Com o objetivo de compreender os padrões de movimento da espécie *Patella depressa*, foram marcados em campo exemplares desta espécie, em habitat emerso, utilizando a cola *Z-Spar Splash Zone Epoxy Compound* (cada um com um código individual). Para esta marcação foram selecionadas aleatoriamente lapas adultas (tamanho médio  $26.4 \pm 4.63$  mm) presentes em dois níveis da distribuição vertical da espécie – nível médio (onde a espécie ocorre em maior abundância) e nível superior (particularmente as lapas encontradas junto ao limite superior de distribuição da espécie nesta área). Os indivíduos marcados foram seguidos durante o período de 07 de Abril a 10 de Dezembro de 2014, com periodicidade variável entre 1 a 5 semanas (sendo o intervalo semanal o mais habitual), tendo sido realizada uma monitorização final 12 semanas após a amostragem de 10 de Dezembro (Tabela 3.1). Em cada data de amostragem foi registada a posição e habitat de ocorrência de cada lapa marcada presente. Os habitats identificados foram categorizados como emerso (habitat predominante em zonas de rocha com pouca heterogeneidade, as lapas desta categoria encontram-se expostas à radiação incidente) ou potenciais locais de refúgios (especificando qual o tipo de refúgio: em fresta, à sombra, na margem de poça, totalmente submersa na poça ou dentro de cavidades na rocha) (Fig. 3.4).



**Figura 3.4** – Um exemplar, marcado no nível médio da distribuição vertical, localizado em dois tipos de habitat distintos ao longo do período do estudo dos padrões de movimentos da espécie *P. depressa*. (A) No refúgio, em fresta coberta por algas (24-Maio-2014); (B) Em local emerso e exposto ao sol (27-Outubro-2014).

Cada lapa marcada foi delimitada por etiquetas feitas à base de cola *Epoxy* (formando um triângulo, com a lapa posicionada ao centro) que seriam utilizadas como pontos de referência nas medições executadas em cada monitorização (processo explicado seguidamente). Cada conjunto de pontos foi designado por A, B e C, com o número da lapa correspondente (Fig. 3.5).



**Figura 3.5** – (A) Exemplo de uma lapa marcada no nível superior, em ambiente emerso, e respetivo conjunto de pontos de referência utilizados nas medições de deslocação. (B) Destaque para uma das colas de referência, com o ponto onde era efetuada a medição assinalado a vermelho. (C) Focagem numa das lapas do estudo, onde se evidencia o código individual identificativo, com o ponto onde era efetuada a medição – assinalado a vermelho.

A distância mínima percorrida entre datas de amostragem sucessivas foi obtida através da realização dos passos abaixo mencionados e esquematizados na Fig. 3.6:

1. Foram inicialmente mensuradas as distâncias, em centímetros, entre cada par de etiquetas [pontos de referência] ( $d_{AB}$ ,  $d_{AC}$ ,  $d_{BC}$ );
2. Em cada data de amostragem mediram-se as distâncias compreendidas entre a lapa marcada a cada ponto de referência, utilizando uma fita métrica (com precisão de  $\pm 0.5\text{cm}$ ). Estas medições foram efetuadas entre regiões específicas da lapa e das etiquetas (também demonstradas na Fig. 3.5B,C);
3. Aplicou-se o método de localização por trilateração, que permite determinar a posição de um objeto, usando um algoritmo, com base na sua distância a três pontos conhecidos. Para tal, utilizou-se um sistema de coordenadas no plano cartesiano com os três pontos de referência e as distâncias medidas (esquema integrador do sistema de coordenadas e deslocações em Anexo A):
  - a. Foram atribuídas coordenadas conhecidas aos pontos A(0,0) e B( $d_{AB}$ ,0) e, utilizando as equações (1) e (2), determinaram-se as coordenadas do ponto C( $i$ , $j$ );
  - b. Calcularam-se as coordenadas do indivíduo para cada data, com base nas distâncias da lapa a cada ponto de referência ( $d_A$ ,  $d_B$ ,  $d_C$ ) nessa data e as coordenadas desses pontos de referência [Eq. (3), (4)].

$$i = (d_{AB}^2 + d_{AC}^2 - d_{BC}^2)/(2 \times d_{AB}) \quad (1)$$

$$j = \sqrt{d_{AC}^2 - i^2} \quad (2)$$

$$x = (d_A^2 - d_B^2 + d_{AB}^2)/(2 \times d_{AB}) \quad (3)$$

$$y = [(d_A^2 - d_C^2 + i^2 + j^2)/(2 \times j)] - (i/j \times x) \quad (4)$$

4. A distância, em centímetros, entre as posições da lapa em duas datas consecutivas foi obtida aplicando a fórmula da distância utilizada nos estudos de geometria analítica (derivada do Teorema de Pitágoras) [Eq. (5)] sobre as coordenadas dos pares ordenados (etapa 3.b).

$$dt_1t_2 = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2} \quad (5)$$

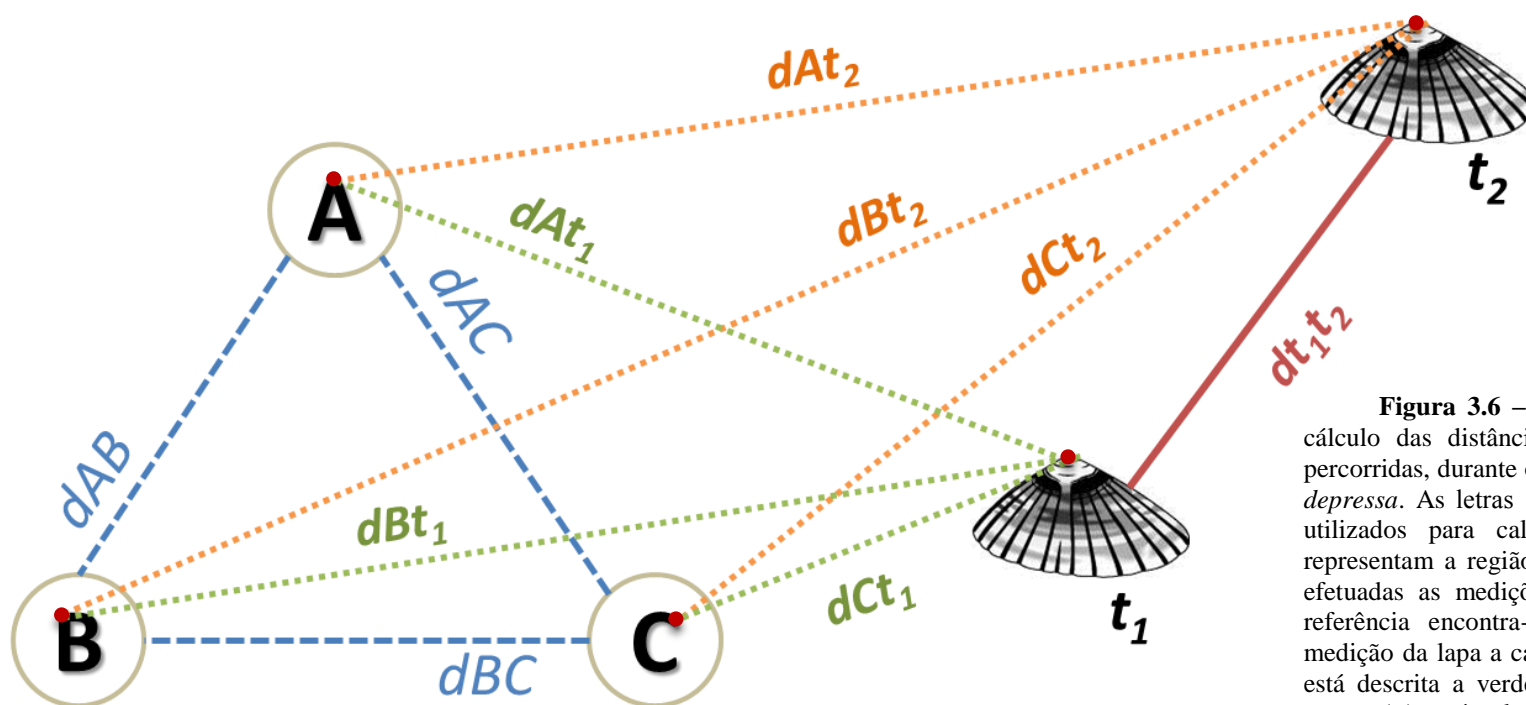
sendo,  $(x_1, y_1)$  – Posição da lapa na primeira data (ou  $t_1$ )  
 $(x_2, y_2)$  – Posição da lapa na segunda data (ou  $t_2$ )  
 $dt_1t_2$  – Distância entre posições / percorrida pela lapa entre datas

Os valores finais obtidos pelo cálculo da trilateração (distância mínima percorrida pela lapa entre duas datas consecutivas) foram separados em três categorias de movimento: lapas paradas, em rotação e em deslocação. Estes grupos foram definidos com base nos seguintes critérios: lapas foram consideradas paradas até movimentos inferiores a 1cm (valor correspondente ao erro de precisão da fita métrica maior utilizada nas medições); movimentos entre 1 e 3.5cm retratavam organismos em rotação (este último comprimento corresponde ao tamanho máximo encontrado entre o conjunto de lapas estudado) – este movimento “intermédio” foi criado com base nas observações em campo, quando a lapa por vezes aparentava estar no mesmo sítio mas tinha rodado a sua posição; e, por fim, movimentos superiores a 3.5cm foram declarados como deslocações significativas. (distância mínima de deslocação registada) É de salientar que esta última categoria corresponde à distância entre as posições de duas datas de amostragem sucessivas, sendo por isso considerada sempre como a distância mínima de deslocação (no entanto para facilitar a descrição dos resultados será daqui em diante mencionada como apenas distância [de deslocação]).

Para os movimentos “paradas” e “em rotação” foi analisada a percentagem, em relação ao número total de lapas presentes, em cada par de datas consecutivas, assim como a distribuição do número de exemplares de cada tipo de movimento pelos dois tipos de habitat gerais considerados (i.e., a frequência de ocorrência das lapas num determinado habitat) para cada nível (médio e superior). Foi calculada a distância média percorrida, em centímetros, e apresentada a frequência de transição de habitats, em cada nível, em cada par de datas de amostragem. Também para as lapas em deslocação, as distâncias registadas foram agrupadas a uma escala mensal para uma comparação sazonal e incluir uma perspectiva mais abrangente do padrão (já que assim torna-se possível incluir os registos obtidos entre Abril e Outubro), assim como foi calculado um valor médio total de todas as distâncias percorridas para comparação entre níveis.

**Tabela 3.1** – Número de lapas presentes (das marcadas para a experiência das deslocações) em cada data de amostragem, por nível. As datas de monitorização realizaram-se durante o ano de 2014, com a exceção da última data (05-Março) que pertence a 2015.

NÍVEL	Data marcação	N.º inicial lapas	DATAS DE MONITORIZAÇÃO																							
			08 Mai	22 Mai	29 Mai	05 Jun	12 Jun	19 Jun	26 Jun	03 Jul	10 Jul	17 Jul	24 Jul	31 Jul	07 Ago	14 Ago	21 Ago	28 Ago	05 Set	09 Out	23 Out	06 Nov	11 Dez	05 Mar		
Médio	07-Abr	13	13	13	13	13	13	12	12	10	10	9	8	8	8	7	7	7	7	4	3	3	3	3		
	08-Mai	1	–	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0		
Superior	07-Abr	24	18	17	17	17	16	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	12	12	6	6	5	2	2		
	08-Mai	9	–	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	7	7	7	5		



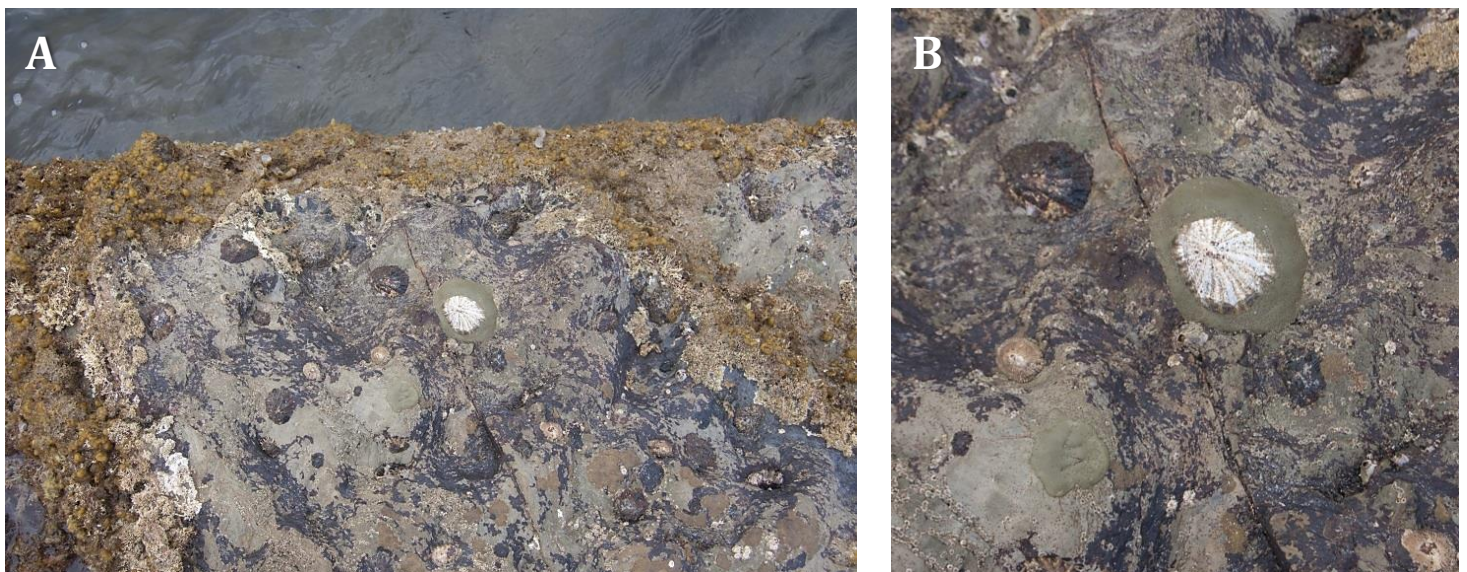
**Figura 3.6** – Esquemática das medições realizadas e do cálculo das distâncias percorridas, para determinar as distâncias percorridas, durante o estudo dos movimentos em lapas da espécie *P. depressa*. As letras ‘A’, ‘B’ e ‘C’ indicam os pontos de referência utilizados para calcular as distâncias. Os círculos vermelhos representam a região das etiquetas e da lapa a partir da qual eram efetuadas as medições. A distância entre cada par de pontos de referência encontra-se a azul ( $d_{AB}$ ,  $d_{AC}$ ,  $d_{BC}$ ). Exemplo: A medição da lapa a cada ponto de referência para a primeira data ( $t_1$ ) está descrita a verde ( $d_{At_1}$ ,  $d_{Bt_1}$ ,  $d_{Ct_1}$ ), enquanto para o segundo tempo ( $t_2$ ) está a laranja ( $d_{At_2}$ ,  $d_{Bt_2}$ ,  $d_{Ct_2}$ ). A distância percorrida pela lapa entre as duas datas consecutivas (obtida através do cálculo por trilateração) encontra-se a vermelho ( $dt_{1t_2}$ ).

Fonte da imagem da lapa: <http://www.sciwebhop.net>

### 3.5. TEMPERATURA ASSOCIADA AOS NÍVEIS DE DISTRIBUIÇÃO

Registaram-se as temperaturas na área de estudo, através da colagem de termómetros à rocha com *Epoxy*, com o intuito de caracterizar o ambiente térmico por nível (descrição e definição dos níveis na seção 3.6). Foram colocados dois termómetros por nível, metade no lado sul e a outra parte no lado norte da área onde foram inseridas as diversas experiências.

Para a obtenção destes dados criaram-se modelos biomiméticos de lapas (“robolapas”), onde foram utilizados *DS1922L iButtons* (chips de computador selados em cápsulas de aço inoxidável) inseridos em conchas de lapas preenchidas com silicone transparente (adaptado de Helmuth & Hofmann, 2001) (Figura 3.7). Estudos anteriores (ver Lima & Wethey, 2009) indicam que modelos biomiméticos semelhantes ao utilizado neste trabalho permitem a impermeabilização do equipamento electrónico e a medição de um *proxy* da temperatura corporal dos organismos intertidais.



**Figura 3.7** – “Robolapa” colada numa rocha da zona do limite inferior, na zona intertidal. (A) Panorama geral, com robolapa junto de lapas da espécie em estudo. (B) Ampliação para a posição exata da robolapa.

Os *iButtons* foram previamente programados para registar a temperatura *in situ* a cada 32 minutos durante três meses (período máximo de colheita de dados que se consegue obter devido à capacidade de memória do aparelho). Como as medições decorreram durante período de 16 de Abril de 2014 a 11 de Janeiro de 2015 (aproximadamente 9 meses), foram colocadas três séries de termómetros (Tabela 3.2). No entanto, não se conseguiu extrair a informação de todos os termómetros recolhidos porque alguns esgotaram a bateria enquanto fixos na praia – por esta razão, nem todos os transectos possuem informação relativa ao intervalo de tempo

das três séries (Tabela 3.3). Tanto a programação como o descarregamento dos dados foram efetuados através do *software* ExpressThermo™ 2007 Basic v2.11.5.100.

**Tabela 3.2** – Especificações de cada série de termómetros colocada na área de estudo. Discriminação do número de termómetros ativos recolhidos em cada nível, assim como as datas de início e de fim do registo de temperaturas.

<b>N.º Série</b>	<b>Nível</b> (n.º termómetros)	<b>Data inicial</b>	<b>Data final</b>
1	Extremo (2)	16-Abr-2014	16-Jul-2014
	Superior (2)	16-Abr-2014	16-Jul-2014
	Médio (2)	16-Abr-2014	16-Jul-2014
2	Extremo (2)	16-Jul-2014	10-Out-2014
	Superior (2)	16-Jul-2014	Norte 15-10-2014 Sul 10-10-2014
	Médio (1)	16-Jul-2014	15-Out-2014
3	Extremo (1)	10-Out-2014	08-Jan-2015
	Superior (1)	15-Out-2014	11-Jan-2015
	Médio (1)	22-Out-2014	08-Jan-2015

Com base nos valores obtidos foram analisadas as temperaturas médias diárias e seleccionadas as temperaturas mínima e máxima registadas diariamente em cada transecto, para todas as séries, no âmbito da caracterização do ambiente térmico e estudo dos padrões ocorrentes nos níveis médio e superior da distribuição desta espécie.

Também se examinaram as temperaturas nos três níveis utilizados nas experiências manipulativas para o período específico em que estas aconteceram, com o objetivo de comparar as diferenças térmicas sentidas e associar a temperatura aos dados resultantes das experiências da sobrevivência de lapas. Os valores de entre 01 de Maio e 09 Outubro de 2014 foram acoplados por níveis (em vez de transectos, obtendo-se três conjuntos de dados) e analisados a uma escala semanal (a mesma utilizada nas experiências). Calculou-se a temperatura média e seleccionaram-se as temperaturas mínima e máxima registadas em cada semana por nível. Também se determinou o valor médio do diferencial semanal entre a temperatura mínima e máxima durante este período. Por fim, confrontou-se cada par de níveis formulando a diferença entre as suas temperaturas mínimas, médias e máximas semanais.

**Tabela 3.3** – Enumeração das séries obtidas por transecto de cada nível.

<b>TRANSECTO</b>	<b>SÉRIES</b>
Médio Norte	1, 2, 3
Médio Sul	1
Superior Norte	1, 2, 3
Superior Sul	1, 2
Extremo Norte	1, 2, 3
Extremo Sul	1, 2

### 3.6. EXPERIÊNCIAS MANIPULATIVAS

Realizaram-se experiências de manipulação *in situ* em diferentes níveis verticais e envolvendo duas classes de tamanho da espécie *P. depressa* – inferior e superior a dois centímetros, denominadas como lapas pequenas e grandes respectivamente (Fig. 3.8). Os três níveis verticais experimentais foram: o nível médio de distribuição de *P. depressa*, o seu limite superior e o nível acima do limite superior (daqui em diante mencionado como ‘extremo’). Das manipulações exercidas, obtiveram-se informações relativas à sobrevivência, crescimento e condição ecofisiológica desta espécie.

As experiências envolveram transplantes de lapas do nível médio (zona onde existem em maior quantidade, permitindo a recolha do número necessário de lapas causando o menor impacto possível na sua distribuição) para dentro de jaulas artificiais colocadas nas rochas do intertidal, ao longo dos níveis de estudo. Os tratamentos de controlo aos transplantes foram realizados no nível médio (porque é a região de onde vêm os transplantes) em dois tipos de densidade: natural (mais de duas lapas) e sozinho (com apenas uma lapa). As lapas que foram seguidas marcaram-se com cola *Epoxy* na concha.

A experiência com lapas grandes foi composta por dois controlos no nível médio (um para cada tipo de densidade), dois transplantes neste mesmo nível (para jaulas vazias e outro para jaulas com densidade natural), um transplante para o nível superior (em apenas jaulas vazias porque não existe um número suficiente de lapas nesta zona para tratamentos experimentais em densidade natural) e outro transplante para o nível extremo (para jaulas vazias porque esta região não contém lapas).

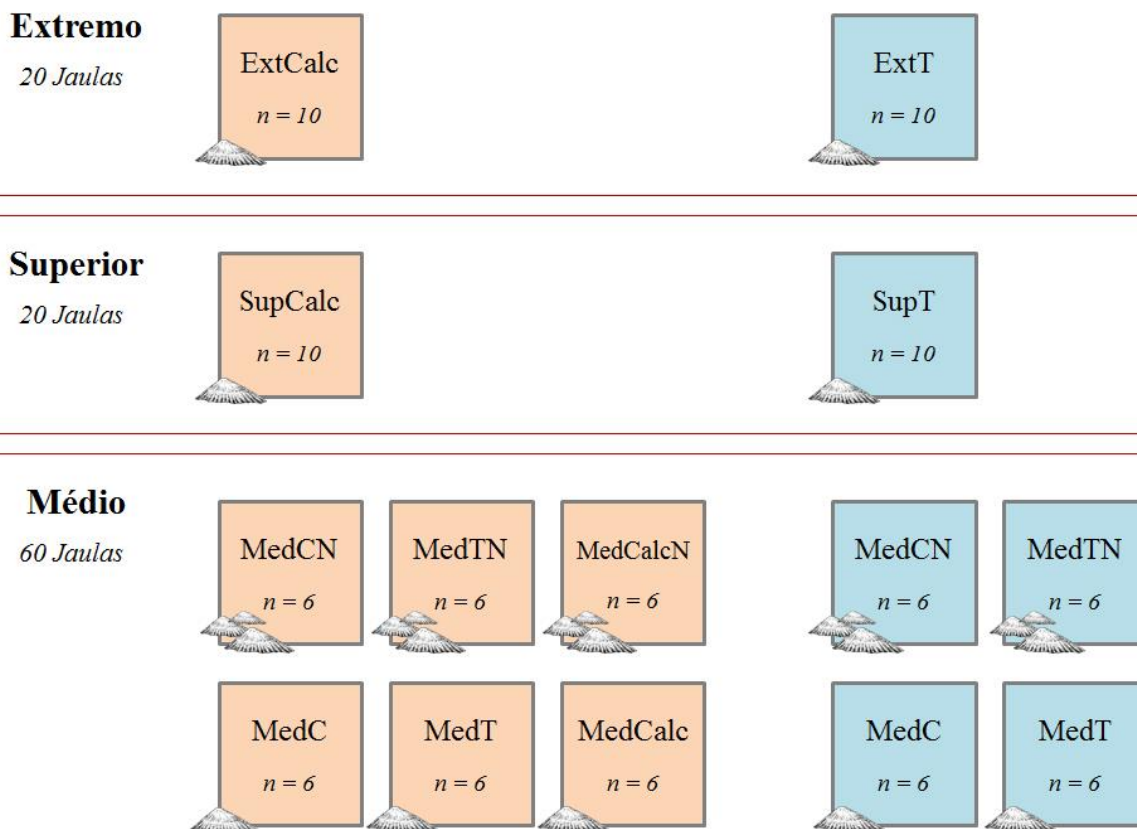
O ensaio com lapas pequenas foi semelhante aos das grandes, tendo sido feita a adição de dois tratamentos no nível médio – transplante para jaulas com lapas em densidade natural e

para jaulas vazias, com lapas marcadas com calceína (ver seção 3.7 da metodologia). Mantiveram-se os tratamentos de transplante sem calceína para servir de controle (i.e., assegurar que este componente não afeta os processos estudados – sobrevivência, etc.). Os tratamentos nos níveis superior e extremo também foram marcados com o fluorocromo por causa do estudo do crescimento.

Como se pode observar pela figura (3.8), no nível médio cada tratamento foi repetido seis vezes, enquanto nos níveis superior e extremo foram utilizadas 10 réplicas (como se espera uma maior mortalidade, aumentou-se o número para haver maior probabilidade de chegar ao fim das experiências com exemplares vivos – necessários para concluir os processos do crescimento e condição ecofisiológica).

Para o controle foi escolhida aleatoriamente uma lapa das existentes dentro da jaula, que encaixasse na gama de tamanhos pretendida; nas jaulas com densidade natural a lapa era apenas marcada com cola, para os controles sozinhos eram retiradas, caso existissem, as restantes lapas.

Para os transplantes era aplicado o mesmo método – eram removidas as lapas das jaulas com densidade ‘sozinha’ (permanecendo apenas a lapa transplantada). Os transplantes simples (i.e., os que não foram sujeitos ao banho de calceína - ver seção 3.7) foram executados ao anoitecer, em baixa-mar. Cada transplante era executado por etapas: remoção de uma lapa, livre em campo, com o auxílio de uma faca sem serrilha ou espátula; raspagem no sítio exato onde iria ser colocada a lapa para assegurar uma melhor aderência à rocha limpa; alguns minutos após o transplante, verificação da adesão da lapa à rocha. Os transplantes foram monitorizados diariamente, substituindo os que não sobreviviam até certificação de que todos os exemplares se mantiveram vivos 24 horas após a translocação. Após este período de estabilização, a lapa seria considerada morta devido aos efeitos do tratamento experimental. No caso das lapas pequenas foi adotado um processo diferente, por estas terem uma percentagem de sucesso de transplante menor (observações preliminares em campo). Foram colocadas duas lapas por jaula e estas foram seguidas durante uma semana, só repondo lapas nas jaulas em que ambos os exemplares morressem antes de perfazer 48 horas após o transplante. Ao fim de uma semana, nas jaulas que ainda existissem duas lapas era retirado um dos indivíduos.



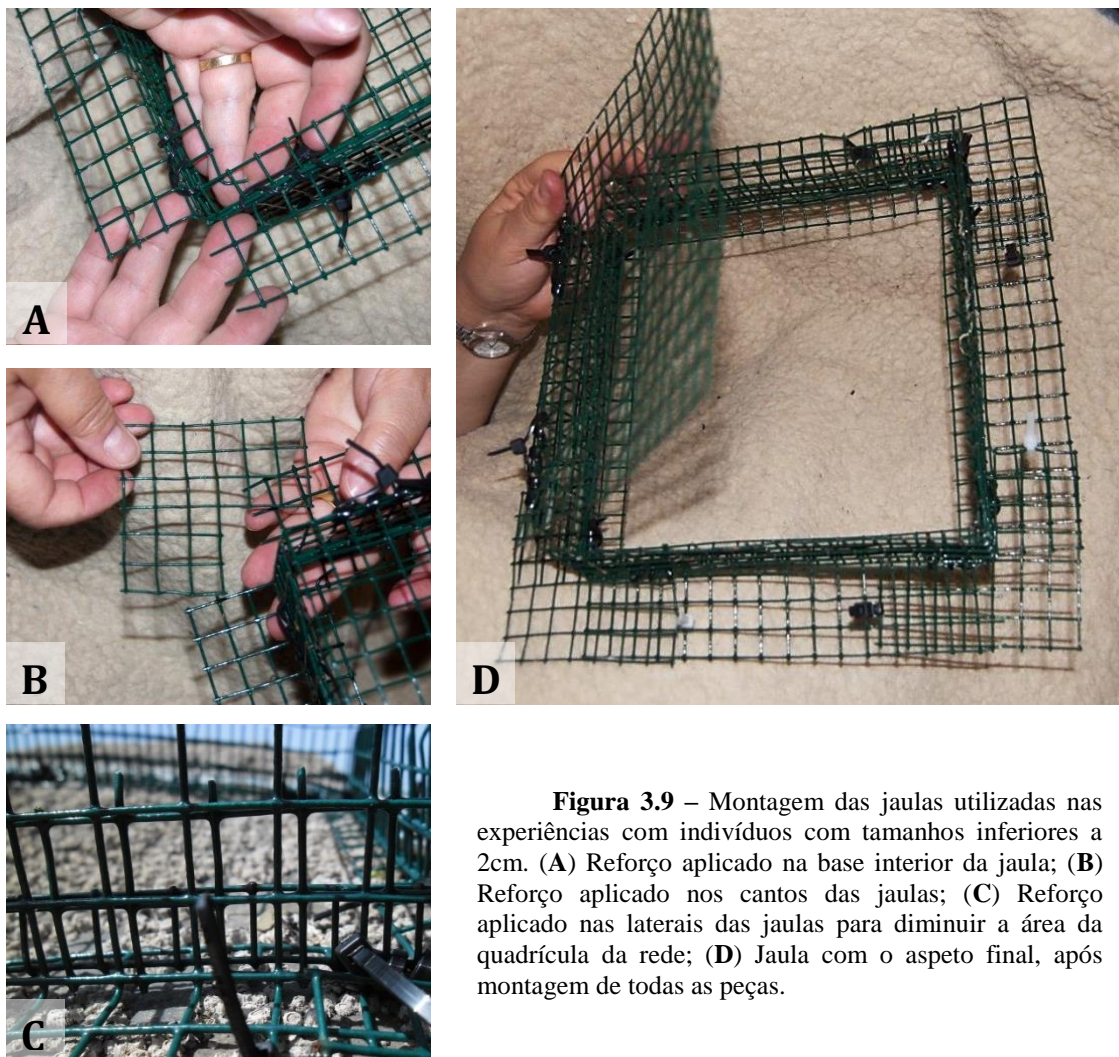
**Figura 3.8** – Esquematização das experiências manipulativas colocadas em campo, nos três níveis estudados (médio, superior e extremo). Cada quadrado representa um tipo de tratamento – preenchimento a laranja corresponde aos testes com lapas pequenas (< 2cm) e a azul representado os ensaios com lapas grandes (> 2cm). Junto à abreviatura do tratamento encontra-se especificado o número de réplicas ( $n$ ) [e.g.  $n = 6$  corresponde a 6 réplicas, que serão 6 jaulas com uma lapa marcada em cada]. **Tratamentos:** Nível médio / MedCN – controlo em densidade natural; MedTN – transplante para densidade natural; MedCalcN – transplante para densidade natural, marcado com calceína; MedC – controlo sozinho; MedT – transplante sozinho; MedCalc – transplante sozinho, marcado com calceína; Nível superior / SupT – transplante sozinho; SupCalc – igual mas marcado com calceína; Nível extremo / ExtT – transplante sozinho; ExtCalc – igual mas marcado com calceína.

As jaulas artificiais utilizadas foram construídas com um formato quadrado com comprimento e largura de 20cm (área de  $0.04\text{m}^2$ ) e uma altura de 5cm, utilizando uma rede metálica revestida por plástico (quadrícula da malha:  $1.25 \times 1.25\text{cm}$ ). Estas eram cobertas por uma tampa e fechadas com abraçadeiras de *nylon*. As jaulas utilizadas nas experiências com lapas inferiores a 2cm necessitaram de três reforços adicionais ao modelo original (usado com os indivíduos grandes) para garantir que as lapas marcadas não passavam pela malha da rede (Fig. 3.9). Para além do rebordo exterior (utilizado para fixar a jaula) foi colocado um rebordo interior, assim como foram colocados cantos de rede na base, e uma segunda placa de rede lateral para diminuir a área da quadrícula.

A rocha foi perfurada com um berbequim de percussão sem fio (Bosch PSB 14.4 V-i) e as jaulas fixadas utilizando aparafusadoras sem fio (Bosch GSR 12-2 e 14.4-2) e parafusos de aço inoxidável. As dos indivíduos grandes foram fixas com apenas um parafuso por lado,

enquanto as das lapas pequenas precisaram de 12 furos no total para assegurar que toda a base ficava rente à rocha (para as lapas não atravessarem por baixo). As jaulas das lapas pequenas também foram revestidas na base com silicone não tóxico para preencher os pequenos espaços irregulares que pudessem existir entre a jaula e a rocha.

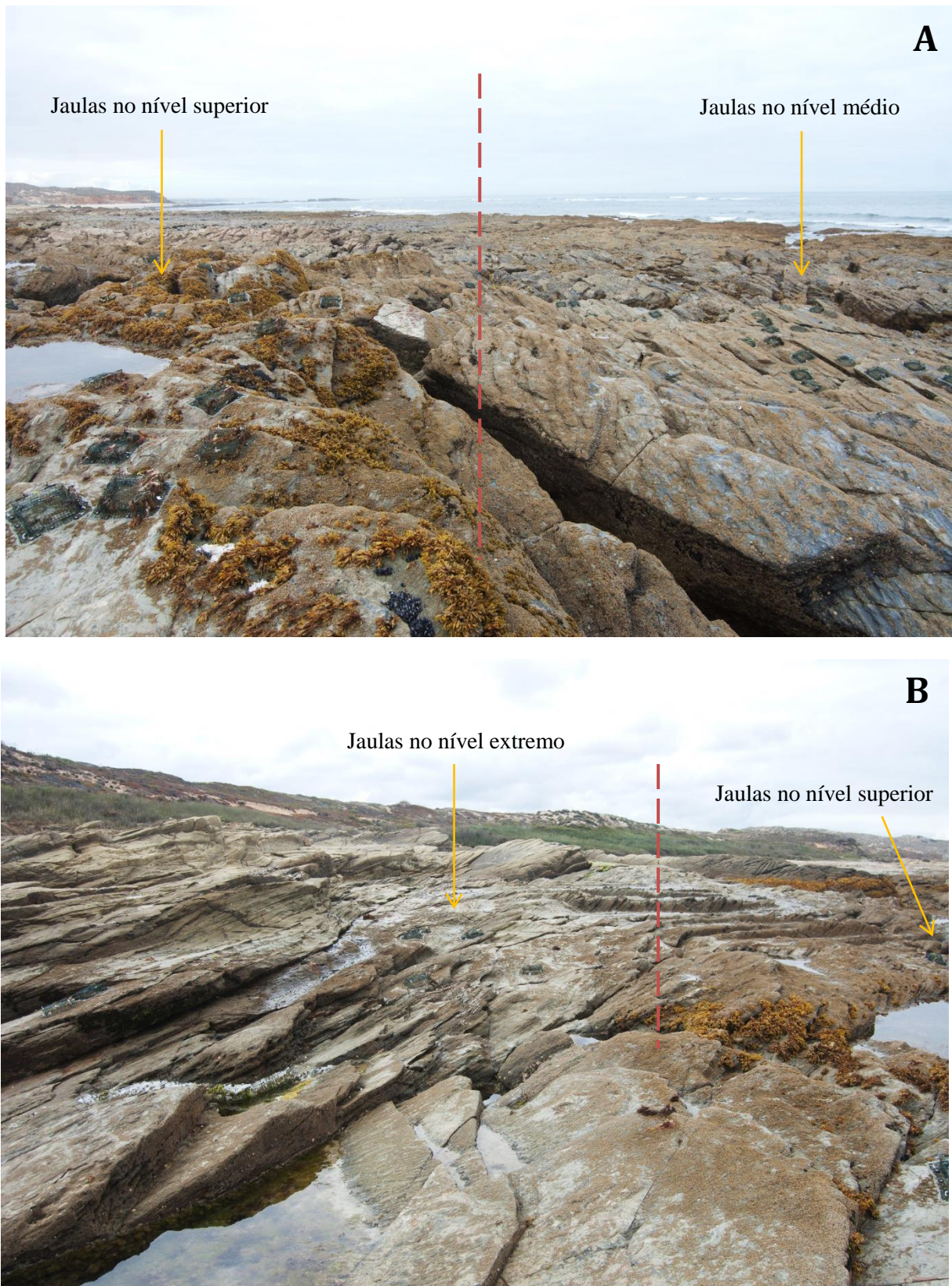
Todas as jaulas foram etiquetadas com códigos individuais contendo a primeira letra do nível onde se encontravam e o número da jaula (e.g., M23 – jaula colocada no nível médio, número 23), também foram identificadas consoante o tipo de tratamento que abrangiam através de um código de cores (utilizando abraçadeiras de *nylon*).



**Figura 3.9** – Montagem das jaulas utilizadas nas experiências com indivíduos com tamanhos inferiores a 2cm. (A) Reforço aplicado na base interior da jaula; (B) Reforço aplicado nos cantos das jaulas; (C) Reforço aplicado nas laterais das jaulas para diminuir a área da quadrícula da rede; (D) Jaula com o aspeto final, após montagem de todas as peças.

A Fig. 3.10 mostra onde foram colocadas as jaulas e o aspeto de cada nível. O nível médio foi considerado na zona de maior abundância de lapas desta espécie; o nível superior situa-se acima do nível médio, na região onde existe uma percentagem maior de rocha livre e uma menor densidade da craca *Chthamalus montagui*, assim como a ocorrência de outros organismos como a alga *Fucus* sp. e o fungo *Lichina pygmaea*; por fim, o nível extremo foi

definido imediatamente acima do limite superior da distribuição da espécie em estudo, onde não se avistam lapas.



**Figura 3.10** – Identificação da posição das jaulas, em campo, em relação a cada nível.

### 3.7. CRESCIMENTO EM LAPAS PEQUENAS

O crescimento em lapas pequenas foi medido através de dois métodos: utilizando a craveira em campo (método físico) e medição da banda de calceína em laboratório (método químico).

A experiência com estas lapas decorreu entre 10 de Julho e 09 de Outubro de 2014, tendo sido registado o tamanho inicial e final (optando sempre pelo comprimento máximo da concha, que passe pelo apex – ‘CMC’) com craveira, em campo. O procedimento seguido para o método químico foi adaptado de Jacinto et al. (2015), utilizando calceína – fluorocromo que se incorpora nas estruturas calcárias dos indivíduos em crescimento e visível sob epifluorescência.

Antes de iniciar o processo de marcação e transplante, foi criada a solução mãe da qual derivou a mistura utilizada no banho de calceína. Pesaram-se 2g da substância (calceína, Sigma-C0875), as quais foram adicionadas a 100mL de água destilada; após homogeneização da solução foi testado e ajustado o pH para 6, acrescentando bicarbonato de sódio (para aumentar a solubilidade). Estes 100mL foram diluídos em 10L de água do mar filtrada, resultando numa concentração final de 200mg /L (solução de trabalho). Esta mistura foi armazenada no frigorífico até à altura da sua utilização.

As lapas foram colhidas em campo e levadas para o laboratório em tabuleiros, na madrugada do dia em que iriam ser efetuados os transplantes simples (seção 3.6). A marcação com este fluorocromo ocorreu durante um período de 12 horas, onde as lapas estiveram submersas numa mistura de calceína com água do mar filtrada dentro de uma arca térmica, com acumuladores de frio e oxigenação através de pedras difusoras. Como são organismos móveis, os gastrópodes foram colocados dentro de recipientes (perfurados e com o fundo coberto de rede para permitir o trespasse da solução) para se manterem imersos e dentro da geleira (Fig. 3.11). Ao

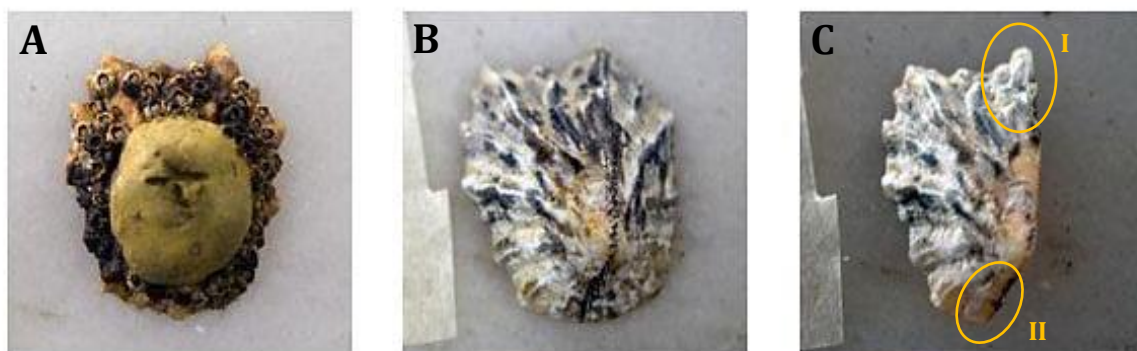


**Figura 3.11** – Exemplares da espécie *P. depressa* com dimensões inferior a 2cm, após serem retirados do banho de calceína, para serem marcados com cola e depositados dentro de jaulas na Praia da Oliveirinha.

final do dia estas lapas foram transportadas de volta para praia e colocadas nas jaulas à mesma altura que os outros transplantes durante a baixa-mar.

Em Outubro, foram recolhidos 28 exemplares sobreviventes (dum total de 52 lapas), dos quais apenas 12 pertenciam aos tratamentos com calceína. Os organismos foram congelados para posterior análise.

As lapas marcadas foram sujeitas a um procedimento prévio à observação à lupa: (1) remoção dos da maioria dos tecidos moles, com a ajuda de uma pinça; (2) imersão em lixívia comercial, *Neoblanc*, durante 02horas 30minutos; (3) passagem por água corrente, da torneira, durante alguns minutos para limpar qualquer vestígio de lixívia; e (4) escovagem e polimento das conchas, usando um disco para polir de grão médio – estes passos permitiram a dissolução dos tecidos moles, remoção de organismos incrustantes (epibiontes) e branqueamento da concha para uma melhor visualização da marca. Seguidamente era verificada a existência de marcas de calceína na concha, à lupa – como não foram observadas marcas externas em nenhuma das lapas, foi averiguada a presença de marcas internas. Assinalou-se a lápis o eixo correspondente ao comprimento máximo da concha e desbastou-se esta, usando pedra esmeril com berbequim de percussão (Bosch GSB 13 RE), até à reta assinalada (Fig. 3.12).

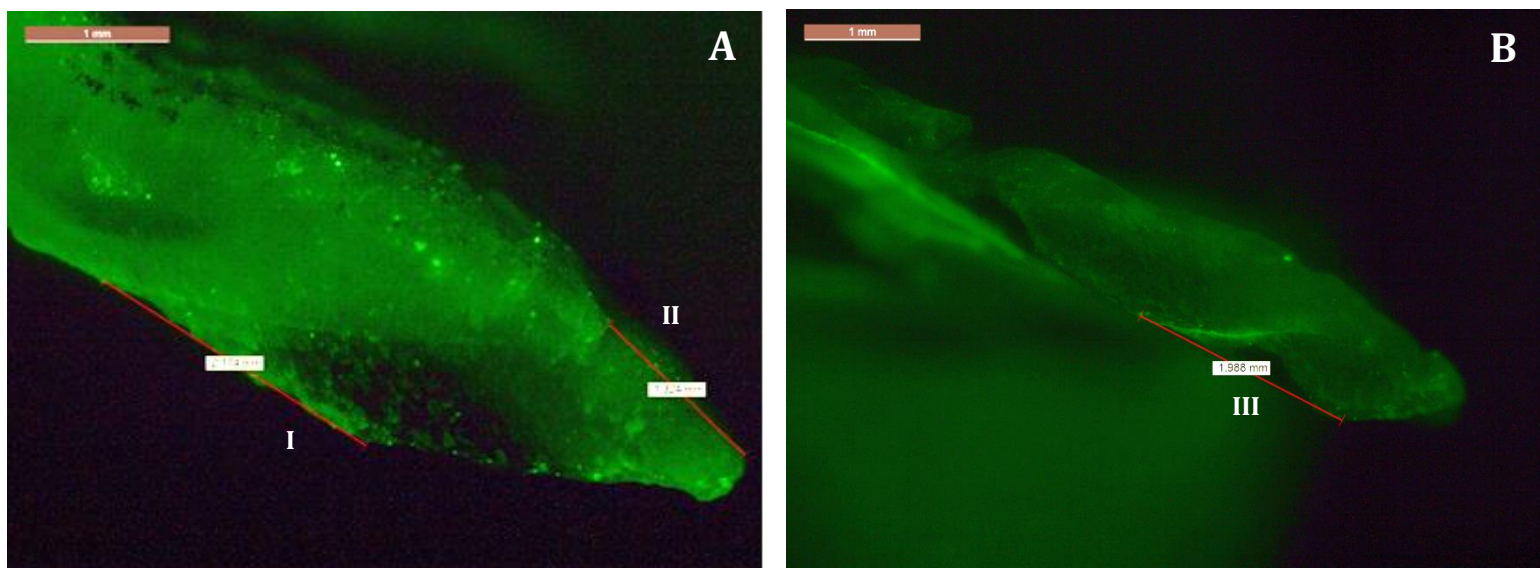


**Figura 3.12** – Etapas de preparação das lapas recolhidas em campo para serem analisadas à lupa binocular, para medição do incremento individual marginal (A) Lapa intacta, com o aspeto original da altura da recolha – coberta por cracas e com a marca de cola; (B) Exemplar após estar submerso durante 2 horas em lixívia e ter sido polido – marca a lápis indica o comprimento máximo da concha; (C) Aparência final após tratamentos de limpeza e desbaste da concha – corte longitudinal corresponde ao comprimento máximo da concha, zona onde serão efetuadas as medições (I – zona posterior, II – zona anterior).

Foram efetuadas observações por epifluorescência à lupa binocular (Leica M165FC) ao longo da espessura do eixo longitudinal de cada lapa, utilizando uma fonte de luz UV e o filtro GPF3 (comprimento de onda de excitação 470 nm; comprimento de onda de emissão 509 nm). Esta zona revelaria a marca interna da concha, que apresentava uma cor verde

fluorescente (destacando-se do restante). Idealmente a banda de calceína atravessaria a espessura da concha transversalmente e a parte que se encontrasse entre a banda e a margem da concha representaria o incremento após a data de marcação até ao dia de recolha, obtendo-se assim quatro medidas: duas na margem da zona anterior da lapa (interior e exterior, AI e AE) e duas na margem da zona posterior da lapa (interior e exterior, PI e PE). No entanto, em alguns exemplares não foi possível registar as quatro medidas porque a banda da calceína não estava completa, não sendo totalmente visível. As lapas foram fotografadas com a câmara DFC295 (adaptada à lupa) e foram realizadas medições lineares através de *software* de análise de imagem – Leica Application Suite (LAS) v3.8. Cada medição linear representa incremento individual marginal, i.e., a distância desde a banda de calceína, num ponto específico consoante o tipo de medida (e.g., para AI seria no lado interior da concha, no ponto onde começa a banda), até à margem da concha (Fig. 3.13).

Com base nos dados obtidos com a craveira foi analisado o crescimento (diferencial entre o CMC inicial e final) nos diferentes tratamentos experimentais. Para a calceína, foram estudadas as relações alométricas entre as diferentes medidas possíveis de retirar em cada exemplar. Por fim, comparou-se o método físico (craveira) com o químico (calceína), confrontando as duas medidas para as réplicas dos tratamentos que contenham ambas as informações, assim como a possível correlação entre a medida ‘AI’ do método químico e a medida ‘CMC’ do método físico.



**Figura 3.13** – Exemplos de medições efetuadas, do crescimento marginal, no programa LAS (vista longitudinal – revelando a espessura da concha). (A) Zona posterior de uma lapa onde é possível observar tanto a medida interior (I) como a exterior (II). (B) Zona anterior de uma lapa onde a banda não é visível de um lado ao outro, só sendo possível definir a medida interior (III).

### 3.8. SOBREVIVÊNCIA DE LAPAS PEQUENAS E GRANDES

O estudo da sobrevivência envolvendo lapas pequenas decorreu entre os períodos de 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014 (13 semanas), com 52 lapas com tamanho médio de 19.3mm ( $\pm 1.50$ , DP). As lapas grandes foram seguidas entre 01 de Maio e 28 de Agosto de 2014 (17 semanas), com 43 lapas com dimensões médias de 28.4mm ( $\pm 2.63$ , DP).

A montagem e explicação dos tratamentos experimentais utilizados encontram-se descritas na seção 2.6 da metodologia. Foram transplantados exemplares desta espécie para dentro de jaulas ao longo dos três níveis de estudo (médio, superior e extremo). Semanalmente, estas jaulas (Fig. 3.14) eram monitorizadas para verificação do seu estado (e.g., remoção de algas soltas que estivessem a cobrir a jaula) e eram realizados censos visuais, onde era registado o número de lapas sobreviventes, especificando quais as réplicas vivas de cada tratamento.

Recolheram-se exemplares no final de cada experiência para posteriormente serem investigadas, em laboratório, outras variáveis – no caso das lapas pequenas foi o crescimento utilizando o método da calceína (ver seção 3.7), enquanto nos indivíduos grandes sobreviventes foi estudada a sua condição ecofisiológica (ver seção 3.9).

Analisou-se o número médio de semanas de sobrevivência por tratamento, assim como a associação do número de lapas vivas em cada data de amostragem com a temperatura mínima e máxima registada nessa semana, por nível, para observar possíveis relações entre estas duas variáveis.



**Figura 3.14** – Jaulas colocadas na rocha, utilizadas nas experiências manipulativas (incluindo sobrevivência) – à esquerda para indivíduos com tamanho inferior a 2cm (pequenas) e à direita para lapas com dimensões superiores a 2cm (grandes).

### 3.9. CONDIÇÃO ECOFISIOLÓGICA EM LAPAS GRANDES

Foi averiguada a condição ecofisiológica de lapas grandes da espécie *P. depressa* em dois ensaios, um a curto (1 semana) e outro a médio (17 semanas) prazo, nos três níveis de estudo.

A experiência com duração de uma semana decorreu entre 07 e 14 de Agosto de 2014, no pico do calor, tendo sido transplantadas lapas do nível médio para jaulas artificiais (uma lapa por jaula) nos níveis médio ( $n = 6$ ), superior ( $n = 6$ ) e extremo ( $n = 8$ ). A descrição do procedimento para translocar lapas de dimensões superiores a 2cm encontra-se na seção 3.6. No dia da recolha foram também colhidas aleatoriamente seis lapas livres do nível médio e seis do superior (i.e., fora das jaulas), para serem usadas como termo de comparação com as colocadas nas jaulas (servirão de controlos). Para o estudo relativo à condição fisiológica a médio prazo, como mencionado no segmento 3.8, foram utilizadas as lapas sobreviventes resultantes desse estudo (que estiveram na rocha desde 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014).

O método de recolha empregado foi o mesmo para os dois testes. Durante a baixa-mar, desagregaram-se as lapas pretendidas da rocha, removendo cuidadosamente uma parte do tecido do músculo do pé de cada exemplar, com o auxílio de uma pinça e bisturi, e colocando cada porção num criotubo individualmente (devidamente etiquetado com o código da réplica). Os criotubos foram imediatamente depositados em azoto líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para preservar as amostras para posterior análise. A restante parte de cada lapa foi guardada separadamente, em invólucros de alumínio – que foram transportados para o laboratório dentro de uma mala térmica e colocados na arca frigorífica das instalações (Fig. 3.15).

Os conteúdos em ácidos nucleicos determinaram-se segunda a técnica flurimétrica, adaptada dos protocolos de Caldarone et al. (2001) e Chícharo et al. (2001).

A primeira etapa consistiu na liofilização, usando o liofilizador Thermo Savant Modulyo, e na determinação do peso seco, utilizando a microbalança Sartorius Micro (precisão  $\pm 0.001\text{ mg}$ ), das amostras recolhidas e guardadas em azoto líquido no campo – quando a amostra era demasiado pesada cortava-se uma porção entre 0.5 a 3mg (intervalo de pesos abrangidos pela análise). Cada porção foi armazenada em eppendorf.

Posteriormente, misturou-se cada amostra com 1mL do reagente Sarcosine-Tris-EDTA (STE) a 0.5% – um detergente utilizado para romper a membrana celular e libertar o conteúdo nuclear – utilizando durante um minuto o sonicador Cole Parmer (processador de ultra-som) e seguidamente, durante trinta minutos, o vortex Labinco L46 (misturador de amostras) para

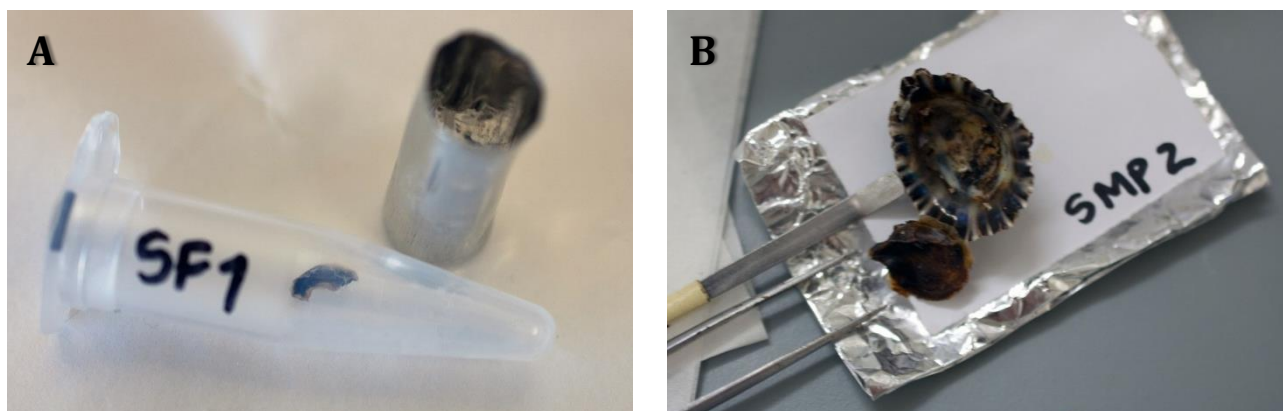
incorporar o reagente e homogeneizar a solução. A solução obtida foi centrifugada (Hettich Mikro 22R) e na fase seguinte utilizado o seu sobrenadante. Seguidamente preparou-se uma multiplaca com 96 poços (Tabela 3.4), com dois replicados (48 poços para cada), preenchendo-a, com recurso a micropipetas, com os diversos componentes. Os primeiros 4 poços da primeira coluna da placa foram preenchidos com um gradiente de 16S-23S *Escherichia coli* RNA [0–30µl], os da segunda com um gradiente de λ-phagus DNA [0–20µl] mais 15µl de RNase (enzima que estimula a degradação do RNA, para assegurar uma leitura de DNA puro), e os seguintes 40 poços foram utilizados para colocar os sobrenadantes das amostras. Os restantes 48 poços serviram de duplicados às respectivas células anteriores. No fim, para além de 15µl de Gel Red (corante fluorescente de ácidos nucleicos) em cada poço, foi também adicionado STE a 0.05% aos poços com RNA e DNA e uma solução tampão (*Tris-EDTA buffer*) às amostras, de modo a perfazer um volume total de 100µl em cada poço.

**Tabela 3.4** – Esquema de preenchimento da multiplaca utilizada na leitura de fluorescência das amostras. Encontra-se indicado em cada poço o seu componente principal (e respetiva quantidade) [RNA, DNA ou “A” = amostra], cada poço foi completado com solução tampão e Gel Red (e no caso dos poços com DNA, também era adicionado RNase) até perfazer 100µl de volume total. **Azul:** primeiro replicado; **Laranja:** segundo replicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	RNA 0µl	DNA 0µl	A1 40µl	A2 40µl	A3 40µl	A4 40µl	A5 40µl	A6 40µl	A7 40µl	A8 40µl	A9 40µl	A10 40µl
<b>B</b>	RNA 10µl	DNA 10µl	A11 40µl	A12 40µl	A13 40µl	A14 40µl	A15 40µl	A16 40µl	A17 40µl	A18 40µl	A19 40µl	A20 40µl
<b>C</b>	RNA 20µl	DNA 15µl	A21 40µl	A22 40µl	A23 40µl	A24 40µl	A25 40µl	A26 40µl	A27 40µl	A28 40µl	A29 40µl	A30 40µl
<b>D</b>	RNA 30µl	DNA 20µl	A31 40µl	A32 40µl	A33 40µl	A34 40µl	A35 40µl	A36 40µl	A37 40µl	A38 40µl	A39 40µl	A40 40µl
<b>E</b>	RNA 0µl	DNA 0µl	A1 40µl	A2 40µl	A3 40µl	A4 40µl	A5 40µl	A6 40µl	A7 40µl	A8 40µl	A9 40µl	A10 40µl
<b>F</b>	RNA 10µl	DNA 10µl	A11 40µl	A12 40µl	A13 40µl	A14 40µl	A15 40µl	A16 40µl	A17 40µl	A18 40µl	A19 40µl	A20 40µl
<b>G</b>	RNA 20µl	DNA 15µl	A21 40µl	A22 40µl	A23 40µl	A24 40µl	A25 40µl	A26 40µl	A27 40µl	A28 40µl	A29 40µl	A30 40µl
<b>H</b>	RNA 30µl	DNA 20µl	A31 40µl	A32 40µl	A33 40µl	A34 40µl	A35 40µl	A36 40µl	A37 40µl	A38 40µl	A39 40µl	A40 40µl

Por fim, foi determinada a fluorescência excitando as amostras a um comprimento de onda de 365nm e lendo a sua emissão a um comprimento de onda de 590nm, utilizando o espectrofluorímetro (leitor de microplacas, Biotek Synergy HT - modelo SIAFRTD) e o *software* associado – Gen5™. Após a primeira leitura, adicionou-se 15µl de RNase aos poços das amostras e incubou-se a placa em banho-maria a 37°C (Julabo TWB 5), durante 30 minutos. Após o arrefecimento da placa, foi lida novamente a fluorescência das amostras. Os

últimos procedimentos descritos (preparação da multiplaca e respetiva leituras) foram repetidos consoante o número total de amostras a ser analisadas.



**Figura 3.15** – (A) Exemplo de uma porção do músculo do pé da lapa liofilizada (dentro do eppendorf), utilizada nas análises de ácidos nucleicos; (B) A restante parte da lapa (após o corte para amostra representada em A), após secagem em estufa, para obtenção do peso seco total da lapa.

Com base nas concentrações conhecidas do RNA e DNA utilizados e nas suas leituras à fluorescência, foram criadas rectas de calibração. Estas rectas de calibração, em conjunto com as leituras de fluorescência das amostras, permitiram calcular as variáveis de estudo –  $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ ,  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$  e rácio RNA:DNA standardizado (sRD). Ressalta-se que para as amostras, a primeira leitura corresponde à fluorescência total dos ácidos nucleicos e a segunda leitura corresponde à de DNA; calculando a diferença entre as estas duas leituras, obtém-se a fluorescência de RNA.

Para cada um dos ensaios (curto e médio prazo) foram exploradas as relações entre os tratamentos experimentais e cada uma das variáveis de estudo e tamanho das lapas (comprimento máximo da concha), através de diagramas de extremos e quartis.

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

A análise exploratória foi feita em ambiente Microsoft Office Excel, através de ferramentas de visualização (como gráficos de barras e de dispersão) e de cálculo de estimativas de parâmetros de estatística descritiva (média, desvio-padrão, entre outros). A análise estatística dos diferentes dados obtidos foi efetuada com recurso ao programa IBM SPSS Statistics for Windows, v20.0.

### **No âmbito do primeiro objetivo:**

Os padrões de variação temporal e espacial dos limites e a variação espacial da abundância desta espécie foram testados por ANOVA a um factor. Nestes estudos foi apenas considerado um fator, fixo e com dois níveis (inverno e verão no estudo da variação temporal; limite inferior e limite inferior no estudo da variação espacial dos limites; nível médio e superior no estudo da variação espacial da abundância). Antes de realizar a ANOVA, o pressuposto da homogeneidade das variâncias foi verificado pelo teste de Levene e, sempre que necessário, os dados foram transformados de modo a garantir este pressuposto. Foi também testada a hipótese que o limite superior e o limite inferior de *P. depressa* no inverno correspondessem a uma altura relativa ao zero hidrográfico maior do que no verão através do teste da binomial (Sokal e Rohlf, 1995), calculado através do número de transectos em que a cota de inverno era superior à do verão (para cada nível vertical) e em que a cota de verão era superior à cota de inverno (para cada nível vertical).

O estudo das temperaturas registadas nos diversos níveis foi baseado na análise exploratória de dados, descrita anteriormente, consoante as questões associadas a esta tarefa.

### **Para o segundo objetivo:**

O estudo do crescimento consistiu em várias análises, relacionadas com as diversas questões colocadas. Para os dados adquiridos com a craveira, foi utilizada a ANOVA a um fator com sete níveis (os sete tratamentos experimentais) para testar os efeitos dos tratamentos no valor médio do incremento da concha. A homogeneidade das variâncias foi verificada com o teste de Levene e caso se verificassem diferenças significativas eram realizados testes SNK. As relações alométricas foram obtidas aplicando o teste t de Student para amostras emparelhadas, comparando as médias dos grupos para cada par de medidas provenientes do método da calceína e do método da medição no campo do incremento da concha. Na comparação dos dois métodos, repetiu-se o procedimento seguido em análises anteriores para a ANOVA para cada método e verificou-se se o padrão era igual nos dois (com três níveis, representando os tratamentos que tinham ambas medições); a relação entre as variáveis ‘CMC’ (craveira) e ‘AI’ (calceína) foi examinada através dos coeficientes de correlação bivariada de Pearson (significativo para  $p < 0.01$ ) e Spearman (significativo para  $p < 0.05$ ) (tamanho da amostragem igual a dez, que é o número total de lapas com estas duas medidas).

A análise de variância com um fator (tratamento com 8 níveis no caso das lapas pequenas e com 6 níveis no caso das lapas grandes), foi usada para testar a existência de diferenças entre os tratamentos utilizados na experiência da sobrevivência. A homogeneidade

das variâncias foi novamente verificada através do teste de Levene. Quando se verificaram interações significativas, realizaram-se testes de comparação múltipla de médias de Student-Newman-Keuls (SNK).

Os dados relativos às experiências da condição fisiológica foram visualizados em diagramas de extremos e quartis, tendo sido testado o efeito dos tratamentos nas diferentes variáveis de estudo ( $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ ,  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$  e sRD) através de ANOVA a um factor (tratamento). Também foi analisada a diferença entre os tamanhos médios das lapas utilizadas por tratamento, para assegurar que caso se verificasse interações significativas entre as variáveis de estudo e os tratamentos estas não fossem uma reflexão das diferenças de tamanho.

## **4 RESULTADOS**

Foram observados padrões (de distribuição vertical, ambiente térmico, abundância e estrutura dimensional da espécie) relacionados com a ocorrência da espécie *Patella depressa* na área de estudo e estudados alguns processos (crescimento, sobrevivência e condição ecofisiológica) possivelmente associados a estes padrões.

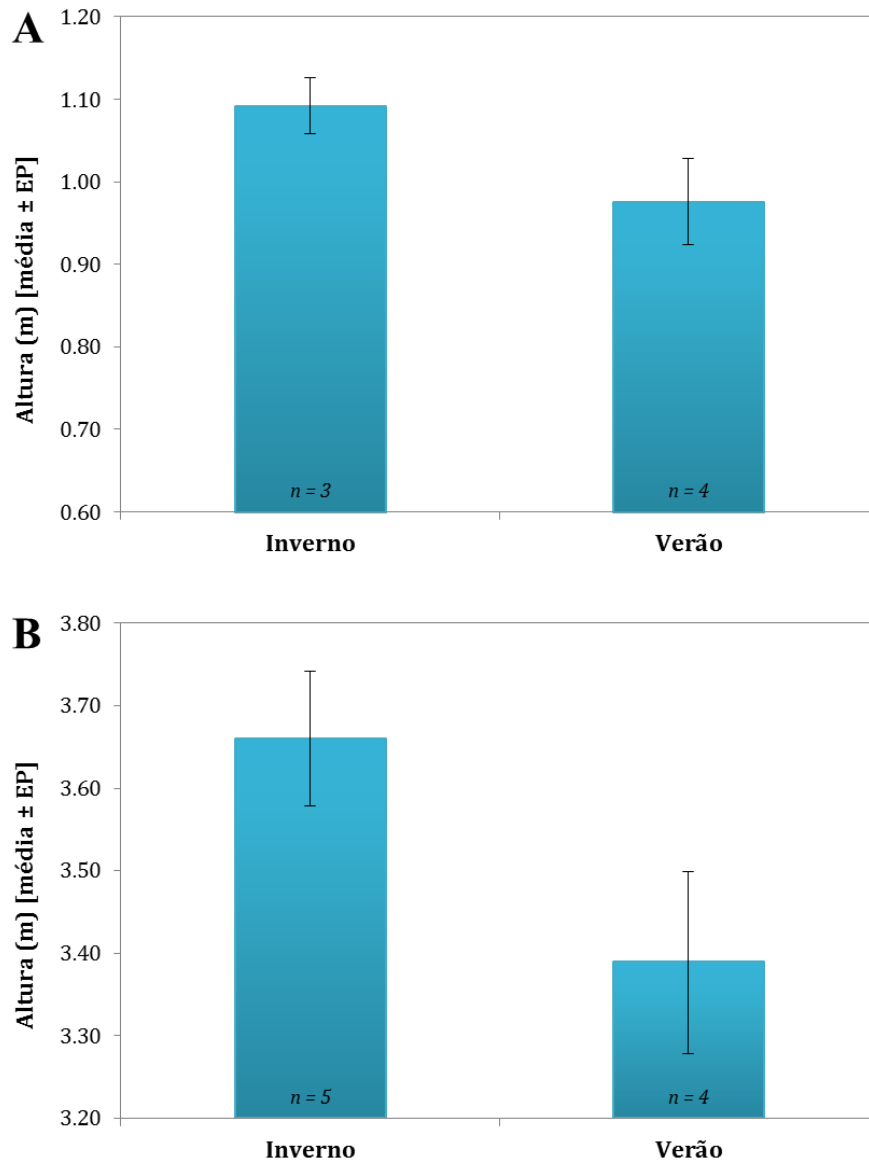
### 4.1. PADRÕES

#### 4.1.1. *Limites inferior e superior da distribuição vertical*

O limite inferior da espécie estudada, nas duas datas de amostragem, nunca foi registrado abaixo dos 0.88 metros, enquanto o limite superior não ultrapassou os 3.88 metros, sendo ambos estes valores relativos a alturas acima do zero hidrográfico.

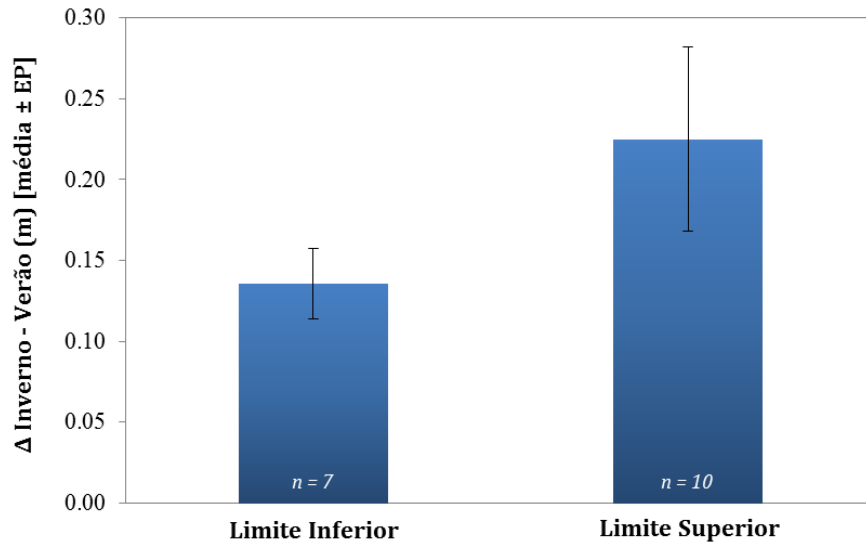
Não apresentaram diferenças significativas entre as suas alturas nas estações de inverno e de verão, para o ano 2014, tanto no limite inferior (dados não transformados, Levene = 0.672,  $p = 0.450$ ; ANOVA,  $F_{1,5} = 2.942$ ,  $p = 0.147$ ) como no superior (dados não transformados, Levene = 0.478,  $p = 0.512$ ; ANOVA,  $F_{1,7} = 4.085$ ,  $p = 0.083$ ) da distribuição vertical da espécie *P. depressa*.

Embora não significativa, é de destacar que em ambos os limites se revelou a mesma tendência de decréscimo do valor médio da sua altura na transição entre estações; sendo que o limite inferior teve uma diminuição de 0.12 metros e o superior uma descida maior, com 0.27 metros (Fig. 4.1).



**Figura 4.1** – Variação sazonal (entre inverno e verão) da altura, em relação ao zero hidrográfico, dos limites inferior (**A**) e superior (**B**) da distribuição vertical da espécie *P. depressa* (média  $\pm$  EP), em metros.

A média do diferencial entre as alturas registadas no inverno e no verão para o limite superior foi 1.66 vezes maior em relação ao valor médio do diferencial no limite inferior. Apesar de não se ter obtido homogeneidade das variâncias, a diferença observada entre os valores médios dos dois diferenciais mostrou-se não significativa (dados não transformados, Levene = 6.805,  $p = 0.020$ ; ANOVA,  $F_{1,15} = 1.584$ ,  $p = 0.227$ ) (Fig. 4.2).

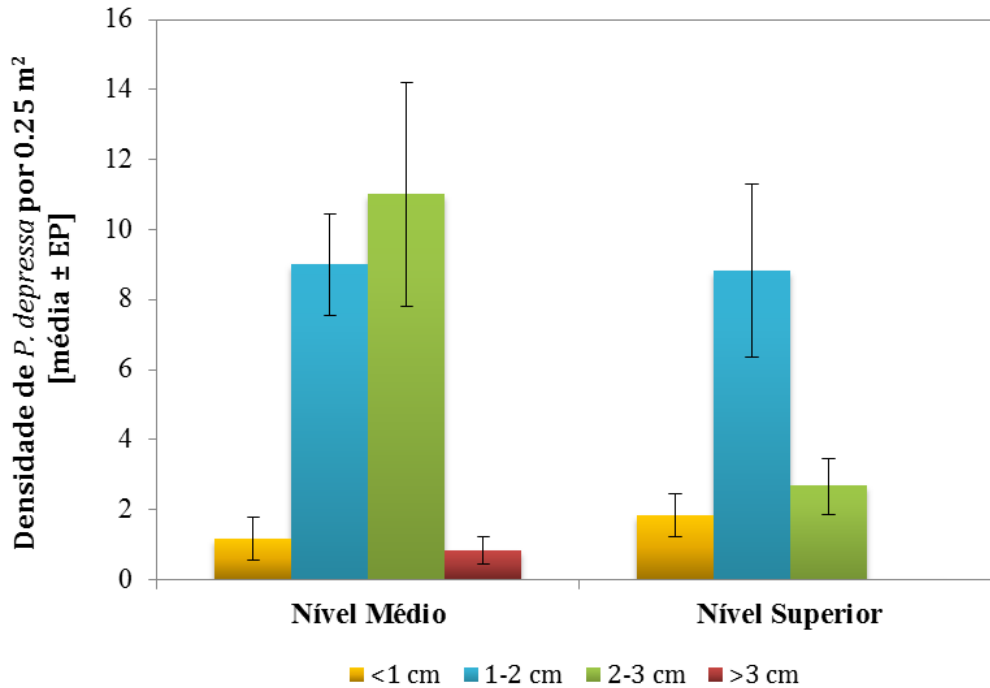


**Figura 4.2** – Diferencial entre as alturas registadas no inverno e no verão (média  $\pm$  EP) para o limite inferior e para o limite superior da distribuição vertical da espécie *P. depressa*, em metros (altura em relação ao zero hidrográfico).

Em relação à hipótese de o limite superior e inferior apresentar uma altura relativa ao zero hidrográfico superior no inverno do que no verão, verificou-se que esta foi suportada para ambos os níveis ( $P < 0.05$ ), pois o número de transectos em que a cota de inverno era superior à de verão foi de dez no limite superior e de 7 no limite inferior, não tendo sido observado nenhum transecto em que a cota de verão fosse mais alta do que a cota de inverno.

#### 4.1.2. Abundância nos níveis médio e superior da distribuição

A abundância de lapas da espécie *P. depressa* foi estimada nos níveis médio e superior da sua distribuição vertical em quatro classes dimensionais, representadas na Fig. 4.3.



**Figura 4.3** – Número total (média  $\pm$  EP) de lapas da espécie *P. depressa* por quadrado com dimensões de 50x50cm, pertencentes a quatro classes dimensionais (inferior a 1, entre 1 e 2, entre 2 e 3 e superior a 3cm), em dois níveis de distribuição vertical (médio e superior). [ $n = 6$ ]

A densidade de lapas pertencentes às duas classes dimensionais de menor tamanho [que entre si abrangem os indivíduos com comprimento máximo de concha (CMC) inferior a 2 centímetros] não diferiu entre os dois níveis verticais amostrados (inferior a 1cm: dados não transformados, Levene = 0.020,  $p = 0.889$ ; ANOVA,  $F_{1,10} = 0.615$ ,  $p = 0.451$  / 1–2cm: dados não transformados, Levene = 0.974,  $p = 0.347$ ; ANOVA,  $F_{1,10} = 0.003$ ,  $p = 0.955$ ).

Como não foram avistados exemplares com CMC superior a 3cm nas réplicas efetuadas no nível superior, optou-se por agrupar as duas classes de tamanhos maiores numa categoria mais ampla (organismos superiores a 2cm) para a realização dos testes de análise estatística. As análises revelaram que existe um número consideravelmente maior de lapas com comprimento máximo de concha superior a 2 cm no nível médio (dados transformados com a raiz quadrada, Levene = 1.326,  $p = 0.276$ ; ANOVA,  $F_{1,10} = 10.059$ ,  $p = 0.010$ ).

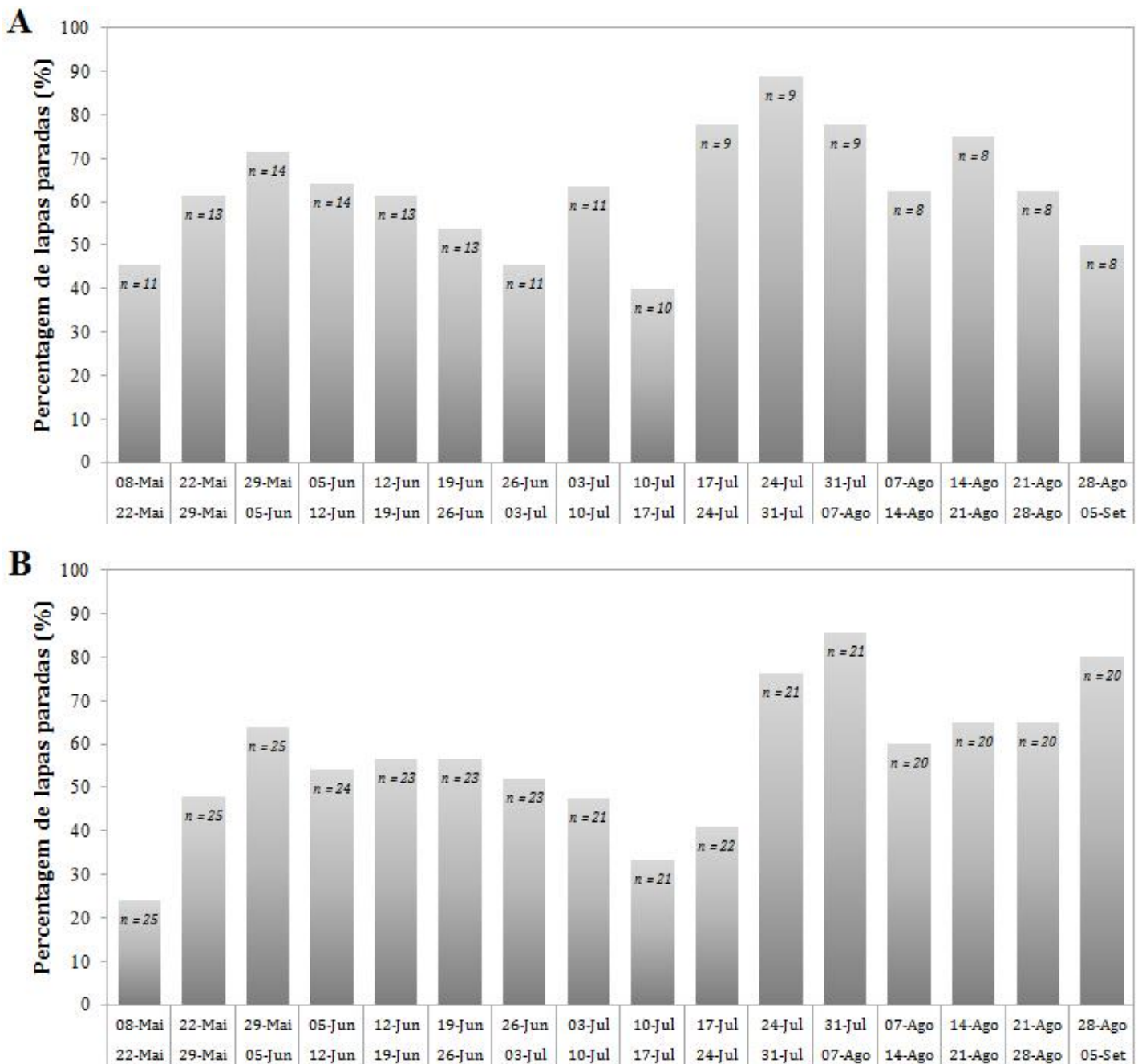
#### 4.1.3. Movimentos de *P. depressa* nos níveis médio e superior

Foram seguidos ao longo do tempo, entre 08 de Maio e 05 de Setembro de 2014, diversos exemplares desta espécie nos níveis médio e superior (ver Anexo A). Os resultados seguintes ilustram os padrões relativos a três categorias de movimento: lapas paradas, em rotação e em deslocação.

### **(a) Lapas paradas**

A percentagem de lapas paradas no nível médio atingiu os seus valores mínimo (40%) e máximo (88.9%) no mesmo mês, num espaço de 15 dias, entre as datas 10 e 24 de Julho (Fig. 4.4A). Nos dois tipos de habitat considerado (emerso e locais de refúgio) destacou-se uma maior frequência de ocorrência no habitat emerso, tendo sido registado em três datas como o único habitat a ser utilizado pelas lapas em estudo (em Maio e Agosto). O uso de locais de refúgio atingiu o seu máximo durante as últimas três semanas de Julho, onde a sua percentagem atingiu aproximadamente os 57% (Fig. 4.5A).

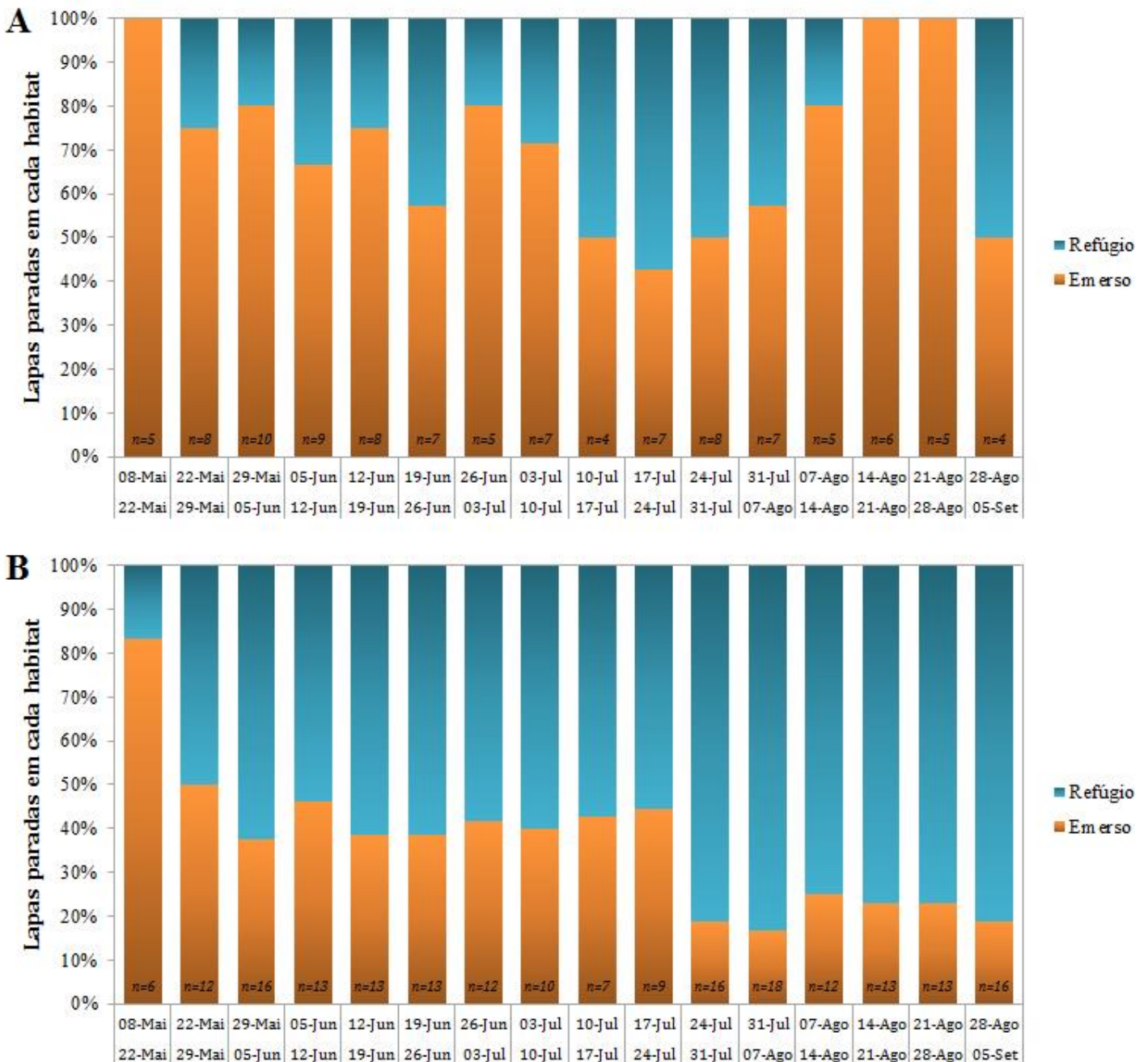
No nível superior observou-se a percentagem mínima de lapas paradas na data inicial (08 de Maio) e alcançou-se o pico máximo, com 85.7%, na semana entre 31 de Julho e 07 de Agosto. Durante o mês de Junho ocorreu alguma estabilização deste parâmetro, não variando mais que 4.3% entre datas (Fig. 4.4B). No nível superior, o habitat de ocorrência mais frequente foram os locais de refúgio, sempre com uma percentagem superior a 50% com a exceção das duas primeiras datas – 08 a 29 de Maio. Entre 24 de Julho e 05 de Setembro, a percentagem de lapas imóveis em locais de refúgio atingiu valores particularmente elevados, mantendo-se acima dos 75%. Salientam-se as semanas ‘08 a 22 de Maio’ e ‘31 de Julho a 07 de Agosto’ por apresentarem percentagens simétricas, na primeira data o emerso foi habitado por 83.3% das lapas imóveis em estudo (com as restantes 16.7% em habitats de refúgio), enquanto o oposto aconteceu na semana de Julho/Agosto (Fig. 4.5B).



**Figura 4.4** – Percentagem de lapas paradas em relação ao total de lapas seguidas no respectivo nível, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (**A**) e superior (**B**) da distribuição vertical da espécie.

Comparando entre si os níveis, verifica-se que a percentagem máxima de lapas paradas apresentou valores semelhantes entre o nível médio e o superior, os quais foram atingidos em datas próximas, durante o mês de Julho. No entanto, existe uma diferença de 16% entre as percentagens mínimas atingidas de lapas paradas nos dois níveis, sendo que a menor pertence ao nível superior (abaixo de 25%). Em ambos os níveis foi observado um aumento gradual da percentagem de lapas paradas ao longo do mês de Maio, assim como uma tendência semelhante no mês de Julho onde se atingiram valores menores entre os dias 10 e 17 e uma

subida notória entre 24 de Julho e 07 de Agosto. Em, aproximadamente, um terço das datas amostradas a percentagem de lapas paradas no nível superior ultrapassou a do nível médio (durante o verão, entre os meses de Junho e Agosto). Em relação à transição de habitat entre datas, verificou-se uma resposta claramente diferente entre níveis. Enquanto no nível médio, o habitat de ocorrência mais frequente foi o emerso, no superior acontece o oposto – onde foi muito frequentemente observada a ocorrência de lapas paradas em habitats de refúgio.



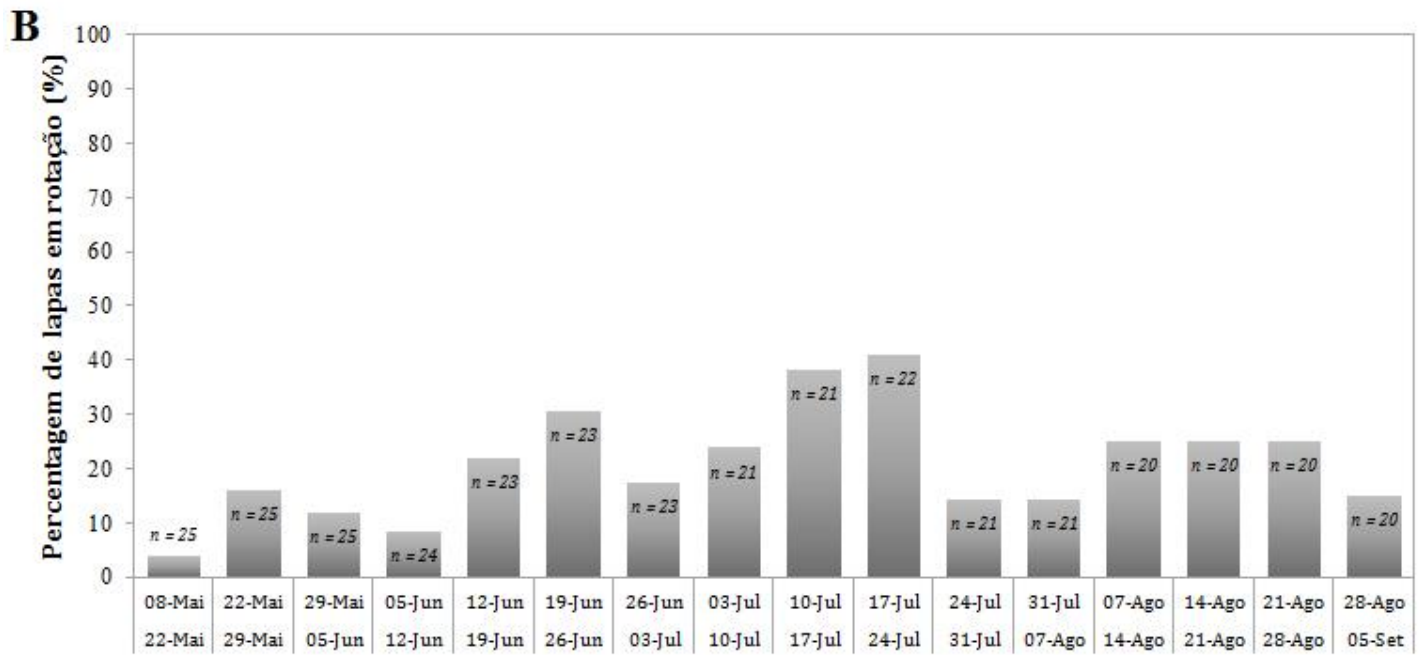
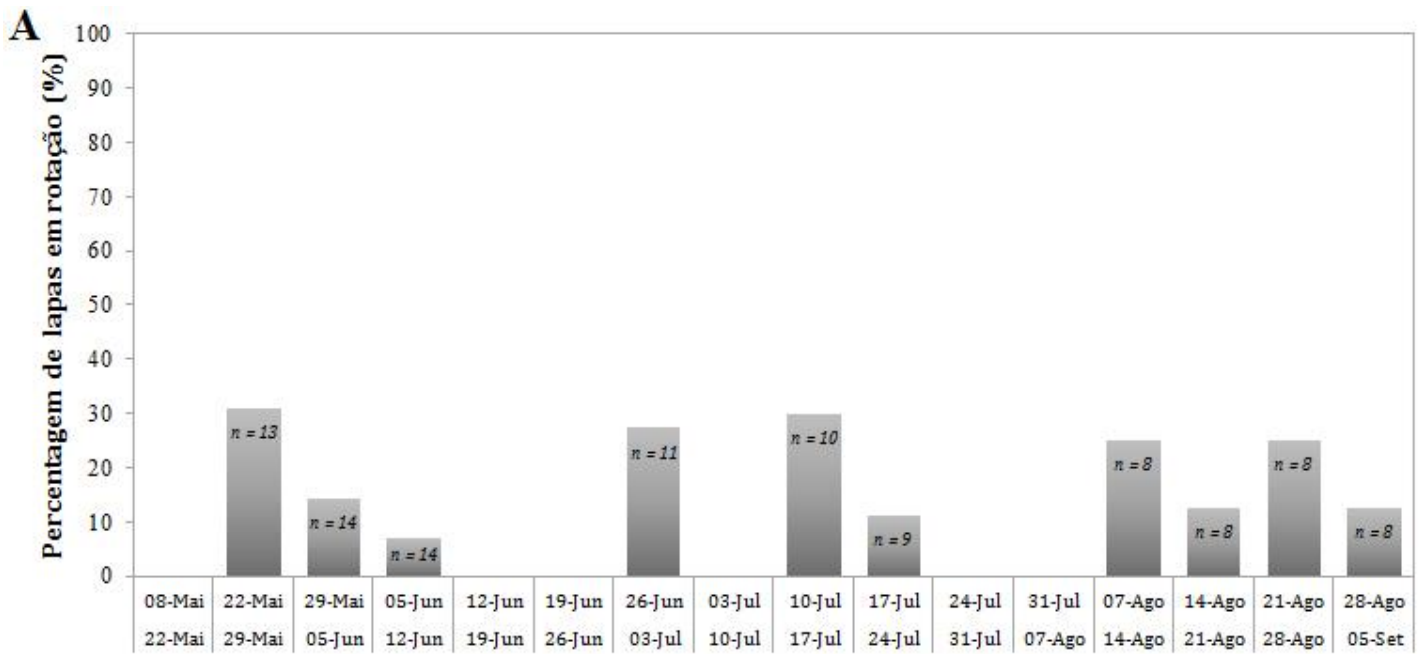
**Figura 4.5** – Proporção de lapas paradas em dois tipos de habitats (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie.

## **(b) Lapas em rotação**

Alguns exemplares dos grupos amostrados apresentaram um padrão de movimento intermédio entre estarem paradas ou em deslocação – rotação sobre si mesmas (Fig. 4.6).

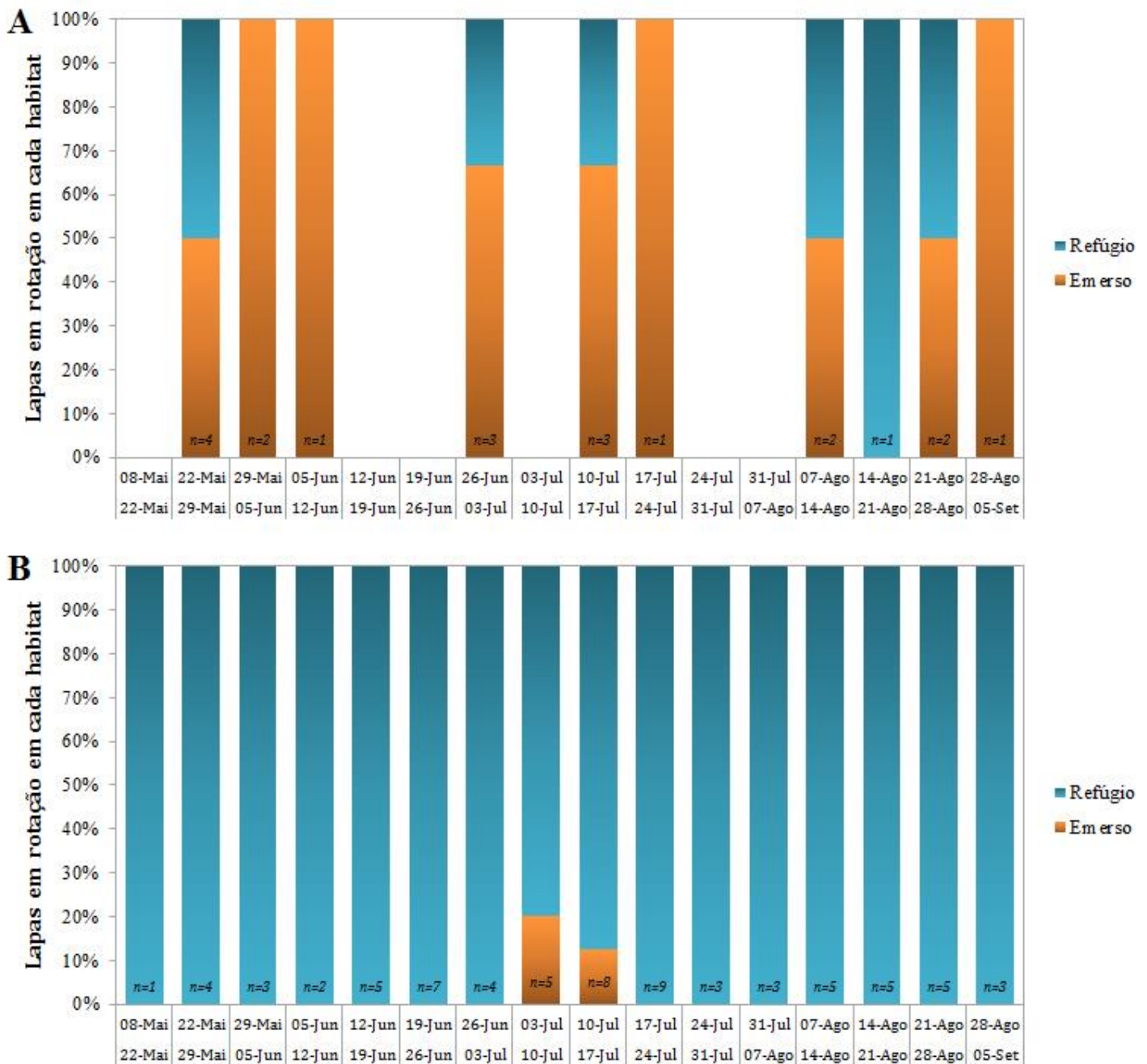
A percentagem de lapas que exerceram este tipo de movimento no nível médio é pequena em relação às outras duas categorias de movimentos (paradas e em deslocação); sendo que a maior percentagem de indivíduos em rotação foi 30.8%, registada na semana de 22 a 29 de Maio. De 16 datas amostradas, 6 não apresentaram lapas em rotação (Fig. 4.6A). As lapas em rotação ocorreram maioritariamente no habitat emerso, com uma percentagem igual ou superior a 50% atingindo os 100% em 4 datas. Em 14 – 21 de Agosto foi assinalado um exemplar em local de refúgio, tendo sido esta a única lapa em rotação nessa data – o que explica os 100% verificados nesse tipo de habitat (Fig. 4.7A).

No nível superior registaram-se lapas em rotação em todas as datas, com uma percentagem mínima de 4%, a 08 – 22 de Maio, e uma máxima de 40.9%, entre 17 – 24 de Julho. Entre 07 e 28 de Agosto manteve-se a mesma percentagem de lapas em rotação (25%) (Fig. 4.6B). Registou-se uma maior ocorrência (evidenciada na figura) nos locais de refúgio no nível superior, sendo que apenas se encontrou uma lapa em rotação no habitat emerso, nas semanas de 03 a 17 de Julho (Fig. 4.7B).



**Figura 4.6** – Percentagem de lapas em rotação em relação ao total de lapas seguidas no respectivo nível, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (**A**) e superior (**B**) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em rotação nessa data.

Em resumo, uma percentagem baixa de lapas mostrou movimentos de rotação no nível médio, sendo encontradas maioritariamente no habitat emerso, enquanto no nível superior houve uma maior ocorrência e quase sempre em locais de refúgio.



**Figura 4.7** – Proporção de lapas em rotação em dois tipos de habitats (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (**A**) e superior (**B**) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em rotação nessa data.

### (c) Lapas em deslocação

A terceira categoria de movimento considerada foi denominada lapas em deslocação (Fig. 4.8).

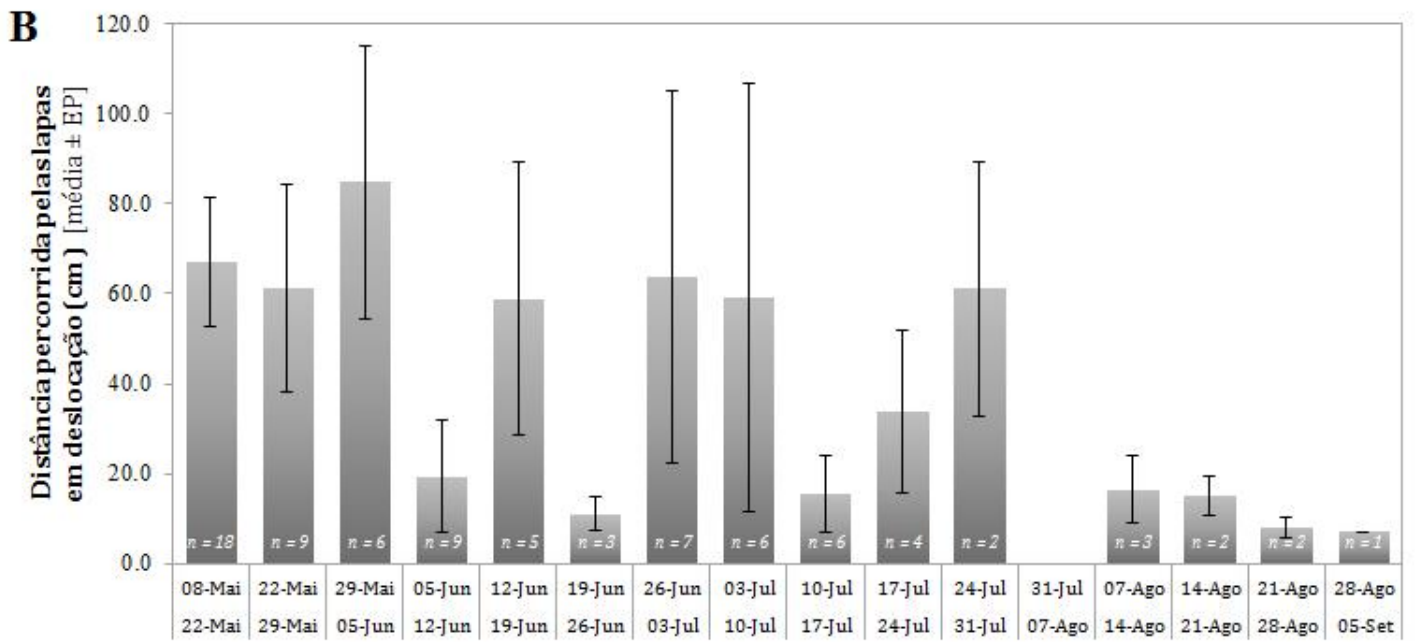
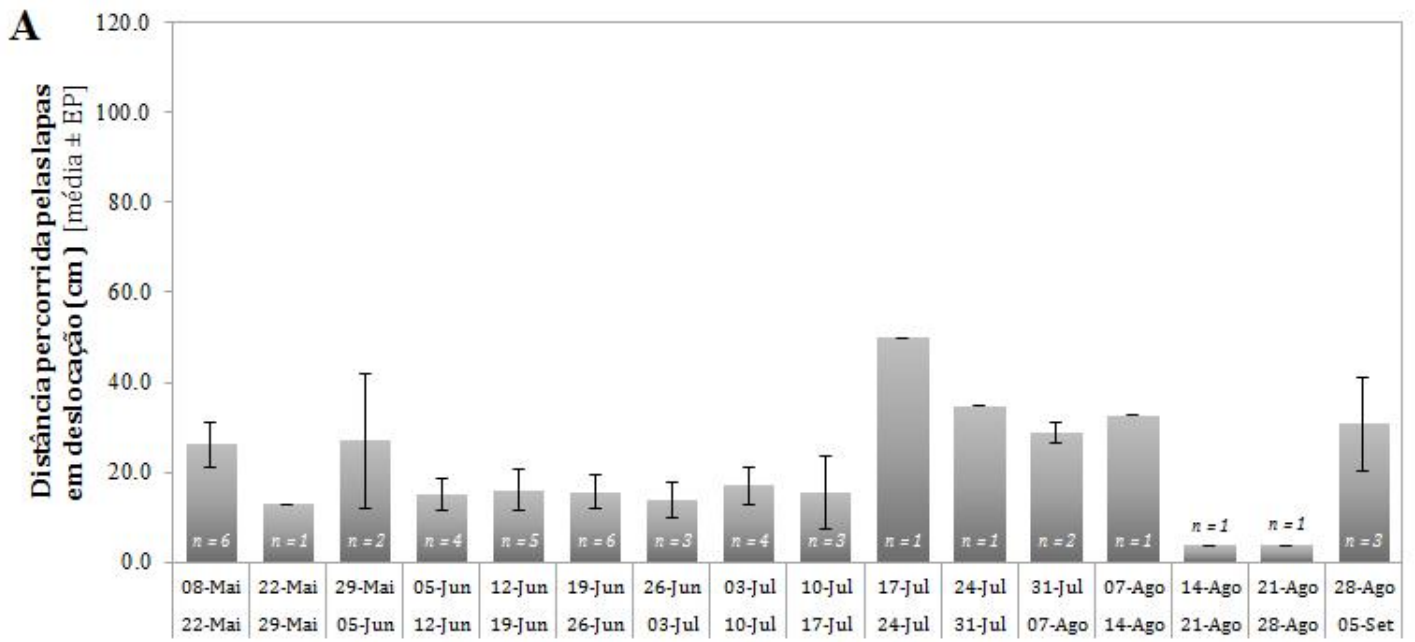
No nível médio ocorreu locomoção de lapas em todas as datas, sendo as distâncias de deslocação nunca superiores a 50cm no espaço de uma semana. Na semana 17 – 24 de Julho foi registado o valor máximo de distância de deslocação, mantendo-se relativamente altas as

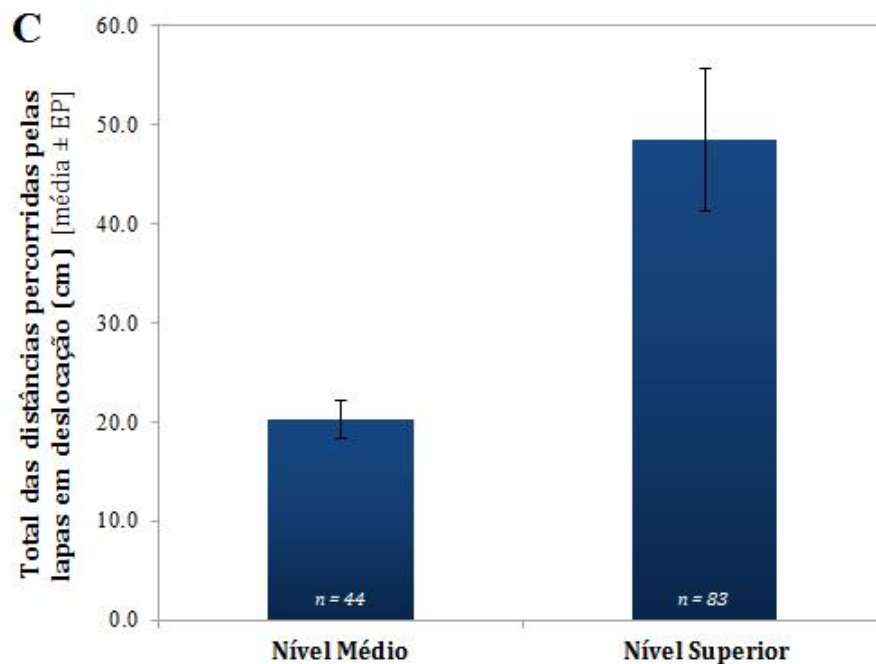
deslocações até 14 de Agosto, onde houve uma quebra de aproximadamente 30cm. Porém é de ressaltar que, com a exceção de 31 de Julho – 07 de Agosto, estes movimentos refletem a deslocação de apenas uma lapa num total de 9 lapas a serem seguidas (havendo um decréscimo entre 07 e 14 de Agosto, passando a 8 lapas) (Fig. 4.8A).

Na Fig. 4.8B pode ser observada a elevada variabilidade associada às deslocações semanais no nível superior. Unicamente entre 31 de Julho e 07 de Agosto não ocorreram deslocações de lapas neste nível, tendo-se mantido baixos os valores a partir desta data atingindo o mínimo na última semana amostrada.

De forma semelhante ao verificado na categoria de movimento de rotação, no nível superior registou-se uma maior percentagem de lapas em deslocação comparativamente com o nível médio (e.g., na primeira data 72% das lapas deslocaram-se no nível superior, enquanto 54.5% das lapas deslocaram-se no nível médio). Os valores mínimos de distância de deslocação registados nos dois níveis foram idênticos (3.7cm médio e 7.0cm superior), mas os valores máximos atingidos foram 49.9cm e 84.9cm ( $\pm 30.35$ , EP) nos níveis médio e superior, respetivamente. Utilizando como exemplo a semana de 05 a 12 Junho, demonstra-se que entre os dois níveis verticais apesar dos valores médios de distância de deslocação terem sido próximos, os valores registados ao nível individual apresentaram grande variação – no nível médio quatro lapas movimentaram-se, com valores entre 7.9 e 21.4cm perfazendo uma média de 15.0cm ( $\pm 3.51$ , EP) ( $n = 4$ ); enquanto no nível superior houve uma variação entre 3.5 e 117.1cm resultando numa média de 19.3cm ( $\pm 12.35$ , EP) ( $n = 9$ ).

O valor médio do total das distâncias de deslocação das lapas foi mais do dobro no nível superior comparativamente com o nível médio (Fig. 4.8C).



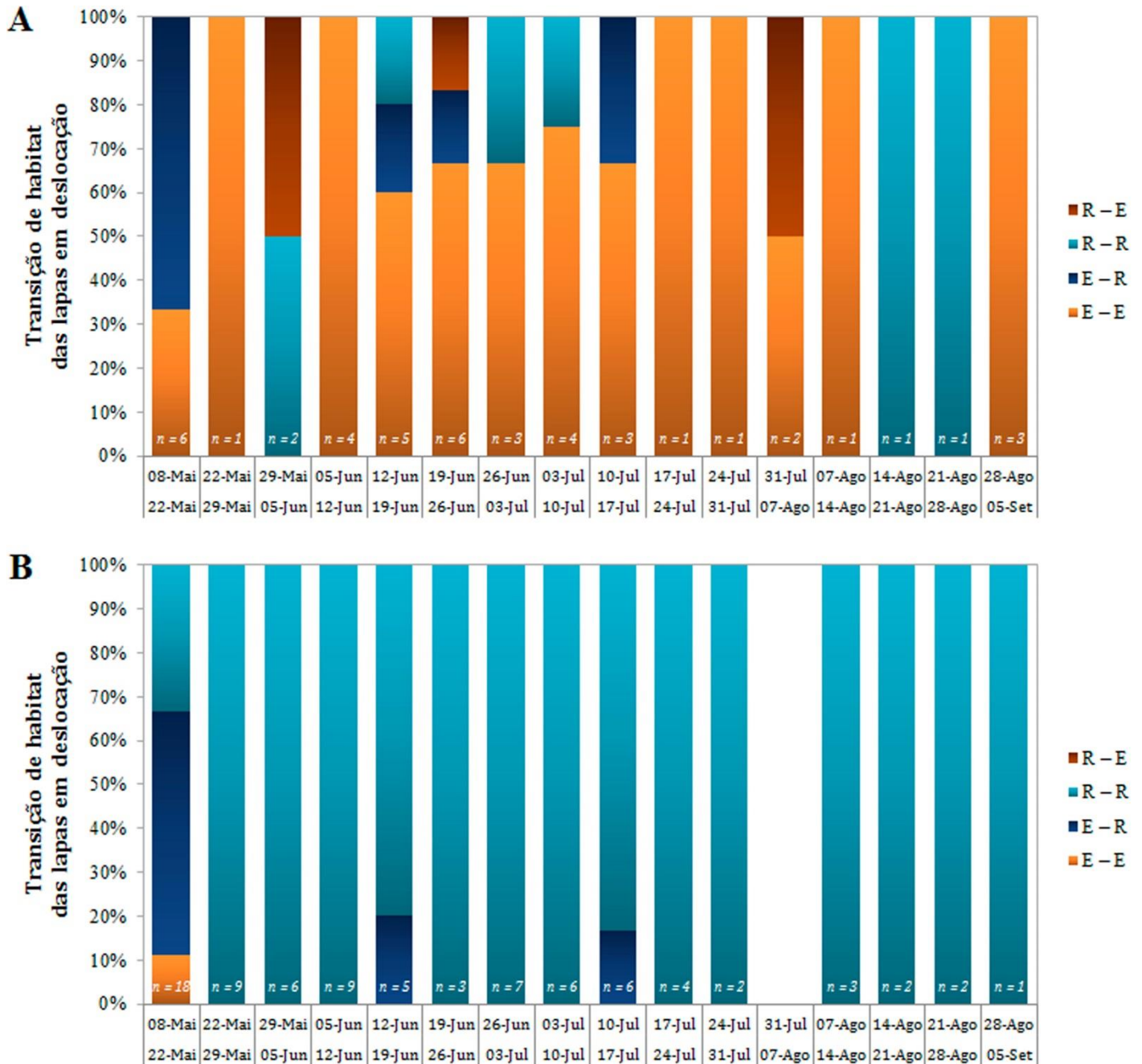


**Figura 4.8** – Distância de deslocação (média  $\pm$  EP) registada entre datas de amostragem sucessivas em lapas da espécie *P. depressa*, em centímetros, durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco indicam que não existiram lapas em deslocação nessas datas. (C) Comparação do valor médio ( $\pm$  EP) do total de distâncias de deslocação para todo o período de estudo, em centímetros, entre os dois níveis.

A Figura 4.9 ilustra a transição de habitats entre semanas em lapas desta categoria de movimento.

Entre os dois níveis verticais, verificaram-se proporções distintas das várias transições de habitat consideradas, no nível médio ocorreram os quatro tipos de transições possíveis (Fig. 4.9A), enquanto no superior a grande parte das deslocações foi efetuada entre locais de refúgio (Fig. 4.9B). No início deste estudo, no nível médio, 66.7% das lapas transitaram para locais de refúgio, afastando-se do habitat inicial (emerso). Neste nível, e em todo o período de estudo, registaram-se apenas três ocorrências de mudança de locais de refúgio para habitat emerso. Aconteceram algumas transições para e entre locais de refúgios, mas de um modo geral foram mais frequentes as deslocações dentro do habitat emerso. De forma análoga ao verificado no nível médio, na primeira data mais de metade dos exemplares do nível superior mudaram do habitat emerso para locais de refúgio, da semana seguinte até 05 de Setembro (com exceção de 31 de Julho a 07 de Agosto, onde não ocorreram deslocações) predominou a categoria ‘R – R’ que indica que as lapas em deslocação, apesar de se terem movimentado entre datas de amostragem, mantiveram posições de ocorrência em locais de refúgio. Nos meses de Junho (12 a 19) e Julho (10 a 17), houve novamente passagem de lapas do habitat emerso para locais de refúgio (20 e 16.7%, respetivamente). Ainda que não representado no gráfico, foi efetuada uma amostragem um mês após a conclusão da monitorização semanal

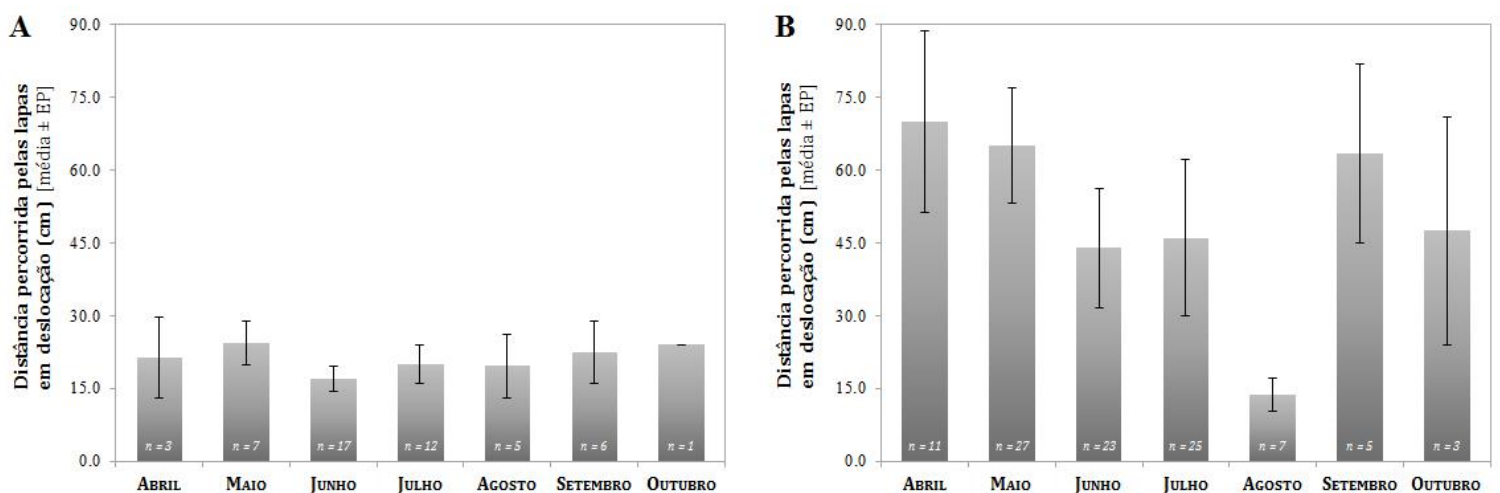
(em Outubro) onde se registaram quatro lapas em movimento em relação à última data, das quais todas apresentaram a mesma categoria de transição: de locais de refúgio para habitat emerso.



**Figura 4.9** – Proporção de lapas em deslocação em dois tipos de habitat (emerso ou locais de refúgio), durante 08 de Maio a 05 de Setembro de 2014, nos níveis médio (**A**) e superior (**B**) da distribuição vertical da espécie. Colunas em branco significam que não existiram lapas em deslocação nessa data. **Categorias de transição:** R – E, local de refúgio para emerso / R – R, local de refúgio para local de refúgio / E – R, emerso para local de refúgio / E – E, emerso para emerso.

A Figura 4.10 apresenta os padrões de deslocação a uma escala mensal, a partir dos registos efetuados entre Abril e Outubro.

Observando a figura, denota-se que no nível médio o valor médio do total de distâncias de deslocação registadas mensalmente variou num intervalo mais estreito [17.0 ( $\pm$  2.49, EP) – 24.2 ( $\pm$  4.53, EP) cm] em comparação com movimentos mais amplos estimados no nível superior (onde existe uma diferença de 56.5cm entre os valores mínimo e máximo). Enquanto no nível médio as distâncias de deslocação mensal mantiveram-se constantes, no nível superior verificou-se um decréscimo de movimento desde Abril até Agosto. O registo da menor distância percorrida verificou-se neste último mês mencionado com  $13.6 \pm 3.38$ cm (média  $\pm$ EP) – antecedendo uma subida de 4.5 vezes o seu valor em Setembro.



**Figura 4.10** – Distâncias de deslocação mensais (média  $\pm$  EP), entre Abril e Outubro de 2014, percorridas pelas lapas *P. depressa*, em centímetros, nos níveis médio (A) e superior (B) da distribuição vertical da espécie.

É importante salientar que a frequência de lapas em deslocação foi maior nos meses de Junho e Julho para o nível médio e entre Maio e Julho no nível superior (independentemente da distância alcançada).

#### 4.1.4. Ambiente térmico nos níveis médio e superior

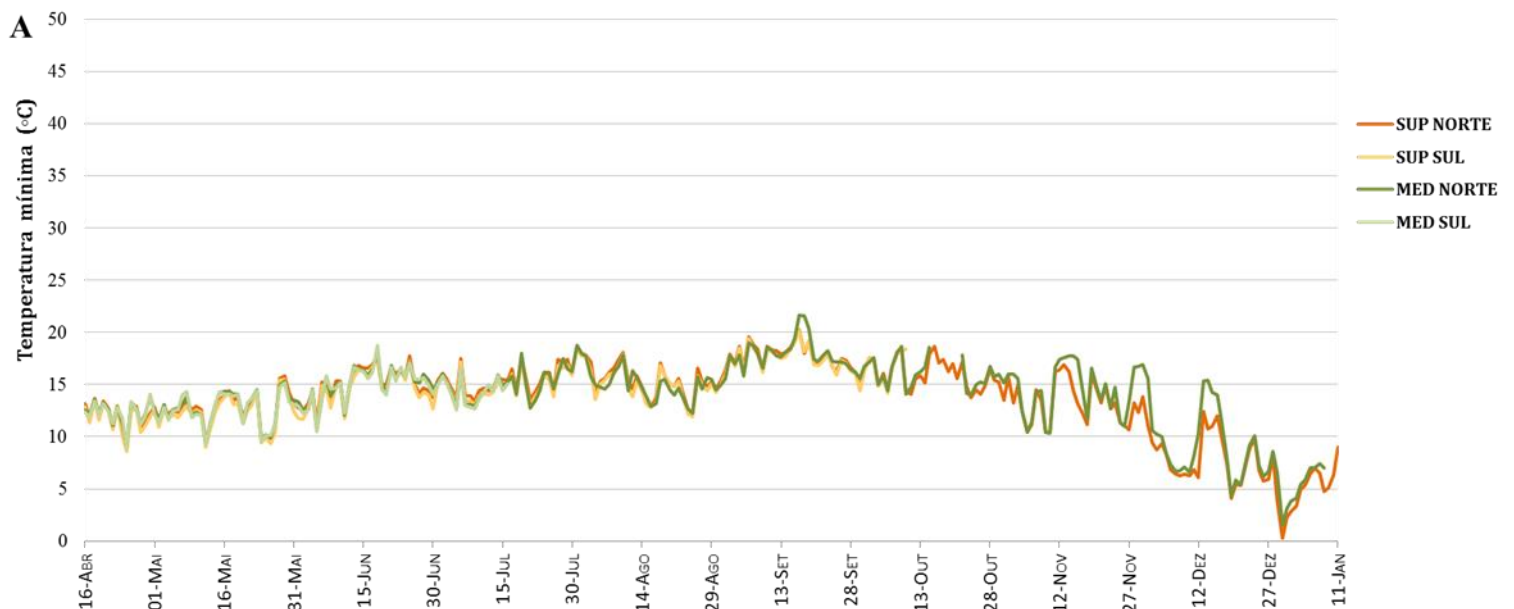
A caracterização do ambiente térmico envolvente desta espécie encontra-se descrita na figura seguinte (Fig. 4.11). Estes registos representam a temperatura medida entre meados de Abril de 2014 até à primeira quinzena de Janeiro de 2015, compreendendo parcialmente os períodos de inverno e primavera e a totalidade das duas restantes estações do ano.

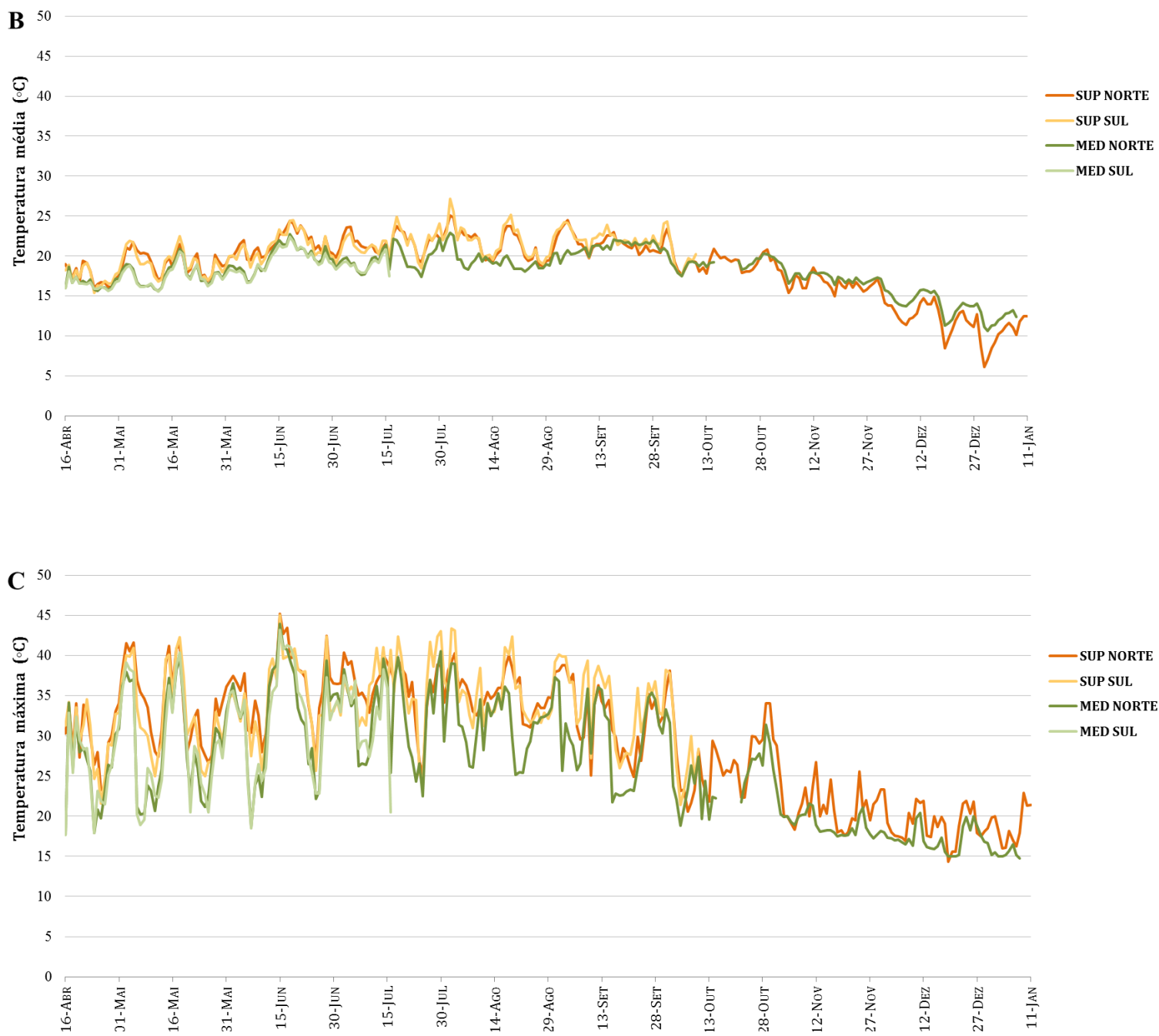
No geral, a temperatura elevou-se durante a segunda metade da primavera, sendo que em Setembro ainda se assinalavam valores altos. Esta desceu a partir de Outubro, atingindo os valores mais baixos entre Dezembro e Janeiro.

A temperatura mínima mostrou-se semelhante, tanto entre níveis como entre os lados norte e sul, ao longo dos meses. Esta aumentou gradualmente, atingindo o seu pico (acima dos 20°C) a meio do mês de Setembro; em Dezembro sofreu uma quebra onde, no dia 30, aproximou-se de 0°C (Fig. 4.11A).

A temperatura média manteve-se entre os 15 e 25°C durante aproximadamente 85% do período de registo, tendo baixado de forma mais evidente a partir de 01 de Dezembro de 2014. Nos meses de Abril e Maio esta variável encontrou-se maioritariamente abaixo dos 20°C e em Junho, Julho e Agosto acima dos 20°C; neste último mês registou-se o valor médio mais alto (Fig. 4.11B).

A temperatura máxima sofreu grandes oscilações térmicas em curtas escalas de tempo, registando diversos picos ao longo do ano. Esta variável começou a baixar em finais de Outubro / inícios de Novembro, e por conseguinte a variação entre valores também diminuiu. Focando no mês de Junho, é possível encontrar exemplos da flutuação mencionada: no nível médio, em oito dias (de 07 para 15) o máximo subiu 19.0°C ( $\pm 0.6$ , DP); enquanto no nível superior num espaço de dez dias (de 15 para 25) esta temperatura desceu, em média, 25.0°C ( $\pm 0.4$ , DP). A 15 de Junho alcançou o seu valor máximo, ultrapassando os 45°C, e nunca ficou abaixo dos 14°C (19 de Dezembro) (Fig. 4.11C).





**Figura 4.11** – Temperatura registada (em grau Celsius) nos níveis médio (MED) e superior (SUP) da distribuição vertical da espécie, em dois transectos (NORTE e SUL), durante 08 de Maio de 2014 a 11 de Janeiro de 2015. (A) Temperatura mínima; (B) Temperatura média; (C) Temperatura máxima. [ $n = 1$ ]

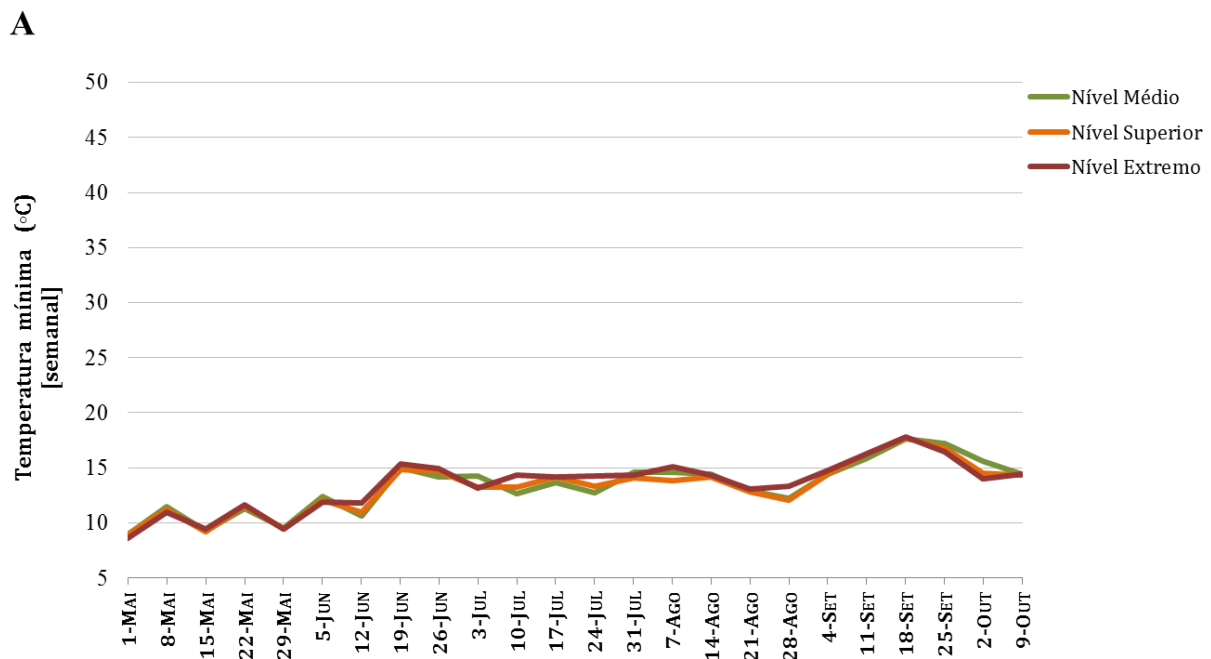
## 4.2. PROCESSOS

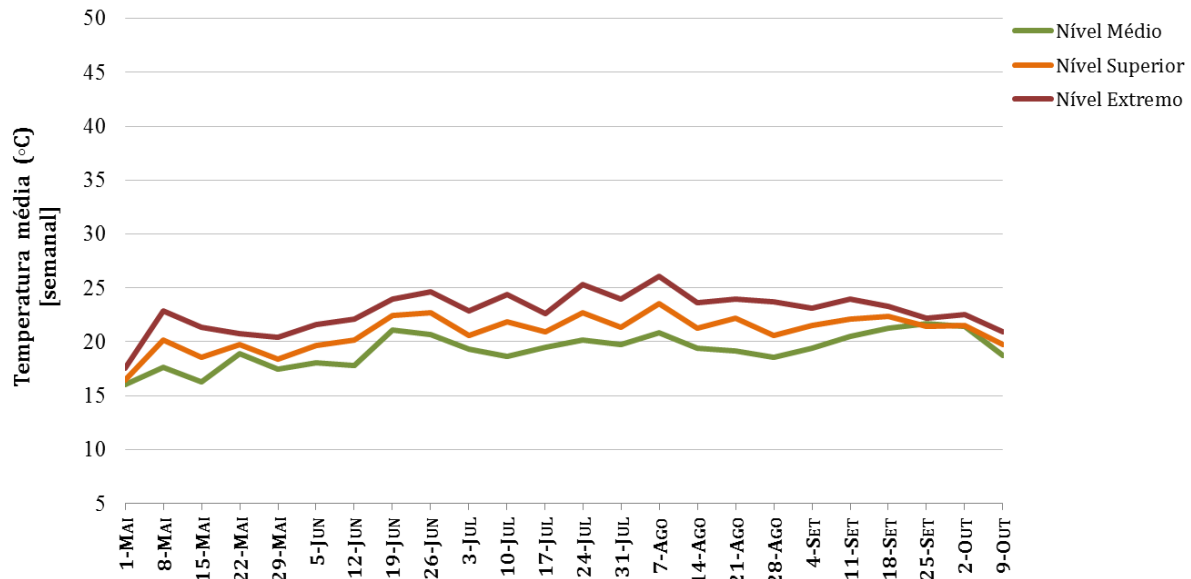
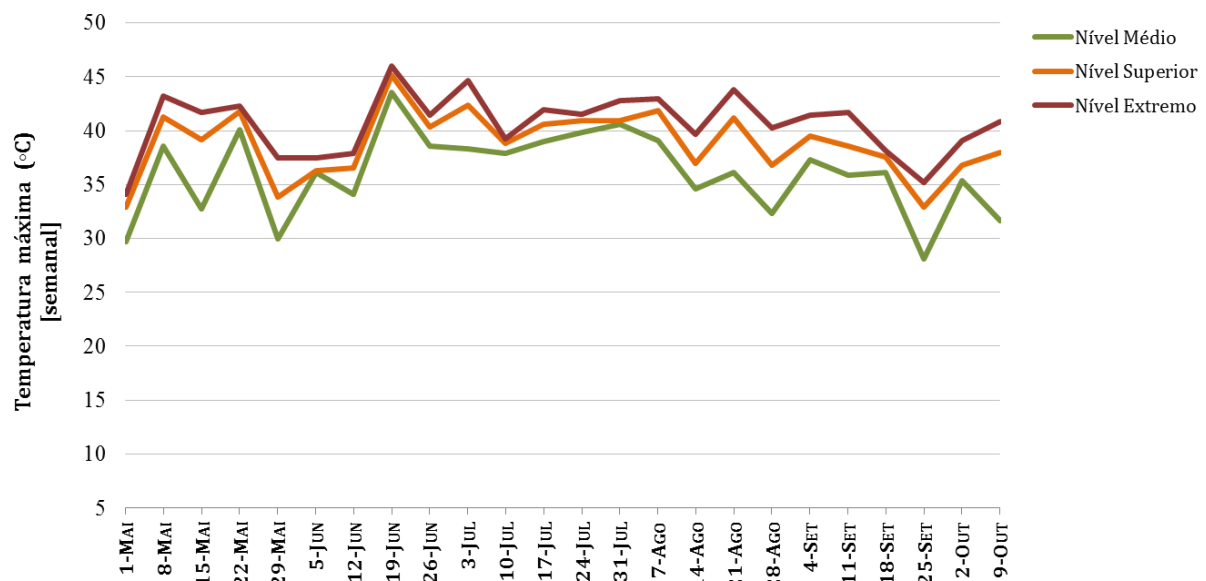
### 4.2.1. *Caracterização térmica e de abundância das áreas experimentais*

#### (a) **Variação térmica nas áreas experimentais**

Foi registrada a temperatura nos três níveis durante o decorrer das experiências de sobrevivência, crescimento e condição ecofisiológica (Fig. 4.12)

A temperatura mínima semanal exibiu um aumento suave e gradual, de aproximadamente 5.5°C, entre a primeira e última semana. Esta variável mostrou-se consistente entre níveis; e entre 18 e 25 de Setembro foram assinaladas as temperaturas mínimas mais elevadas, ultrapassando os 15°C (Fig. 4.12A). A temperatura máxima semanal sofreu flutuações ao longo do tempo, pertencendo ao nível médio tanto a maior subida como a maior descida de temperatura entre duas semanas consecutivas, 9.5°C (entre 12 e 19 de Junho) e 10.1°C (entre 22 e 29 de Maio) respetivamente. No segmento da temperatura máxima, a mais alta foi registada em 19 de Junho, ultrapassando os 43°C em todos os níveis (Fig. 4.12C).



**B****C**

**Figura 4.12** – Temperatura registada (em grau Celsius) nos níveis médio (MED) e superior (SUP) da distribuição vertical da espécie, nas zonas onde decorreram as experiências manipulativas, durante 01 de Maio a 09 Outubro de 2014. (A) Temperatura mínima; (B) Temperatura média; (C) Temperatura máxima.  $n = 2$  (com exceção do intervalo de tempo de 24 de Julho a 09 Outubro para o nível médio, em todos os gráficos,  $n = 1$ ).

É de ressaltar que as lapas estiveram expostas a uma amplitude térmica variada, com uma diferença entre a temperatura mínima e máxima, à escala semanal, superior a 20°C (em média) (Tabela 4.1). Ainda que as experiências com lapas pequenas e grandes tenham decorrido em períodos diferentes (com uma janela temporal comum de aproximadamente dois meses), estas apresentaram a mesma tendência entre níveis: quanto mais elevada a altura do nível vertical, maior será a diferença entre a temperatura mínima e máxima.

**Tabela 4.1** – Diferencial entre a temperatura mínima e máxima semanal registada durante o período de estudo de cada experiência, em grau Celsius, para cada nível estudado (média  $\pm$  DP). **Período de estudo:** Lapas pequenas (inferior a 2cm) – 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014; Lapas grandes (superior a 2cm) – 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014.

	LAPAS PEQUENAS	LAPAS GRANDES
<b>MÉDIO</b>	24.2 $\pm$ 2.69	21.5 $\pm$ 4.32
<b>SUPERIOR</b>	26.9 $\pm$ 2.42	24.3 $\pm$ 3.43
<b>EXTREMO</b>	28.2 $\pm$ 2.49	25.8 $\pm$ 3.11

Comparações de temperatura entre níveis encontram-se descritas na Tabela 4.2. Comprovou-se que a variação da temperatura mínima entre níveis foi bastante semelhante (complementar com Fig. 4.12), com uma diferença [entre níveis], em média, inferior a 0.5°C. O aumento de temperatura média do nível médio para o nível superior foi equivalente à subida registada do superior para o nível extremo, refletindo-se no diferencial entre o médio e o extremo – que foi o dobro em relação aos diferenciais entre dois níveis consecutivos. Relativamente à temperatura máxima, foi maior a diferença registada do nível médio para o superior (em sensivelmente 1°C) do que do nível superior para o extremo.

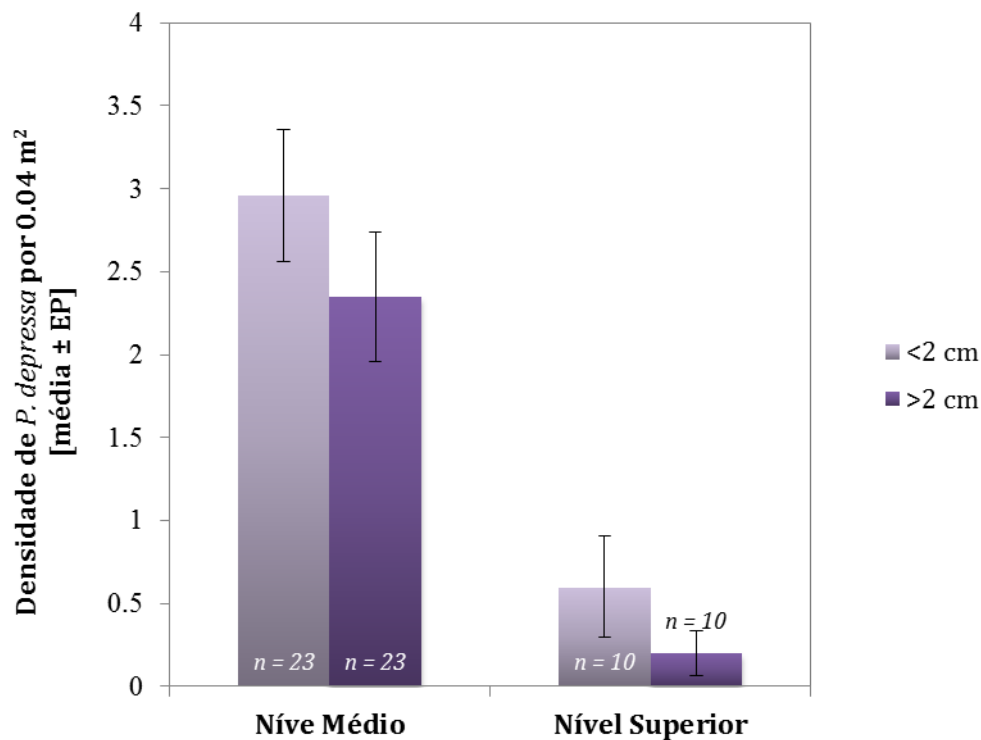
**Tabela 4.2** – Diferencial entre as temperaturas mínimas, médias e máximas semanais, em grau Celsius, para cada par de níveis (média  $\pm$  DP). **Período de estudo:** Lapas pequenas (inferior a 2cm) – 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014; Lapas grandes (superior a 2cm) – 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. **Níveis estudados:** MED – Médio; SUP – Superior; EXT – Extremo.

	LAPAS PEQUENAS			LAPAS GRANDES		
	Mínima	Média	Máxima	Mínima	Média	Máxima
<b>SUP – MED</b>	-0.1 $\pm$ 0.50	1.7 $\pm$ 1.01	2.7 $\pm$ 1.80	-0.1 $\pm$ 0.46	1.9 $\pm$ 0.76	2.6 $\pm$ 1.68
<b>EXT – SUP</b>	0.4 $\pm$ 0.56	1.9 $\pm$ 0.75	1.9 $\pm$ 0.99	0.4 $\pm$ 0.51	2.1 $\pm$ 0.60	1.7 $\pm$ 0.98
<b>EXT – MED</b>	0.3 $\pm$ 0.84	3.6 $\pm$ 1.64	4.6 $\pm$ 2.55	0.3 $\pm$ 0.75	4.0 $\pm$ 1.21	4.3 $\pm$ 2.45

### (b) Abundância nas áreas experimentais

Ambas as classes dimensionais apresentaram a mesma tendência, revelando que as suas densidades de lapas no nível médio foram significativamente maiores em comparação com as no nível superior (inferior a 2cm: dados transformados com a raiz quadrada, Levene = 0.010,  $p = 0.923$ ; ANOVA,  $F_{1,31} = 18.191$ ,  $p < 0.001$  / superior a 2cm: dados transformados com a raiz quadrada, Levene = 3.547,  $p = 0.069$ ; ANOVA,  $F_{1,31} = 18.954$ ,  $p < 0.001$ ). A diferença

apresentada correspondeu a valores 4.9 e 11.7 vezes superiores no nível médio em relação ao nível superior, para lapas pequenas [inferior a 2cm] e grandes [superior a 2cm] respetivamente. No entanto, dentro do mesmo nível as duas classes exibiram valores médios semelhantes (com uma diferença de aproximadamente 0.5). O nível extremo não se encontra representado no gráfico porque não se registaram lapas em dez réplicas efetuadas.



**Figura 4.13** – Número total (média ± EP) de lapas da espécie *P. depressa* por quadrado com dimensões de 20x20cm, pertencentes a duas classes dimensionais (inferior e superior a 2cm), em dois níveis de distribuição vertical (médio e superior).

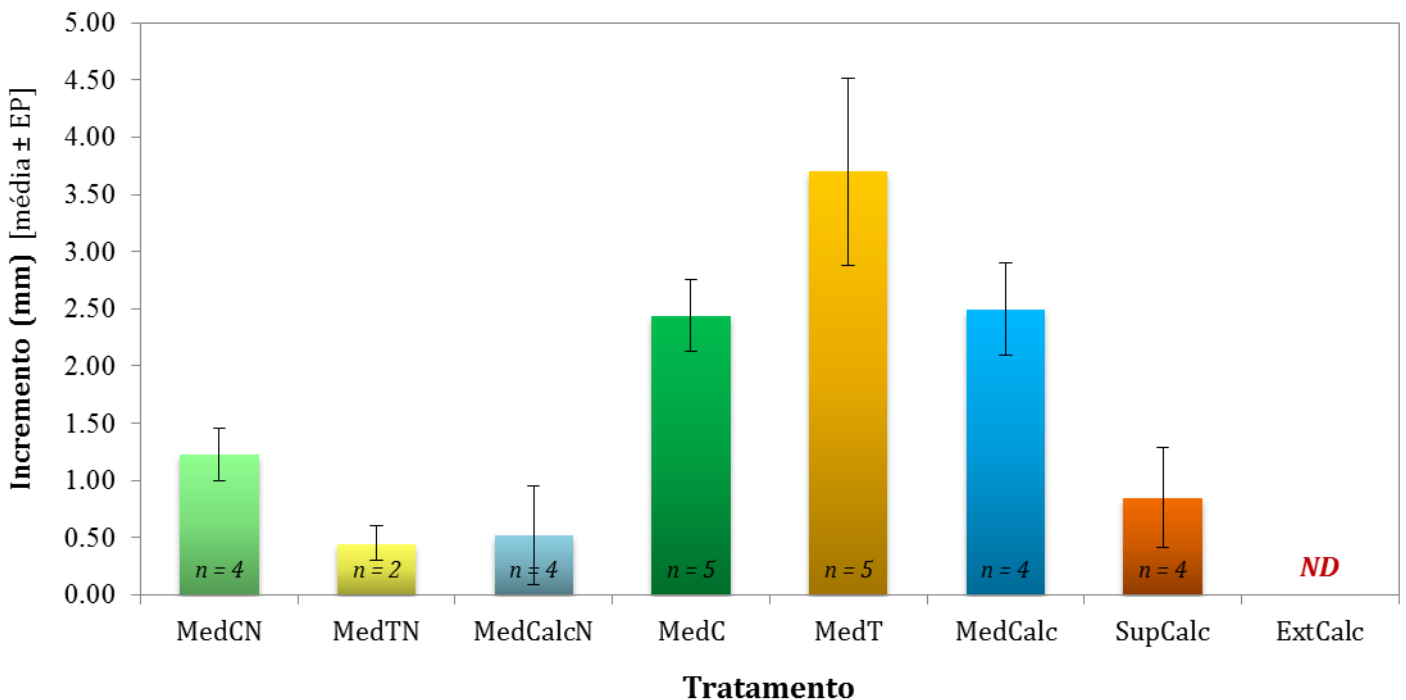
#### 4.2.2. Crescimento em lapas pequenas

##### 4.2.2.1. Medição com craveira (físico)

O aumento do comprimento máximo da concha (CMC) mostrou-se variável entre tratamentos – nos tratamentos ‘MedCalcN’ (transplante para densidade natural, nível médio) e ‘SupCalc’ (transplante sozinha nível superior) houve réplicas que não revelaram crescimento (i.e., CMC inicial e final foram iguais) enquanto, por oposição, na manipulação ‘MedT’ (transplante sozinho, nível médio) um exemplar obteve um aumento de 5.40 mm (Fig. 4.14). Estas diferenças, relativas ao CMC médio, para os diferentes tratamentos foram estatisticamente significativas (dados não transformados, Levene = 1.722,  $p = 0.165$ ;

ANOVA,  $F_{6,21} = 5.572$ ,  $p = 0.001$ ), porém através de testes SNK ( $p < 0.05$ ) não se obteve um padrão definido.

Focando-se nas diferenças entre o tratamento do superior e os do médio para cada tipo de densidade (superior a duas lapas por jaula ou apenas uma lapa marcada sozinha), verificou-se que o CMC em lapas do transplante sozinho no nível superior é estatisticamente igual aos tratamentos ocorridos no médio em densidade natural (dados não transformados, Levene = 2.944,  $p = 0.085$ ; ANOVA,  $F_{3,10} = 0.822$ ,  $p = 0.511$ ). Entre lapas sozinhas do nível superior e do médio foram encontradas diferenças consideráveis (dados não transformados, Levene = 1.477,  $p = 0.264$ ; ANOVA,  $F_{3,14} = 4.292$ ,  $p = 0.024$ ), mas não se conseguiu definir um padrão sendo apenas possível afirmar que os transplantes ‘MedT’ e ‘SupCalc’ apresentaram a maior diferença entre si, pertencendo a grupos diferentes (testes de SNK,  $p < 0.05$ ).



**Figura 4.14** – Incremento do CMC, em milímetros, em lapas da espécie *P. depressa* com tamanho inferior a 2cm por tratamento experimental (média ± EP). **Tratamentos:** MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedCalcN – Transplante para densidade natural, marcada com calceína, no nível médio; MedC – Controlo sozinha, no nível médio; MedT – Transplante sozinha, no nível médio; MedCalc - Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível médio; SupCalc – Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível superior; ExtCalc – Transplante sozinha, marcada com calceína, no nível extremo. Devido à mortalidade total dos indivíduos durante o ensaio experimental, não se obteve os tamanhos finais para o tratamento ExtT, impossibilitando o cálculo do seu crescimento (ND – dados não disponíveis).

#### 4.2.2.2. Método da calceína (químico)

Devido à mortalidade verificada nos tratamentos experimentais marcados com calceína (ver seção 4.2.3 – Fig. 4.17), poucas réplicas foram recapturadas e medidas em laboratório. O tratamento ‘MedCalc’ (transplante sozinho, marcado com calceína, no nível médio) conteve o maior número de réplicas vivas no final da experiência, sendo por isso o utilizado nas comparações subsequentes em (a).

##### (a) Relações alométricas entre as diferentes medidas obtidas pelo método da calceína

As quatro medidas de crescimento obtidas através do método da calceína encontram-se dispostas na Tabela 4.3, para o tratamento ‘MedCalc’ (transplante sozinho, marcada com calceína, no nível médio). As medidas retiradas na zona anterior da lapa (AE, AI) apresentaram médias idênticas, enquanto na zona posterior a medida interior (PI) foi ligeiramente superior à exterior (PE). É notório, com base nestes exemplares, um maior incremento na zona posterior que na zona anterior.

**Tabela 4.3** – Quatro medidas de crescimento (em milímetros) para os exemplares do tratamento ‘MedCalc’ utilizando o método da calceína. ND – dados não disponíveis devido à não existência de uma banda distinta de calceína. AE – Medida do lado exterior da concha na zona anterior da lapa; AI – Medida do lado interior da concha na zona anterior da lapa; PE – Medida do lado exterior da concha na zona posterior da lapa; PI – Medida do lado interior da concha na zona posterior da lapa.

Réplica	AE	AI	PE	PI
1	2.62	2.60	4.65	4.15
2	ND	1.81	2.36	2.83
3	1.81	1.43	1.32	2.17
4	0.95	1.10	2.39	3.27
<b>Média ± EP</b>	1.79 ± 0.834	1.74 ± 0.647	2.68 ± 1.401	3.10 ± 0.828

Com base nos valores apresentados na tabela anterior, foram analisadas as relações alométricas possivelmente existentes entre as medidas (Tabela 4.4). Apenas a interação entre AI – PI apontou para uma diferença estatisticamente significativa ( $t = -4.347$ , g.l. = 3,  $p = 0.022$ ), i.e., no lado interior da concha, o valor médio do incremento na zona posterior foi consideravelmente maior que o da anterior.

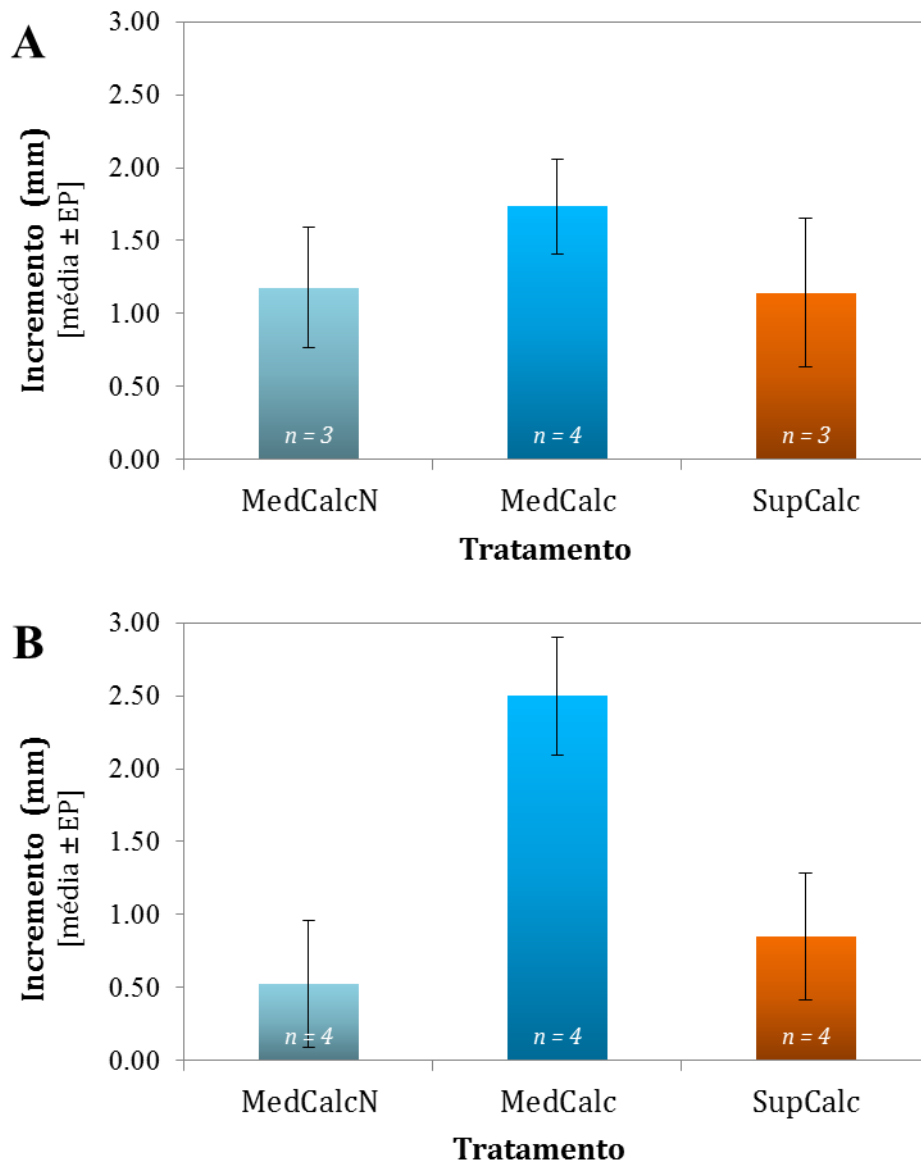
**Tabela 4.4** – Relações alométricas entre as quatro medidas retiradas utilizando o método da calceína, no tratamento ‘MedCalc’.  $n = 4$  (AI–PE, AI–PI, PE–PI) e  $n = 3$  (AE–AI, AE–PE, AE–PI). **Medidas:** AI – do lado interior da concha na zona anterior da lapa, AE – do lado exterior da concha na zona anterior da lapa, PI – do lado interior da concha na zona posterior da lapa, PE – do lado exterior da concha na zona posterior da lapa.

	<i>t</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
AE–AI	0.533	2	0.647
AI–PE	-2.027	3	0.136
AI–PI	-4.347	3	<b>0.022</b>
PE–PI	-1.319	3	0.279
AE–PE	-1.305	2	0.322
AE–PI	-2.465	2	0.133

**(b) Comparação do incremento obtido através do método da calceína com o da craveira**

Os valores médios ( $\pm$  EP) de crescimento mensurados em cada um dos procedimentos, para os mesmos três tratamentos, encontram-se representados na Fig. 4.15. O número de réplicas associado a duas das manipulações é menor na seção A da figura do que na seção B devido a um indivíduo em cada tratamento não apresentar uma banda reconhecível de calceína (no entanto, foi possível medir o seu CMC em campo).

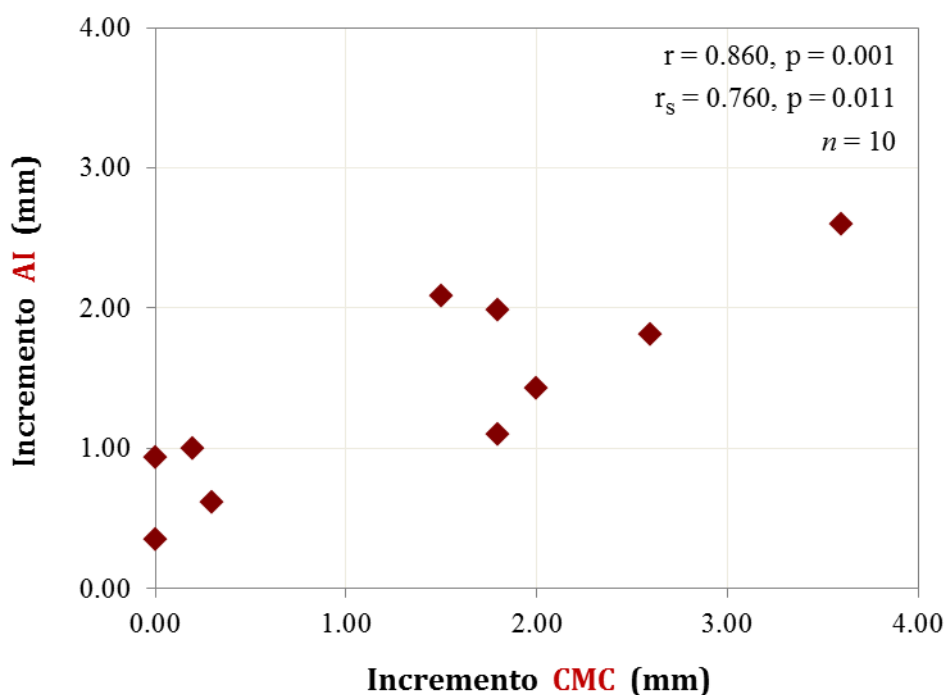
Em ambos os procedimentos a manipulação ‘MedCalc’ exibiu o incremento médio mais elevado. Porém no método da calceína as diferenças entre tratamentos não foram consideradas significativas (dados não transformados, Levene = 0.165,  $p = 0.851$ ; ANOVA,  $F_{2,7} = 0.723$ ,  $p = 0.518$ ) (Fig. 4.15A), enquanto na medição com craveira os tratamentos ‘MedCalcN’ e ‘SupCalc’ foram considerados estatisticamente iguais, formando um conjunto, e com médias inferiores à do tratamento ‘MedCalc’ (dados não transformados, Levene = 0.189,  $p = 0.831$ ; ANOVA,  $F_{2,9} = 6.233$ ,  $p = 0.020$ ; testes de SNK,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4.15B).



**Figura 4.15** – Crescimento (média ± EP), em milímetros, em lapas da espécie *P. depressa* com tamanho inferior a 2cm utilizando dois procedimentos diferentes de medição – (A) Método da calceína e (B) Medição com craveira. **Tratamentos:** MedCalcN (transplante para densidade natural, marcado com calceína, no nível médio); MedCalc (transplante sozinho, marcado com calceína, no nível médio); SupCalc (transplante sozinho, marcado com calceína, no nível superior).

**(c) Relação entre a medida ‘AI’ (método da calceína) com o incremento total (medição com craveira)**

Agrupando o número de réplicas dos três tratamentos, foi equacionada a afinidade entre a medida obtida através do método da calceína (AI) e a medição com craveira (CMC) (Fig. 4.16). Testes de análise estatística indicaram que as duas variáveis estão correlacionadas positivamente, através dos coeficientes de Pearson ( $r = 0.860$ ,  $p = 0.001$ ) e de Spearman ( $r_s = 0.760$ ,  $p = 0.011$ ) ( $n = 10$ ), assinalando um aumento proporcional entre as duas.



**Figura 4.16** – Relação entre as variáveis de crescimento ‘AI’ (método da calceína, medida interior da zona anterior da lapa) e ‘CMC’ (medição com craveira, comprimento máximo da concha) em exemplares, com tamanho inferior a 2cm, da espécie *P. depressa*. Incremento em milímetros.

### 4.2.3. Sobrevivência em lapas pequenas e grandes

Foi estudada a sobrevivência de lapas com tamanho inferior (Fig. 4.17) e superior (Fig. 4.18) a dois centímetros em três níveis verticais, através de experiências manipulativas *in situ*.

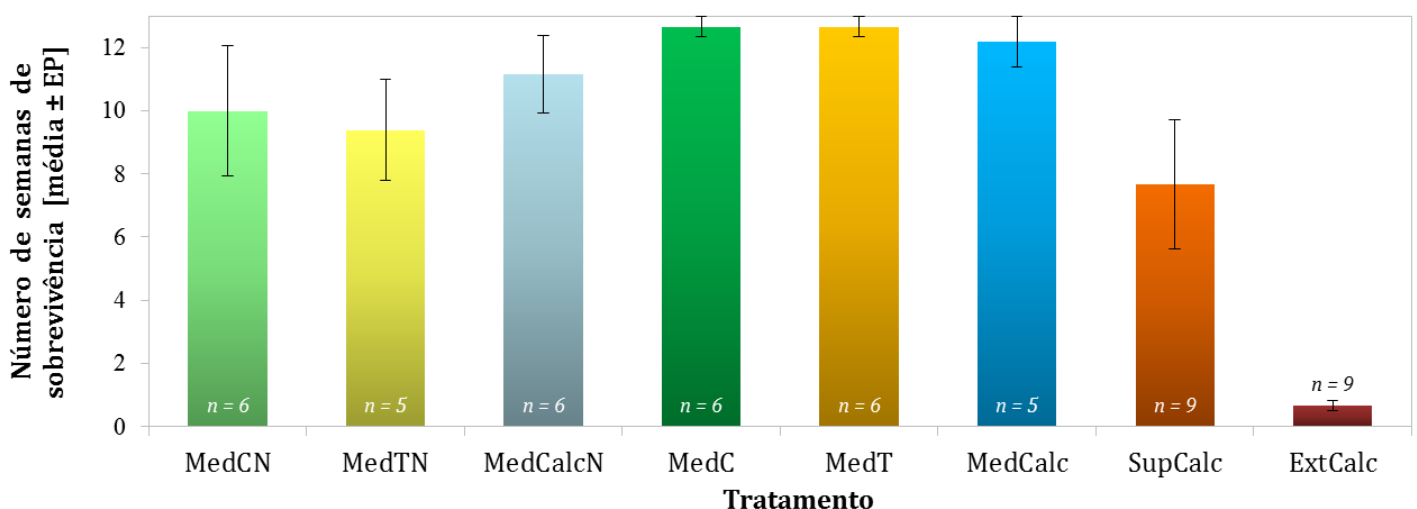
#### (a) Lapas pequenas (inferior a dois centímetros)

Durante 13 semanas (entre Julho e Outubro), todos os tratamentos com lapas pequenas (inferior a 2cm) sofreram alguma mortalidade (Fig. 4.17).

Na análise estatística, integradora de todas as manipulações, não se conseguiu obter homogeneidade das variâncias resultando em diferenças significativas entre o número de semanas de sobrevivência dos diferentes tratamentos (dados não transformados, Levene = 12.766,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{7,44} = 10.193$ ,  $p < 0.001$ ); os testes de SNK ( $p < 0.05$ ) sugeriram que o tratamento no nível extremo (‘ExtCalc’) seria a fonte destas desigualdades, como este apresentava um número médio de semanas de sobrevivência bastante inferior aos restantes tratamentos. Para averiguar as relações entre os tratamentos do nível médio e o do nível superior (e confirmar que o do nível extremo estaria na origem das inconformidades das

variâncias) foram executadas duas análises: comparando o número de semanas de sobrevivência do tratamento no nível superior com os tratamentos em densidade natural no nível médio (1) e com os tratamentos com apenas uma lapa no nível médio (2). O número de semanas de sobrevivência do tratamento no nível superior e os dos tratamentos com lapas em densidade natural no nível médio foram considerados estatisticamente iguais (dados não transformados, Levene = 3.604,  $p = 0.029$ ; ANOVA,  $F_{3,22} = 0.667$ ,  $p = 0.581$ ). Já entre o número de semanas de sobrevivência do tratamento no nível superior e os dos tratamentos com apenas uma lapa no nível médio foram encontradas diferenças (dados não transformados, Levene = 23.622,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{3,22} = 3.172$ ,  $p = 0.044$ ), como novamente não foi assegurada a homogeneidade das variâncias realizou-se uma última comparação entre os tratamentos do nível médio utilizados na última análise mencionada, com o nível superior. Entre os tratamentos do nível médio não se detetaram diferenças significativas (dados não transformados, Levene = 1.713,  $p = 0.216$ ; ANOVA,  $F_{2,14} = 0.276$ ,  $p = 0.763$ ), sugerindo que a manipulação no nível superior é diferente deste grupo de tratamentos no nível médio. Em suma, o tratamento do nível extremo é o mais afastado dos restantes níveis (apresentando um número médio inferior a uma semana de sobrevivência); o número de semanas de sobrevivência do tratamento do nível superior (uma lapa sozinha por jaula) é estatisticamente diferente das manipulações também com apenas um exemplar no nível médio e igual aos tratamentos aplicados em densidade natural no nível médio.

A mortalidade foi representada em conjunto com a temperatura registada em cada nível, contudo estas duas variáveis não aparentaram estar relacionadas (ver Anexo B).

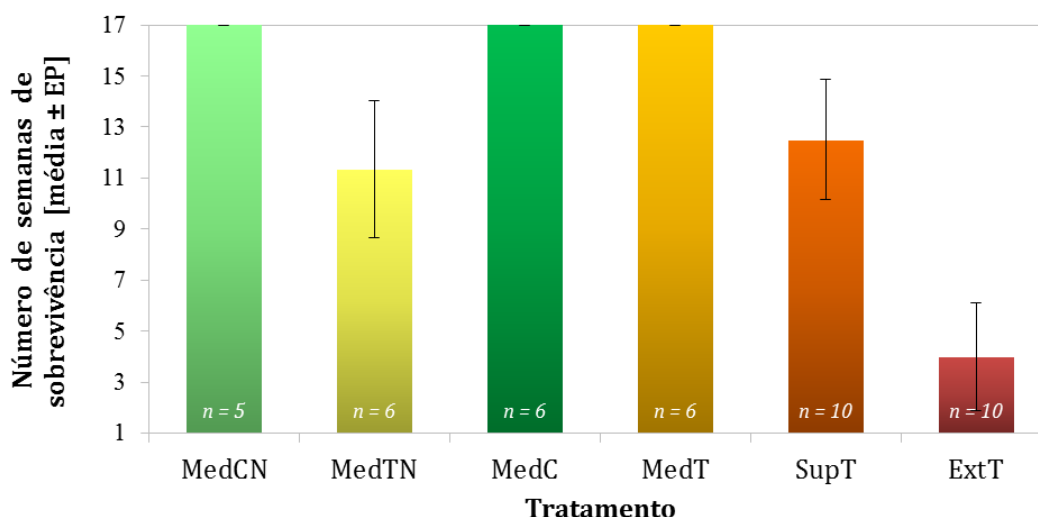


**Figura 4.17** – Número de semanas de sobrevivência por tratamento (média  $\pm$  EP), em lapas com tamanho inferior a 2cm da espécie *P. depressa*, durante o período de 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014. **Tratamentos:** MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedCalcN – Transplante para densidade natural, marcado com calceína, no nível médio; MedC – Controlo, sozinho, no nível médio; MedT – Transplante, sozinho, no nível médio; MedCalc – Controlo sozinho, marcado com calceína, no nível médio; SupCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível superior; ExtCalc – Transplante sozinho, marcado com calceína, no nível extremo.

### **(b) Lapas grandes (superior a dois centímetros)**

Foi exercido um estudo equivalente ao previamente apresentado, mas com exemplares com dimensões superiores (superior a 2cm). Esta experiência decorreu durante 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014, concluindo às 17 semanas (Fig. 4.18). Durante este período três tratamentos do nível médio ('MedC', 'MedCN' e 'MedT') não sofreram mortalidade de réplicas; enquanto no nível extremo, ao fim de duas semanas, 70% das lapas não se encontravam vivas. No teste estatístico produzido com o número de semanas de sobrevivência de cada tratamento não se alcançou uniformidade entre as variâncias (dados não transformados, Levene = 8.963,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{5,37} = 7.079$ ,  $p < 0.001$ ) e os testes de SNK ( $p < 0.05$ ) sugeriram que, novamente, o tratamento do nível extremo seria o causador das diferenças encontradas. Repetindo a análise, desta vez sem os dados referentes à manipulação no extremo ('ExtT'), confirmou-se que as diferenças observadas entre as restantes manipulações não foram significativas (dados não transformados, Levene = 17.150,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{4,28} = 2.021$ ,  $p = 0.119$ ). Comparando o tratamento do nível superior com os tratamentos em densidade natural (dados não transformados, Levene = 10.250,  $p = 0.001$ ; ANOVA,  $F_{4,28} = 1.235$ ,  $p = 0.314$ ) e com os tratamentos sozinhos (dados não transformados, Levene = 20.649,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{2,19} = 2.113$ ,  $p = 0.148$ ), do nível médio, não se obtiveram diferenças consideráveis. Estes resultados revelaram que a sobrevivência é indiferente entre os tratamentos dos níveis médio e superior, no entanto este conjunto é distinto do transplante para o nível extremo (que apresenta uma média bastante inferior).

A mortalidade foi representada em conjunto com a temperatura registada em cada nível (ver Anexo B). A única associação aparente foi entre o nível superior e a temperatura máxima registada semanalmente. Neste nível, nas duas datas onde o número de lapas baixou (08 de Maio e 19 de Junho) registou-se um aumento da temperatura máxima de 8.4°C e 8.6°C, respetivamente, em relação à semana que antecedeu cada data. Estas foram as duas ocasiões, de todo o tempo de amostragem, onde ocorreu um aumento desta escala. No restante período, entre datas consecutivas, a temperatura elevou-se no máximo 4.2°C.



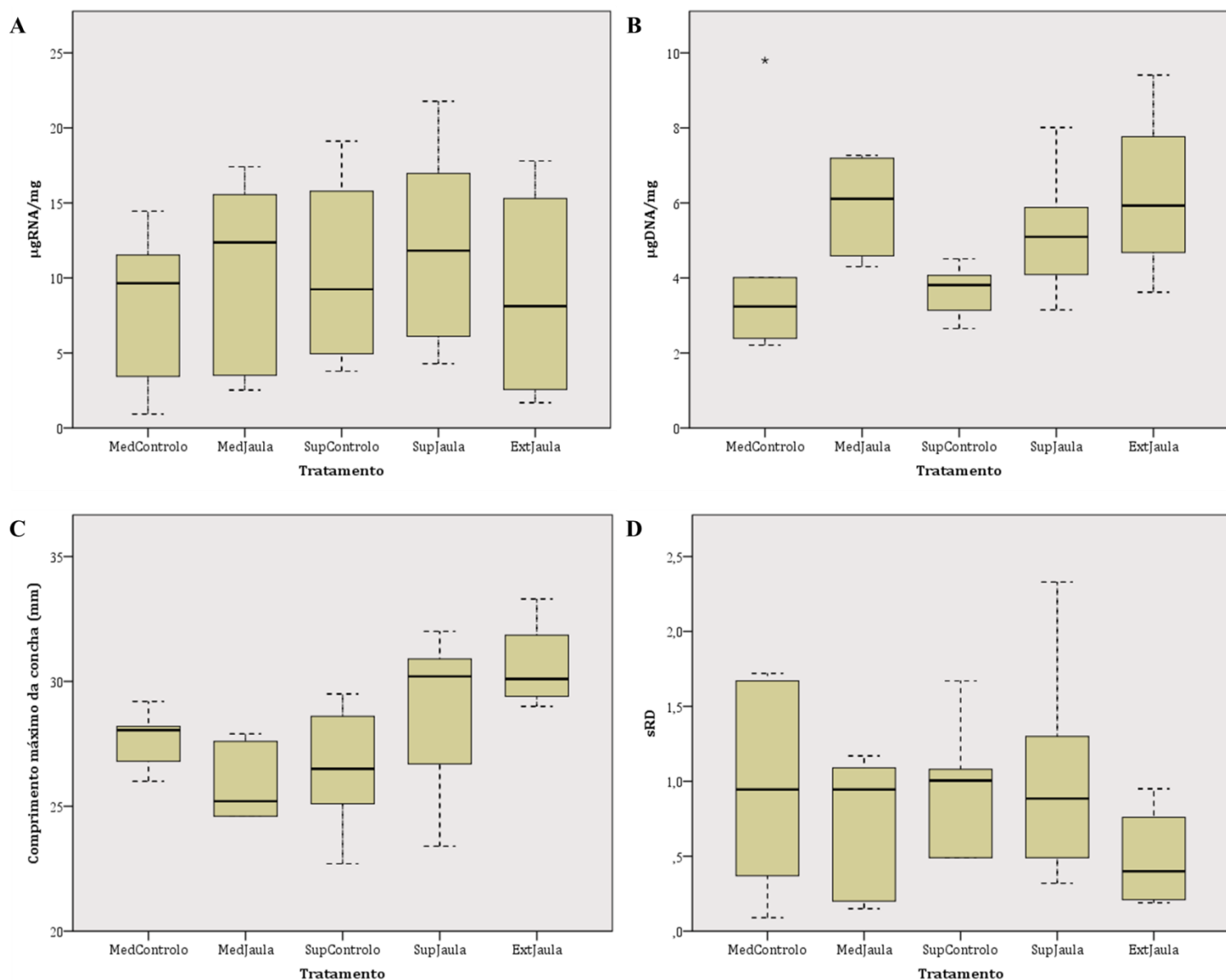
**Figura 4.18** – Número de semanas de sobrevivência por tratamento (média ± EP), em lapas com tamanho superior a 2cm da espécie *P. depressa*, durante o período de 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. **Tratamentos:** MedCN – Controlo em densidade natural, no nível médio; MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; MedC – Controlo sozinho, no nível médio; MedT – Transplante sozinho, no nível médio; SupT – Transplante sozinho, no nível superior; ExtT – Transplante sozinho, no nível extremo.

#### 4.2.4. Condição ecofisiológica em lapas grandes a curto e médio prazo

Foi estudada a condição ecofisiológica, sob condições manipulativas em campo, a curto (uma semana – Fig. 4.19) e médio (dezassete semanas – Fig. 4.20) prazo, em lapas com tamanho inferior a dois centímetros.

##### (a) Curto prazo

A curto prazo não se verificaram diferenças na condição ecofisiológica entre tratamentos em nenhum dos parâmetros ( $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ : dados não transformados, Levene = 0.455,  $p = 0.768$ ; ANOVA,  $F_{4,23} = 0.325$ ,  $p = 0.858$  /  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$ : dados não transformados, Levene = 1.056,  $p = 0.401$ ; ANOVA,  $F_{4,23} = 1.826$ ,  $p = 0.158$  / sRD: dados não transformados, Levene = 1.359,  $p = 0.279$ ; ANOVA,  $F_{4,23} = 0.722$ ,  $p = 0.586$ ). Apesar de no comprimento máximo da concha ter existido diferenças entre grupos (dados não transformados, Levene = 2.367,  $p = 0.083$ ; ANOVA,  $F_{4,28} = 3.653$ ,  $p = 0.019$ ) não é relevante para o estudo porque esta diferença não tem nenhum parâmetro associado com a mesma tendência (Fig. 4.19).

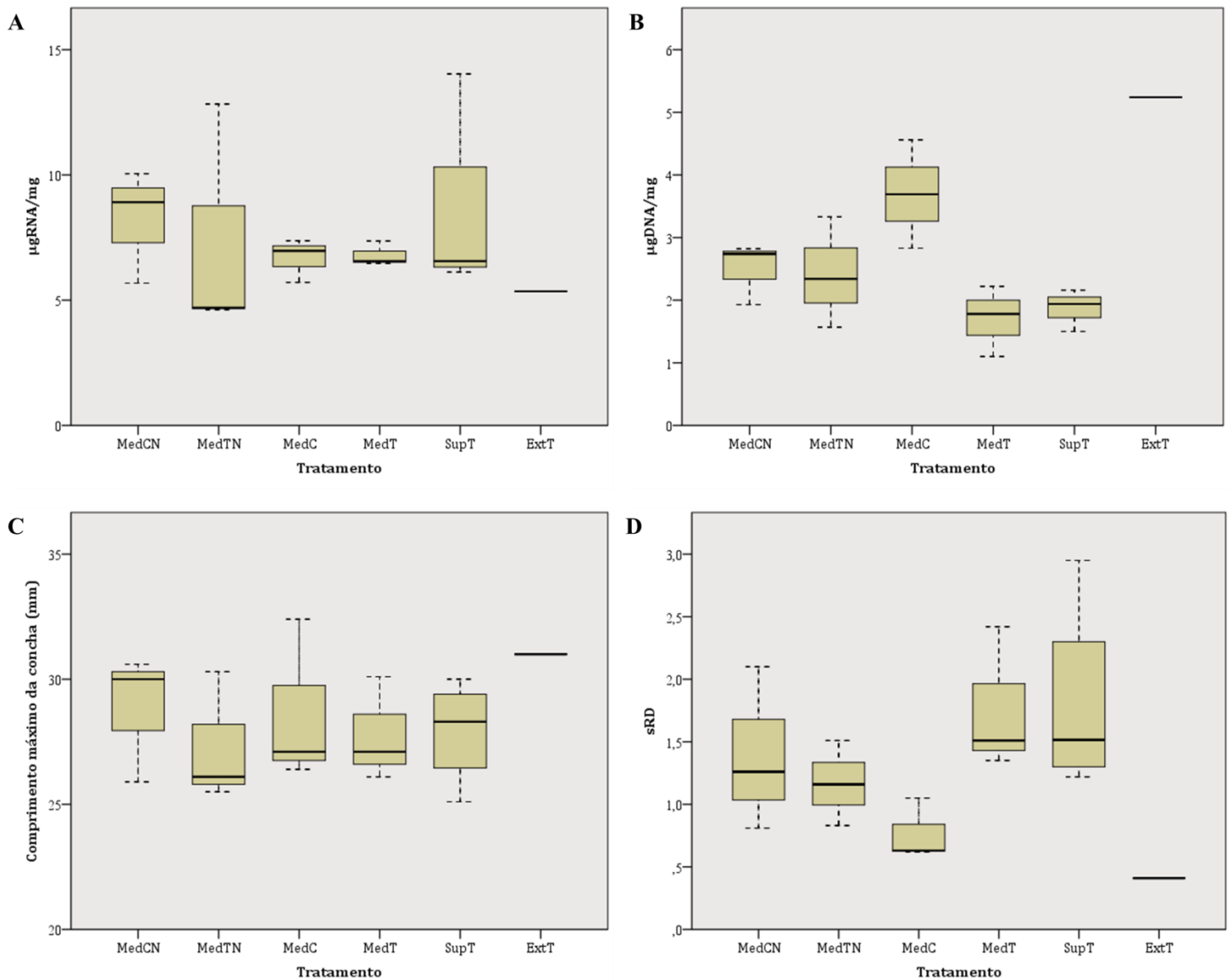


**Figura 4.19** – Condição ecofisiológica a curto prazo (07 a 14 de Agosto de 2014) de lapasda espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm, por tratamento. Linha contínua espessa representa a mediana e a tracejado o maior e menor valor registado. **Variáveis de estudo:** (A)  $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ , (B)  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$ , (C) comprimento máximo da concha (CMC) (em milímetros), (D) rácio RNA:DNA estandardizado (sRD). **Tratamentos:** MedControlo – Controlo no nível médio [ $n = 3$ ], MedJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível médio [ $n = 3$ ], SupControlo – Controlo no nível superior [ $n = 3$ ], SupJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível superior [ $n = 3$ ], ExtJaula – Transplante de uma lapa sozinha para o nível extremo [ $n = 4$ ].

### (b) Médio prazo

A variável  $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$  revelou-se similar entre tratamentos (dados não transformados, Levene = 3.741,  $p = 0.037$ ; ANOVA,  $F_{5,11} = 0.267$ ,  $p = 0.922$ ), assim como a razão entre RNA e DNA (sRD) (dados não transformados, Levene = 1.121,  $p = 0.395$ ; ANOVA,  $F_{5,11} = 1.959$ ,  $p = 0.164$ ). No entanto, o  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$  mostrou diferenças significativas (dados não

transformados, Levene = 0.892,  $p = 0.501$ ; ANOVA,  $F_{5,11} = 7.568$ ,  $p = 0.003$ ), ainda que sem padrão definido. Observando o gráfico, verificou-se que os tratamentos ‘MedC’ e ‘ExtT’ possuem os valores mais altos de DNA, que estão em concordância com valores sRD mais baixos para estes dois grupos em relação aos restantes (ainda que não significativamente) (ambos com mediana inferior a 1). Os tamanhos das lapas utilizadas na experiência a médio prazo são estaticamente iguais (dados não transformados, Levene = 0.524,  $p = 0.720$ ; ANOVA,  $F_{5,11} = 0.404$ ,  $p = 0.836$ ), confirmando que estes não influenciaram o padrão registado para o DNA (a fonte dessa diferença é devido à manipulação e não por serem maiores) (Fig. 4.20).



**Figura 4.20** – Condição ecofisiológica a médio prazo (01 de Maio a 28 de Agosto de 2014) de lapas da espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm, por tratamento. Linha contínua espessa representa a mediana e a tracejada o maior e menor valor registado. **Variáveis de estudo:** (A)  $\mu\text{gRNA mg}^{-1}$ , (B)  $\mu\text{gDNA mg}^{-1}$ , (C) comprimento máximo da concha (CMC) (em milímetros), (D) rácio RNA:DNA estandardizado (sRD). **Tratamentos:** MedCN – Controlo, com densidade natural, no nível médio [ $n = 3$ ]; MedTN – Transplante, sozinho, no nível médio [ $n = 3$ ]; MedC – Controlo, sozinho, no nível médio [ $n = 3$ ]; MedT – Transplante, sozinho, no nível médio [ $n = 3$ ]; SupT – Transplante sozinho, no nível superior [ $n = 4$ ]; ExtT – Transplante sozinho, no nível extremo [ $n = 1$ ].

## **5 DISCUSSÃO**

Com a realização deste estudo verificou-se que a espécie *P. depressa* apresenta padrões relativos à sua distribuição vertical que variam tanto a nível temporal como espacial, sendo potencialmente influenciados pela variação de fatores associados a estes dois tipos de escala (e.g., temperatura difere tanto ao longo do eixo vertical como ao longo das estações). Foram feitas experiências para revelar alguns processos potencialmente subjacentes aos padrões inicialmente observados.

### **1. Padrões**

A hipótese relativa à variação sazonal da altura do limite superior em relação ao zero hidrográfico foi suportada e, ao contrário do esperado, a altura do limite inferior de distribuição vertical da espécie também sofreu alterações entre estações. Ambas as alturas diminuíram na transição do inverno para o verão, sendo que este decréscimo (diferencial inverno – verão) foi mais acentuado no limite superior do que no limite inferior. Corroborou-se a hipótese de os limites superior e inferior apresentarem uma altura relativa ao zero hidrográfico superior no inverno do que no verão, que se encontra em concordância com o descrito nos dados do campo que a altura baixou consistentemente em todos os pontos marcados (i.e., a última lapa procurada foi encontrada abaixo da etiqueta de cola inicial). Estas informações apontam para a existência de variabilidade na altura de ambos limites verticais ao longo da praia, onde a altura de um determinado ponto na estação de inverno poderá ser igual à altura de um ponto vizinho para a estação de verão. De uma maneira geral, este estudo indica variação dos limites verticais a uma menor escala, ao nível dos transectos de amostragem, e sugere a eventual importância da variação sazonal na altura dos limites de distribuição na adaptação da espécie às condições físicas locais.

Confrontando o perfil de temperatura do nível superior com os padrões biológicos observados, estabelece-se que poderá haver uma relação entre a temperatura registada neste nível e a mudança da altura do limite superior entre as estações. As marcas do limite superior para o inverno foram colocadas em Março e, apesar de não haver registos entre Janeiro e Março – os meses que antecederam a marcação –, verificou-se pelos restantes dados que a temperatura diminuiu a partir de Outubro e aumenta a partir da segunda quinzena de Abril indicando assim que os meses que antecederam as marcas de inverno foram provavelmente mais frios. As lapas que se encontrem numa altura mais alta durante esta época estão rodeadas

por um ambiente mais húmido em geral (devido, a por exemplo, tempestades). As marcas de verão, no limite superior, foram coladas na rocha no final do mês de Julho, sendo que nos meses que precederam a marcação as lapas estiveram sujeitas a temperaturas elevadas (acima dos 40°C inclusive) – refletindo-se no decréscimo da altura, que indicará uma possível tentativa de ficarem submersas durante mais tempo e escapar ao clima seco, para evitar níveis de stress e facilitar o acesso aos recursos (Chelazzi et al., 1988). O mesmo padrão fora previamente descoberto por Frank (1965) para a lapa *Acmaea digitalis*. Em Branch (1981) são fornecidos vários exemplos de estudos onde também se registou este movimento em consonância com as estações. Em relação ao limite inferior de distribuição vertical desta espécie, os exemplares, ainda que se encontrem próximos do mar, poderão ressentir-se com as condições (ambientais) adversas do verão e movimentar-se na direção do mar, resultando também na diminuição da altura deste limite.

Os valores médios de abundância nos níveis médio e superior, resultantes das contagens de indivíduos em quadrados em 50x50cm, corroboram as observações anteriores em campo revelando que existe de fato uma menor densidade de lapas no nível superior, mas apenas para as lapas com dimensão superior a dois centímetros. Exemplares com CMC (comprimento máximo da concha) inferior a dois centímetros apresentaram valores similares em ambos os níveis.

Estes dados também indicaram a existência de lapas juvenis (i.e., com dimensão inferior a 1cm) [separação de juvenis e adultos segundo Castro (2004)] no nível superior. Em termos de lapas adultas no nível superior, o gradiente verificado entre as três classes dimensionais restantes mostrou a tendência para o número de lapas diminuir consoante o aumento do seu CMC, sendo que já não se encontraram lapas com CMC superior a três centímetros nas réplicas efetuadas neste nível. Esta estrutura dimensional sugere que as lapas da espécie *P. depressa* habitam este nível desde as primeiras etapas de vida, mas que não se mantêm ou não sobrevivem neste nível durante a fase adulta. No nível médio, estas lapas permanecem possivelmente no mesmo local ao longo de toda a sua vida, sendo possível encontrar espécimes das quatro classes dimensionais.

Os padrões de movimento de lapas desta espécie mostraram-se variáveis entre níveis e, de uma maneira geral, observou-se uma maior ocorrência de lapas no substrato emerso no nível médio e uma maior ocorrência de lapas em locais de refúgio no nível superior. A

categoria de movimento onde as lapas de cada nível apresentaram respostas mais distintas foi a das deslocações.

Na categoria paradas, para o nível médio destacou-se o mês de Julho onde as lapas primeiro atingiram a menor percentagem e seguidamente a maior percentagem de toda a amostragem (que ocorreu em maior proporção em locais de refúgio). Este acontecimento indica que possivelmente estas lapas movimentaram-se para locais mais favoráveis, onde assentaram e pararam, para se protegerem das condições climáticas. Liu (1992) destaca que movimentos de lapas durante os meses de verão poderão estar relacionados com a dessecação e elevadas temperaturas. Para o nível superior, a proporção de lapas paradas em locais de refúgio foi aumentando até final de Agosto, o que poderá indicar que estas foram assentando e estabelecendo-se em locais mais favoráveis após a mudança de clima entre Abril e Maio.

O movimento de rotação entre as lapas do nível médio ocorreu pontualmente e maioritariamente no substrato emerso, enquanto no nível superior as lapas apresentaram este movimento recorrentemente e quase sempre em locais de refúgio (surgiu em todas as datas de amostragem). Movimentos de rotação poderão estar associados com o ajuste de posição da lapa para evitar perdas de água, estando em concordância com as reações opostas verificadas entre níveis (e.g., no nível superior registaram-se temperaturas mais elevadas, sendo necessário alinhar a posição mais vezes). Uma outra possível explicação para este movimento ocorrer no nível superior em locais de refúgio poderá ser porque as lapas neste nível estão em constante deslocação e transição de habitat, e necessitam adaptar a sua fisionomia à rocha para onde se deslocaram recentemente (formação da sua cicatriz de fixação).

Como mencionado anteriormente, as deslocações das lapas mostraram-se distintas entre níveis, tanto em distâncias percorridas como na transição de habitat. No nível superior o grupo de lapas percorreu uma distância total bastante superior à do grupo de lapas no nível do médio. Focando na distância percorrida, as lapas no nível médio percorreram um valor semelhante e constante entre meses, enquanto no nível superior esta sofreu variações mensais (as lapas deslocaram-se durante a maioria dos meses de amostragem [de Maio a Julho]; estagnando os seus percursos em Agosto – neste mês poucas lapas se deslocaram semanalmente e sempre a curtas distâncias, a maioria das lapas encontrava-se parada e em locais de refúgio). Em termos de transição de habitat associada a estas deslocações, no nível médio a transição de habitat mais comum foi dentro do substrato emerso e em alguns casos as lapas dirigiram-se dos locais de refúgio para novamente o emerso. No nível superior, inicialmente ocorreu transição do emerso para locais de refúgio e a partir daí as deslocações foram maioritariamente entre locais de refúgio; em Outubro as lapas em deslocação

assinalaram passagem de locais de refúgio para substrato emerso pela primeira vez nesta experiência. Estes registos indicam que possivelmente as lapas no nível médio encontram-se localizadas num habitat favorável, percorrendo pequenas distâncias (talvez associadas às suas atividades rotineiras); e que no nível superior as lapas deslocar-se-ão nos meses de transição de estações à procura de locais mais favoráveis para habitar (Abril/Maio – mudança de primavera para verão; Setembro/Outubro – verão para outono), sendo que na mudança para o verão estarão à procura de locais de refúgio para se abrigarem das condições adversas e exposição intensa à radiação solar e após os meses de calor estas retornam ao substrato emerso. As deslocções entre locais de refúgio possivelmente indicam que as lapas exploram variados microhabitats até encontrarem o abrigo ideal.

É de salientar que em ambos os níveis, na primeira data de amostragem [08 a 22 de Maio] ocorreu o maior número de lapas em deslocação (maioria transitou do emerso para locais de refúgio) indicando que estes 15 dias diferiram em algum aspecto com o restante tempo de amostragem, como provavelmente a alteração do clima / mudança da estação.

Conferindo as séries temporais de temperatura nos níveis médio e superior com os padrões de movimento observados é possível verificar que houve um aumento de temperatura de Abril para Maio, coincidindo com a altura onde diversas lapas marcadas desapareceram do raio de pesquisa – possivelmente por se deslocarem a grandes distâncias ou por não terem suportado o aumento rápido de temperatura (no mês Abril a temperatura máxima diária nunca ultrapassou os 35°C, enquanto em Maio chegou a estar acima dos 40°C). Também a variabilidade da temperatura máxima entre os meses de Maio e Setembro poderá explicar o porquê de as lapas se deslocarem durante todos os meses de amostragem e não só nos meses de verão. Desde Maio que a temperatura oscilou grandemente, chegando a ocorrer mais do que uma vez num curto espaço de tempo (uma semana inclusive, que foi a escala de monitorização utilizada nesta experiência) subidas ou descidas da temperatura máxima na ordem das dezenas (como os exemplos dados nos resultados, onde ocorreu subida de 19°C num espaço de 8 dias). A constante variação de temperatura a que as lapas estão expostas poderá requerer que elas estejam em constante aclimação e, por conseguinte, em deslocação para zonas mais favoráveis. Como observado em Nobre (2012), a água do mar poderá não atingir o limite superior de distribuição desta espécie durante vários dias consecutivos, ficando este descoberto, o que poderá ser a causa para as temperaturas neste nível serem sistematicamente superiores em relação ao nível médio (e.g., no gráfico da temperatura média, no mesmo dia reparou-se numa diferença superior a 5°C entre níveis). A temperatura máxima no nível superior ser constantemente mais elevada que a do nível médio também

poderá ser uma explicação para as lapas neste nível recorrerem com maior frequência a locais de refúgio, mesmo em meses de primavera (Jones & Boulding, 1999).

## 2. Processos

Dentro das áreas experimentais, as análises de abundância nas réplicas revelaram diferenças significativas entre a densidade de indivíduos no nível médio e no superior, para ambas as classes dimensionais – CMC superior e inferior a dois centímetros, indicando que naturalmente existem menos indivíduos no substrato emerso superior. Foram testadas a sobrevivência, o crescimento e a condição ecofisiológica nos três níveis experimentais e analisada a sua influência sobre a abundância.

No estudo da sobrevivência de lapas da espécie *P. depressa* obtiveram-se resultados concordantes com a hipótese inicialmente formulada, onde as lapas de maiores dimensões sofreram uma menor mortalidade do que as lapas pequenas. A sua percentagem de sobrevivência foi superior em todos os tratamentos, com a exceção do transplante para densidade natural no nível médio (manipulação na qual as duas classes obtiveram percentagens semelhantes), o que poderá indicar uma maior resistência por parte das lapas grandes. Ainda que estas duas experiências tenham ocorrido em janelas temporais ligeiramente diferentes (ocorrendo ao mesmo tempo durante os meses de Julho e Agosto), as lapas grandes foram as únicas que estiveram sujeitas ao maior pico de temperatura máxima que surgiu durante o decorrer das experiências (na semana de 19 de Junho, quando ainda não tinha começado a experiência das pequenas) e as lapas pequenas estiveram sujeitas a condições térmicas mais estáveis (em Setembro, quando a experiência das grandes já tinha terminado, porque se registaram temperaturas mínimas mais altas e temperaturas máximas mais baixas – traduzindo-se numa menor amplitude térmica semanal, não ocorrendo variações de temperatura tão extremas como registado anteriormente), reforçando a ideia de maior resistência por parte das lapas grandes.

Estas experiências suportam que existem diferenças significativas na sobrevivência de lapas desta espécie entre níveis verticais. Para as lapas pequenas, o número médio de semanas de sobrevivência do tratamento no nível superior (uma lapa sozinha por jaula) foi estatisticamente diferente das manipulações com apenas um exemplar no nível médio e igual aos tratamentos aplicados em densidade natural no nível médio. Com base nas representações gráficas, a mortalidade nos níveis médio e superior não aparentou estar relacionada com a variável temperatura (não mostraram uma tendência comum). Comparando as abundâncias

entre as áreas experimentais, poderá compreender-se porquê a reação das lapas: verificou-se que  $0.04\text{m}^2$  (área da jaula) para uma lapa no nível médio seria uma área maior do que habitualmente teria disponível (valor médio entre 2 a 3 lapas) enquanto no nível superior seria uma área pequena (valor médio inferior a uma lapa). Isto indica que no nível superior as lapas têm uma maior área potencial de alimentação ao seu dispor do que a que estiveram sujeitas durante o período experimental, refletindo-se numa mortalidade semelhante às do nível médio em densidade natural. A mortalidade de lapas em densidade natural no nível médio pode estar associada à competição intraespecífica devido a possuírem uma área mais apertada para se alimentar. Boaventura et al., (2003) verificaram que o aumento da densidade e competição explica o padrão de mortalidade para esta mesma espécie na costa central portuguesa. Dunmore & Schiel (2003) também comprovaram que a competição intraespecífica é importante para o crescimento e sobrevivência da espécie *Cellana ornata*, na Nova Zelândia. O tratamento com uma única lapa no nível médio esteve sob melhores condições que as habituais, tendo um espaço maior (só seu) para se alimentar (e daí sobreviver mais que os outros tratamentos). Para as lapas grandes, a sobrevivência foi semelhante entre os tratamentos dos níveis médio e superior; sendo que a única associação aparente foi entre a mortalidade no nível superior e a temperatura máxima registada semanalmente. No nível superior, nas duas datas onde o número de lapas baixou registou-se um aumento da temperatura máxima. Assim sendo, a existência de lapas no nível superior aparenta ser influenciada pela temperatura, enquanto as lapas no nível médio possivelmente serão influenciadas por outros fatores (como espaço e disponibilidade de alimento, sendo que também poderão apresentar uma maior sobrevivência por estarem protegidas da predação (e.g. caranguejos e aves) (Santini et al., 2004)).

Em conformidade com a hipótese colocada, no nível extremo ocorreu a mortalidade mais elevada de todos os níveis. Ao manter as lapas dentro de jaulas excluiu-se o fator predação como explicação para esta espécie não ocorrer acima do seu limite superior de distribuição. Contudo não foi possível analisar a variação da sobrevivência neste nível porque a maioria das lapas, em ambas as classes dimensionais, morreram na totalidade nas primeiras semanas (reação mais acentuada nas lapas pequenas, que apresentam um número médio inferior a uma semana de sobrevivência). Este acontecimento possivelmente indicará que as lapas da espécie *P. depressa* não habitam neste nível devido a não conseguirem suportar as temperaturas aqui sentidas. Os autores Dahlhoff et al. (2001) observaram que, nas praias no estado de Oregon (EUA), temperaturas mais elevadas podem ser devido à rocha encontrar-se mais emersa e que os salpicos das ondas poderão arrefecer a superfície da rocha e os

organismos nela assentes em poucos minutos. Isto poderá explicar as temperaturas registadas no nível extremo, que se encontra a uma altura maior (em relação ao zero hidrográfico) e mais distante do mar que os restantes níveis. A caracterização térmica das áreas experimentais também indicou que a diferença entre as temperaturas máximas dos níveis foi menor na passagem do nível superior para o extremo. Estes dados sugerem que as lapas no nível superior estarão possivelmente no seu limite de tolerância de temperatura porque um aumento menor entre estes dois níveis afetou mais as lapas (que não conseguiram sobreviver no nível extremo) do que uma diferença maior de temperatura na transição entre o nível médio para o superior. Ocorreu um caso particular na experiência com lapas adultas, onde dois exemplares sobreviveram durante mais semanas que as restantes réplicas, resistindo até ao final da experiência. Após observação do mapa de distribuição de jaulas, verificou-se que as suas jaulas encontravam-se próximas de uma zona potencialmente mais favorável para viver. Esta zona integrava uma reentrância que o mar, ao subir durante a maré, cobria primeiro que a plataforma remanescente deste nível (observação direta em campo) e, por conseguinte, estas lapas ficariam mais tempo cobertas por águas (possivelmente diminuindo a temperatura média neste local devido ao efeito da água, como explicado por Dahloff et al. (2001)). Outro fenómeno, recorrente para ambas as classes de lapas, aquando da monitorização semanal, e que também se encontra em concordância com a hipótese de a temperatura ser o fator principal a controlar a existência de lapas no nível extremo: por diversas vezes ainda se encontrou a lapa morta dentro da jaula, com os tecidos musculares totalmente ressequidos. Aspeto possivelmente causado pela desidratação e exsicação do contato do manto da lapa com rocha a elevada temperatura – este choque térmico proporcionaria uma morte rápida. Como já mencionado anteriormente, em Nobre (2012) detetou-se que no limite superior as lapas ficaram sujeitas à exposição ao ar durante vários dias consecutivos, sendo assim de esperar que no nível extremo esta condição seja ainda mais intensa com a agravante de estas experiências terem decorrido no verão – época de maior calor, que poderá explicar a dessecação dos exemplares. Para além deste fato, também se deve ter em conta que nos níveis médio e superior as rochas contêm uma maior percentagem de cobertura de *Chthamalus montagui* ou até mesmo a presença de outros organismos (como a alga *Fucus* sp. no nível superior) que podem manter o ambiente dentro da área da jaula mais húmido (por reterem água) aos organismos vizinhos (neste caso as lapas) proporcionando melhores condições de habitação (Choat, 1977; Jones & Boulding, 1999), enquanto no nível extremo a rocha encontra-se maioritariamente livre. Williams & Morrith (1995) verificaram que lapas mantidas, através de barreiras artificiais, num determinado nível, movem-se dentro da jaula na

tentativa de se deslocarem para uma posição inferior. Estes autores observaram perdas rápidas de água, assim como mortalidade, em zonas expostas de rocha, o que é semelhante ao observado no presente estudo.

O crescimento em lapas pequenas, medido com craveira, apresentou um padrão semelhante ao da sobrevivência, havendo diferenças significativas de crescimento entre os níveis verticais de distribuição. As lapas do nível superior (lapa sozinha por jaula) mostraram um crescimento igual ao das lapas no nível médio em densidade natural e um crescimento diferente em relação às lapas transplantadas no nível médio para jaulas vazias. A explicação pode ser semelhante à explicação dada para a mesma tendência observada na variável da sobrevivência: as lapas que se encontrem isoladas numa área de  $0.04\text{m}^2$  no nível médio tiveram uma maior área potencial de alimentação do que habitualmente teriam num espaço livre visto ser o nível de maior abundância desta espécie (confirmado pelas densidades registadas no estudo da abundância nas áreas experimentais). Esta situação fornece melhores circunstâncias para se alimentarem e crescerem, como sugerido num outro estudo com a espécie *Patella vulgata* na zona intertidal rochosa do Reino Unido, pelos autores Jenkins & Hartnoll (2001). Em contrapartida, os exemplares que partilharam a mesma área com mais lapas tiveram menor quantidade de alimento disponível por lapa, que poderá ter afetado o seu desenvolvimento e crescimento – como sugerido por diversos autores, como Branch (1981), Jenkins & Hartnoll (2001) e Boaventura et al. (2003). As condições a que as lapas do nível superior estiveram sujeitas foram equivalentes às da densidade natural no nível médio porque foram piores às que normalmente estas estão sujeitas, i.e., usualmente teriam uma área mais vasta para procurar alimento (precisavam de ter percorrido um espaço mais longo para obter o alimento necessário para crescerem).

Ambos os métodos utilizados para detetar crescimento nesta espécie (medição com craveira e método da calceína), em indivíduos pequenos, apresentaram vantagens e desvantagens e, embora sendo resultados preliminares, este estudo sugere que cada um deles poderá ser mais adequado para tipos de amostragem diferentes. As medidas recolhidas com os dois procedimentos mostraram correlação entre si, o que indica que ambos conseguem detetar crescimento e refletem a mesma tendência. O método da craveira poderá ser mais apropriado para amostragens com larga dimensão pela simplicidade da sua metodologia, tendo a desvantagem que todos os organismos têm de ser individualmente etiquetados. O método da calceína é útil para amostragens que requerem que várias lapas estejam concentradas no mesmo sítio porque permite marcar em massa e não é necessário marca externa individual. No nosso estudo em particular, a medição com craveira teria sido suficiente para detetar

diferenças no crescimento entre tratamentos (sem necessitar do esforço que implica obter a medida 'AI' através do método da calceína). Contudo, se o objetivo não for apenas detetar o crescimento total da concha, mas sim analisar as relações alométricas (e.g., como um dos resultados obtidos neste trabalho, onde se verificou que o incremento no rebordo anterior da concha foi superior ao do rebordo posterior, associando esta diferença à morfologia típica da concha desta espécie – existência de um apex não central) que não são possíveis de detetar em campo, o método da calceína será o indicado a utilizar. Neste trabalho foi examinada a marca interna da calceína porque não era visível a marca externa (possivelmente devido à degradação do marcador fluorescente pela exposição à radiação solar (Honeyfield et al., 2008; Elle et al., 2010)). Se se conseguir ajustar o tempo de duração da experiência de modo a evitar degradação e a perdurar a marca externa, haverá a possibilidade de se obter uma medição equivalente à obtida através da medição com craveira – o que simplificará também o procedimento da calceína. A marca externa permitirá medir o comprimento total na concha no tempo inicial e no final, já após recolha das lapas, em laboratório. Como mencionado no início deste parágrafo, este foi um estudo preliminar e seria necessário repeti-lo com mais exemplares para possivelmente estabelecer relações mais específicas entre as variáveis medidas na calceína e o CMC (para realizar estimativas de crescimento para as diferentes partes da concha, como conseguido para a espécie *Pollicipes pollicipes* em Jacinto et al. (2015)).

Com base nos estudos efetuados conferiu-se que uma semana não é suficiente para se verificarem diferenças na condição ecofisiológica de lapas grandes, entre níveis verticais, sendo que os exemplares necessitaram mais tempo para assimilar e reagir às características do novo ambiente onde foram inseridas. Ao fim de 17 semanas as lapas não mostraram diferenças significativas no rácio RNA:DNA, mas revelaram outro resultado interessante para o tratamento no nível extremo, também este um indicador ecofisiológico: ocorreu um aumento significativo de  $\mu\text{DNA}/\text{mg}$ , revelando degradação da condição neste grupo. A quantidade de  $\mu\text{DNA}/\text{mg}$  ser maior significa que o stress afetou estas lapas, diminuindo o tamanho das células, o que origina que num miligrama de tecido haja um maior número de células (em comparação com uma lapa sob condições normais, que terá um menor número de células, mas de maior tamanho, por miligrama). Esta relação foi averiguada em estudos relacionados com o estado nutricional em larvas de peixe, como por exemplo Chícharo & Chícharo (2008) e Olivar et al. (2009). É de salientar que apesar de dois tratamentos terem apresentado os valores mais altos de  $\mu\text{DNA}/\text{mg}$  (transplante no nível extremo e controlo no

nível médio, ambos com lapa sozinha), provavelmente apenas o tratamento no nível extremo estará na origem das diferenças significativas porque foi a manipulação onde se obtiveram valores mais diferentes e afastados dos valores das restantes manipulações e também porque neste tratamento ocorreu decréscimo de  $\mu\text{RNA}/\text{mg}$  (enquanto o tratamento no nível médio ainda teve valores de  $\mu\text{RNA}/\text{mg}$  próximos dos restantes tratamentos). O decréscimo de  $\mu\text{RNA}/\text{mg}$  afeta a síntese proteica (Dahlhoff, 2004). Porém há que ter em conta que, devido a poucas lapas terem sobrevivido (por exemplo, apenas houve um indivíduo sobrevivente para o nível extremo), seria interessante repetir o estudo com um maior número de réplicas por tratamento para no final se recolherem mais exemplares para a análise bioquímica.

Em retrospectiva, a hipótese colocada inicialmente foi corroborada na medida em que o nível extremo apresentou a pior condição fisiológica (notório apenas a médio prazo); porém a suposição de que o nível médio apresentaria uma melhor condição que o superior não se verificou mostrando que esta espécie encontra-se bem adaptada aos dois níveis de distribuição. Os dados demonstram que esta espécie sobrevive no nível superior, mantendo a mesma condição fisiológica que as lapas do nível médio e tolerando um ambiente mais ‘agressivo’ (e.g., a diferença entre as temperaturas mínima e máxima foi maior do que a do nível médio).

## **6 CONCLUSÃO**

A diminuição da altura do limite superior de *Patella depressa* detetada no verão poderá ser devido a deslocações das lapas para locais de refúgio, com condições mais favoráveis para viverem durante a estação em que se encontram. Estas deslocações foram demonstradas no estudo dos padrões de movimentos lapas da espécie *P. depressa*, onde se verificou que os indivíduos junto ao limite superior têm a capacidade de percorrer grandes distâncias. Com a mudança de estação, no outono/inverno seguinte, as lapas retornam ao substrato emerso (ainda que não voltem à marca habitada anteriormente) traduzindo-se num novo aumento da altura do limite superior. Esta explicação está em concordância com os padrões de abundância registados (que foram amostrados no verão): quando se utilizaram quadrados de amostragem mais pequenos (área  $0.04\text{m}^2$ ) (em que apenas se contabilizaram lapas que ocorriam no substrato emerso e exposto à radiação solar) verificou-se que no nível superior a abundância é bastante menor do que no nível médio, enquanto que em quadrados com uma área maior

(0.25m<sup>2</sup>) (que para além de substrato emerso também inclui locais de refúgios como frestas), as lapas pequenas ocorrem em densidades semelhantes nos níveis médio e superior. Apesar de o fato de mesmo com quadrados de 0.25m<sup>2</sup> se encontrar uma menor densidade de lapas grandes no nível superior, poderá ser porque estes quadrados apesar de abrangerem variados locais de refúgio não incluem todos (como margens de poça, onde as lapas poderão estar abrigadas e evitar a dessecação) ou porque as lapas grandes poderão estar mais sujeitas à predação. Ainda que a mortalidade de lapas grandes no nível superior possa ser em parte influenciada pela temperatura, a sua sobrevivência foi considerada estatisticamente igual à sobrevivência das lapas no nível médio, assim como a sua condição ecofisiológica – indicando que as estratégias de regulação de temperatura (como o comportamento de *mushrooming*, onde a concha é levantada para libertar calor e arrefecer o manto) serão suficientes para lapas habitarem no nível superior.

As experiências delineadas para o nível extremo forneceram informação adicional, contribuindo para a compreensão de que fatores poderão influenciar o estabelecimento do limite superior da distribuição vertical desta espécie. As temperaturas que aqui se registaram foram superiores às dos restantes níveis, e com o estudo da condição ecofisiológica conferiu-se que neste nível estabelecem-se condições de stress possivelmente letal que não permitem a existência das lapas acima do seu limite superior de distribuição.

Em suma, este trabalho foi focado nos padrões relativos à distribuição vertical da espécie e a sua possível relação com a temperatura ocorrente em campo. No entanto há que ter em conta que outros fatores poderão estar associados a estas relações (e.g., a humidade, para averiguar a relação com o clima seco e possível dessecação). Ainda que tenha sido um estudo bastante localizado, ocorrendo em apenas uma praia, a questão principal (compreender o porquê da distribuição vertical desta espécie e como é definido o seu limite superior) foi explorada testando diversas variáveis como a sobrevivência, o crescimento e a condição ecofisiológica, através de experiências que recorreram a manipulações *in situ*. Esta metodologia experimental, centrada no teste de hipóteses, foi essencial para compreender os processos ecológicos de interesse que ocorrem na zona intertidal estudada.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este trabalho trouxe alguma perspectiva sobre os padrões e processos relacionados com os limites de distribuição vertical da espécie *Patella depressa*. Seria interessante explorar estas variáveis noutras praias e possivelmente também com outras espécies de lapas. Ainda assim, durante a realização destes estudos e exploração dos dados resultantes, surgiram outras questões possíveis de explorar no futuro.

Mantendo o foco nos fatores físicos, é importante compreender o papel de outras variáveis como a humidade e sombra (e.g., utilizar jaulas com variações dos organismos ocupantes destas – como a presença de cracas e algas que possam influenciar a humidade presente na área da jaula; ou construções diferentes de jaulas – colocar uma cobertura na parte de cima da jaula que proporcionasse pontos de sombra dentro da jaula). Também se verificou que os movimentos de lapas são influenciados pelas condições climatéricas, mostrando a relevância de efetuar experiências não só na época de calor, mas também em períodos de frio e chuva. A dessecação foi um dos tópicos mencionados na discussão deste trabalho, sendo necessário averiguar o tempo de emersão a que estas lapas estão sujeitas ao longo do eixo vertical.

Face ao que foi discutido relativamente à aparente importância das deslocações e da transição de habitats por parte das lapas no estabelecimento dos seus padrões de distribuição, seria pertinente averiguar se, na presença de locais de refúgio no nível extremo (criados artificialmente), as lapas sobreviveriam neste nível (suportando as temperaturas aqui registadas). Igualmente interessante seria aplicar a análise dos conteúdos em ácidos nucleicos em lapas seguidas durante estudos de movimentos, para compreender se existem diferenças entre a condição ecofisiológica de exemplares no substrato emerso, expostos à radiação solar, e de indivíduos em locais de refúgio.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Araújo, R., Bárbara, I., Sousa-Pinto, I., Quintino, V., 2005. Spatial variability of intertidal rocky shore assemblages in the northwest coast of Portugal. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 64, 658–670.
- Bjelde, B.E., Todgham, A.E., 2013. Thermal physiology of the fingered limpet *Lottia digitalis* under emersion and immersion. *J. Exp. Biol.* 216, 2858–69.
- Boaventura, D., 2000. Patterns of distribution in intertidal rocky shores: the role of grazing and competition in structuring communities. Tese de Doutorado. Universidade do Algarve, 149pp.
- Boaventura, D., Cancela da Fonseca, L., Hawkins, S.J., 2003. Size matters: Competition within populations of the limpet *Patella depressa*. *J. Anim. Ecol.* 72, 435–446.
- Boaventura, D., Ré, P., Cancela da Fonseca, L., Hawkins, S.J., 2002. Intertidal rocky shore communities of the continental portuguese coast: Analysis of distribution patterns. *Mar. Ecol.* 23, 69–90.
- Branch, G.M., 1981. The biology of limpets: physical factors, energy flow, and ecological interactions. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 19, 235–380.
- Branch, G.M., 1985. Limpets: their role in littoral and sublittoral community dynamics. In: Moore, P.G., Seeds, R. (eds), *The Ecology of Rocky Coast*. Hodder and Stoughton Educational, London, pp. 97–116.
- Buckley, L.J., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80, 291–298.
- Buckley, L.J., Caldarone, E., Ong, T.L., 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia* 401, 265–277.
- Caldarone, E.M., Wagner, M., St. Onge-burns, J., Buckley, L.J., 2001. Protocol and guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. *Northeast Fish. Sci. Cent. Ref. Doc.* 01-11. Woods Hole, MA, USA. 22pp.
- Castro, J.J., 2004. Predação humana no litoral rochoso alentejano: caracterização, impacto ecológico e conservação. Tese de Doutorado. Universidade de Évora, 348pp.
- Chelazzi, G., Focardi, S., Deneubourg, J.L., 1988. Analysis of movement patterns and orientation mechanisms in intertidal chitons and gastropods. In: Chelazzi, G., Vannini, M. (eds) *Behavioral adaptation to intertidal life*. Plenum Press, New York & London, pp. 173–184.
- Chícharo, L., Chícharo, M.A., 1995. The DNA/RNA ratio as a useful indicator of the nutritional condition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. *Sci. Mar.* 59, 95–101.

- Chícharo, L., Chícharo, M.A., Alves, F., Amaral, A., Pereira, A., Regala, J., 2001. Diel variation of the RNA/DNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Bivalvia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 121–129.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1453–1471.
- Choat, J.H., 1977. The influence of sessile organisms on the population biology of three species of acmaeid limpets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 26, 1–26.
- Cook, A., Bamford, O.S., Freeman, J.D.B., Teideman, D.J., 1969. A study of the homing habit of the limpet. *Anim. Behav.* 17, 330–339.
- Cruz, T., 1999. Settlement patterns of *Chthamalus* spp. at Praia da Oliveirinha (SW Portugal). *Acta Oecologica* 20, 285–287.
- Dahlhoff, E.P., 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 183–207.
- Dahlhoff, E.P., Buckley, B.A., Menge, B.A., 2001. Physiology of the rocky intertidal predator *Nucella ostrina* along an environmental stress gradient. *Ecology* 82, 2816–2829.
- Davies, P.S., 1970. Physiological ecology of *Patella* Iv. Environmental and limpet body temperatures. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 50, 1069–1077.
- Della Santina, P., Santini, G., Chelazzi, G., 1995. Factors affecting variability of foraging excursions in a population of the limpet *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda). *Mar. Biol.* 122, 265–270.
- Della Santina, P., Sonni, C., Sartoni, G., Chelazzi, G., 1993. Food availability and diet composition of three coexisting Mediterranean limpets (*Patella* spp.). *Mar. Biol.* 116, 87–95.
- Denny, M.W. & Gaines, S.D., 2007. *Encyclopedia of tidepools and rocky shores*. University of California Press, 705pp.
- Dunmore, R.A., Schiel, D.R., 2003. Demography, competitive interactions and grazing effects of intertidal limpets in southern New Zealand. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 288, 17–38.
- Elle, F.S., Koenig, M.K., Meyer, K.A., 2010. Evaluation of calcein as a mass mark for rainbow trout raised in outdoor hatchery raceways. *North Am. J. Fish. Manag.* 30, 1408–1412.
- Frank, P.W., 1965. The biodemography of an intertidal snail population. *Ecology* 46, 831–844.
- Guerra, M.T., Gaudencio, M.J., 1986. Aspects of the ecology of *Patella* spp. on the Portuguese coast. *Hydrobiologia* 142, 57–69.

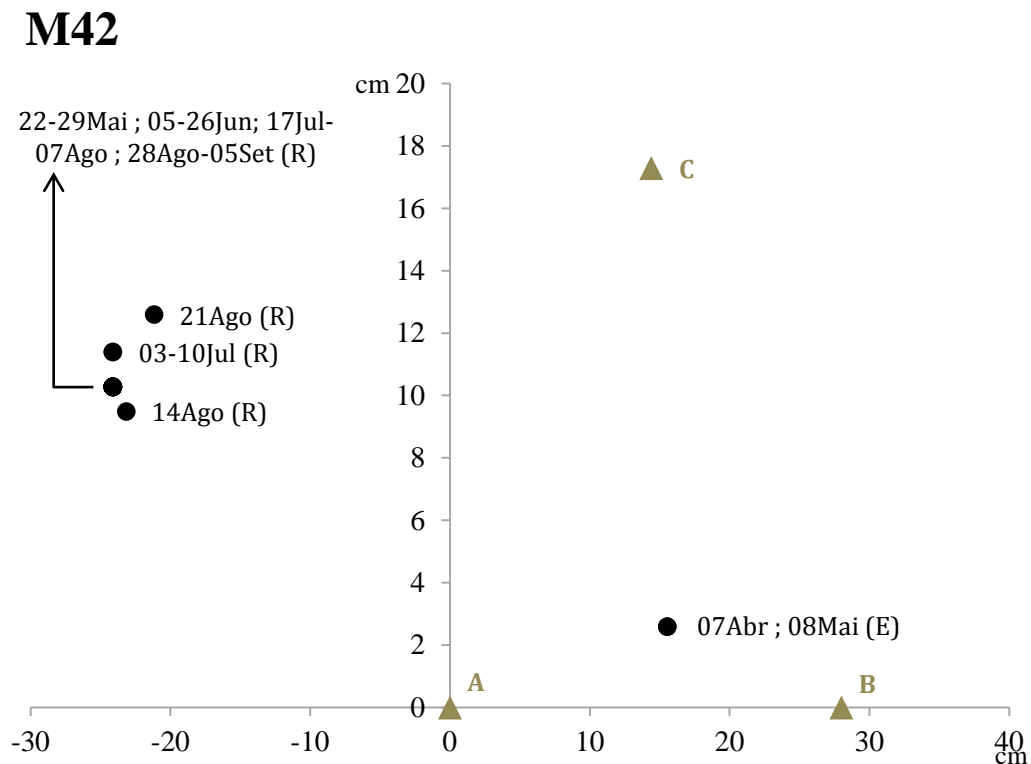
- Harley, C.D.G., Denny, M.W., Mach, K.J., Miller, L.P., 2009. Thermal stress and morphological adaptations in limpets. *Funct. Ecol.* 23, 292–301.
- Hawkins, S.J. & Jones, H.D., 1992. Rocky shores (Marine Conservation Society, Marine Course Field Guide 1) Immel Publishing, 144pp.
- Helmuth, B.S., Hofmann, G.E., 2001. Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. *Biol. Bull.* 201, 374–84.
- Honeyfield, D.C., Kehler, T., Fletcher, J.W., Mohler, J.W., 2008. Effect of artificial sunlight on the retention of external calcein marks on lake trout. *North Am. J. Fish. Manag.* 28, 1243–1248.
- Jacinto, D., Penteadó, N., Pereira, D., Sousa, A., Cruz, T., 2015. Growth rate variation of the stalked barnacle *Pollicipes pollicipes* (Crustacea: Cirripedia) using calcein as a chemical marker. *Sci. Mar.* 79, 117–123.
- Jenkins, S.R., Hartnoll, R.G., 2001. Food supply, grazing activity and growth rate in the limpet *Patella vulgata* L.: A comparison between exposed and sheltered shores. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 258, 123–139.
- Jones, K.M.M., Boulding, E.G., 1999. State-dependent habitat selection by an intertidal snail: The costs of selecting a physically stressful microhabitat. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 242, 149–177.
- Lima, F.P., Wethey, D.S., 2009. Robolimpets: measuring intertidal body temperatures using biomimetic loggers. *Limnol. Ocean. Methods* 7, 347–353.
- Liu, J., 1992. The ecology of Hong Kong limpets. PhD Thesis. University of Hong Kong, 212pp.
- Nobre, D., 2012. Variação espacial dos limites verticais de distribuição, da temperatura média nestes limites e da abundância das espécies *Chthamalus montagui* e *Patella depressa*. Orientadores: M. Alexandra Teodósio, Teresa Cruz, M. Inês Seabra. Projeto de Licenciatura em Biologia Marinha. Universidade do Algarve, 42pp.
- Olivar, M.P., Diaz, M. V., Chícharo, M.A., 2009. Tissue effect on RNA:DNA ratios of marine fish larvae. *Sci. Mar.* 73, 171–182.
- Prusina, I., Sarà, G., De Pirro, M., Dong, Y.W., Han, G.D., Glamuzina, B., Williams, G.A., 2014. Variations in physiological responses to thermal stress in congeneric limpets in the Mediterranean Sea. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 456, 34–40.
- Pulgar, J., Aldana, M., Alvarez, M., Garcia-Huidobro, R., Molina, P., Morales, J.P., Pulgar, V.M., 2012. Upwelling affects food availability, impacting the morphological and molecular conditions of the herbivorous limpet *Fissurella crassa* (Mollusca: Archeogastropoda). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 93, 1–6.

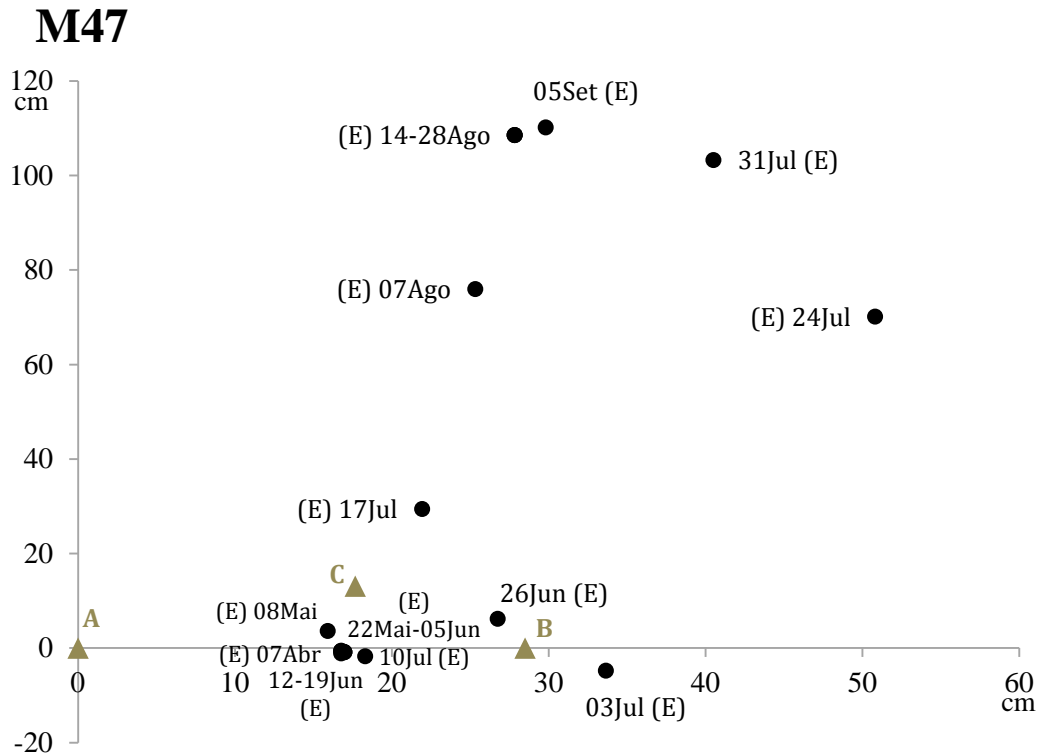
- Santini, G., Thompson, R.C., Tendi, C., Hawkins, S.J., Hartnoll, M.G., Chelazzi, G., 2004. Intra-specific variability in the temporal organisation of foraging activity in the limpet *Patella vulgata*. *Mar. Biol.* 144, 1165–1172.
- Shotwell, J.A., 1950. The vertical zonation of *Acmaea*, the limpet. *Ecology* 31, 647–649.
- Silva, F.N., Ferreira, J.A., Soares, A., Horta, A., Patrão, J., Bingre, P., Costa, M., Inácio, I., Ferreira, M.R., Mateus, A., Abreu, S.P., 2009. Relatório “Revisão do Plano Director Municipal de Sines. Volume III – Caracterização e Diagnóstico”, 155pp.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman, New York, 937 pp.
- Somero, G.N., 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.* 42, 780–789.
- Southward, A.J., Hawkins, S.J., Burrows, M.T., 1995. Seventy years’ observations of changes in distribution and abundance of Zooplankton and intertidal organisms in the western English Channel in relation to rising sea temperature. *J. Therm. Biol.* 20, 127–155.
- Underwood, A.J., Denley, E.J., 1984. Paradigms: explanations, and generalizations in models for the structure of intertidal communities on rocky shores. In: Strong, D., Simberloff, D., Abele, L.G., Thistle, A.B. (eds), *Ecology Communities: Conceptual Issues and Evidence*. Princeton University Press, Princeton New Jersey, pp. 151–180.
- Williams, G.A., De Pirro, M., Cartwright, S., Khangura, K., Ng, W.C., Leung, P.T., Morritt, D., 2011. Come rain or shine: The combined effects of physical stresses on physiological and protein-level responses of an intertidal limpet in the monsoonal tropics. *Funct. Ecol.* 25, 101–110.
- Williams, G.A., Morritt, D., 1995. Habitat partitioning and thermal tolerance in a tropical limpet, *Cellana grata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 124, 89–103.
- Wolcott, T.G., 1973. Physiological ecology and intertidal zonation in limpets (*Acmaea*): a critical look at “limiting factors.” *Biol. Bull.* 145, 389–422.

**ANEXO A.** Representações de percursos efetuados por alguns exemplares da espécie *P. depressa*, na Praia da Oliveirinha, nos níveis médio e superior da sua distribuição vertical. Exemplares seguidos durante o período de 07 de Abril de 2014 a 05 de Setembro de 2014.

---

Observaram-se diferentes comportamentos entre as lapas estudadas nos níveis médio e superior. Dois exemplos do médio encontram-se representados num sistema de coordenadas (Fig. 8.1). No caso da lapa M42, entre Abril e Maio esta manteve-se dentro do espaço inicial onde foi marcada (os triângulos de referência marcados na imagem), transitando para um local de refúgio, à sombra, onde se manteve até ao fim da amostragem. A lapa M47 é detentora do valor máximo (230.2cm) resultante do somatório das distâncias percorridas por cada exemplar, no nível médio. Durante dez semanas esteve perto do triângulo de referência, deslocando-se para longe a partir de meados de Julho.

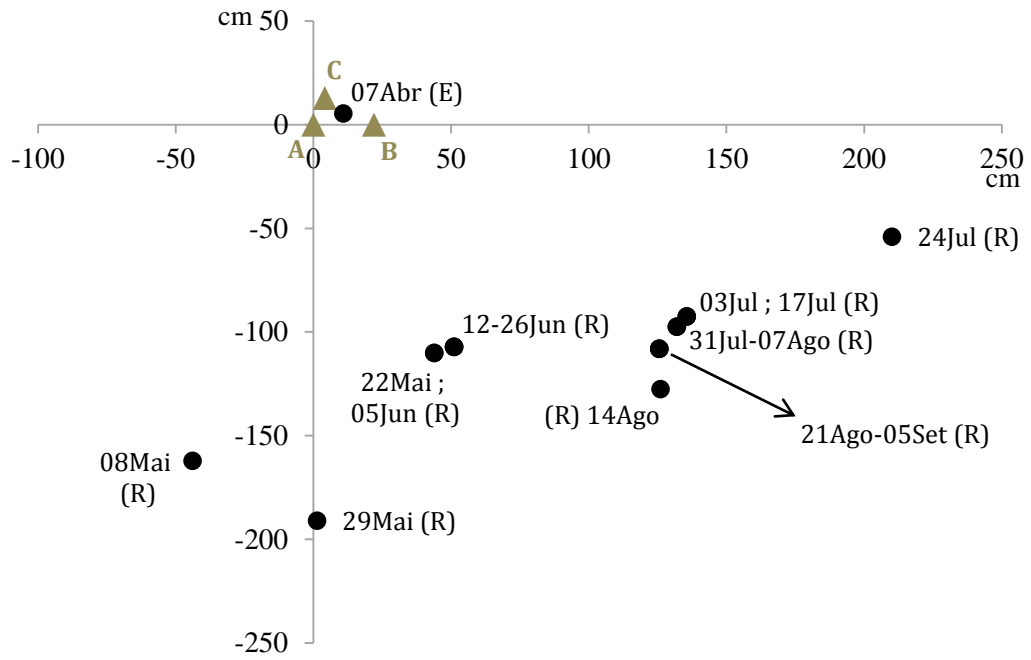




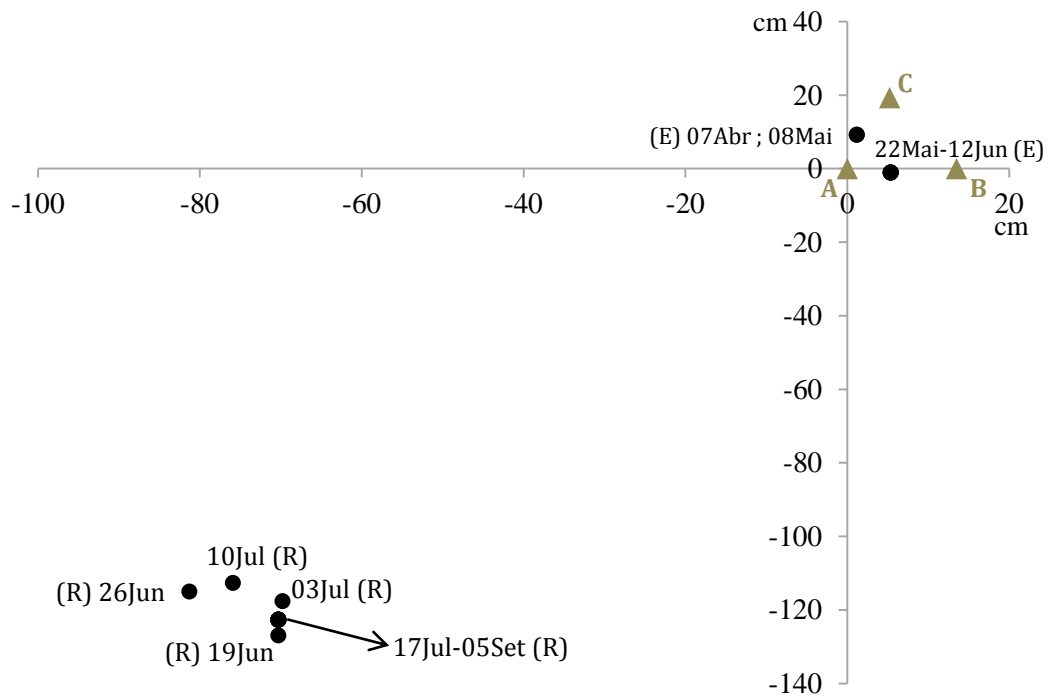
**Figura 8.1** – Deslocações realizadas (em centímetros) por duas lapas da espécie *P. depressa* (códigos individuais: M42 e M47), no nível médio da sua distribuição vertical. Marcadores com formato triangular representam as referências utilizadas para medir a distância percorrida pela lapa; Marcadores com formato circular retratam a localização da lapa na data associada a esse ponto; ao lado de cada data encontra-se o habitat correspondente nesse posicionamento (E – habitat ‘emerso’, R – habitat ‘locais de refúgio’).

As lapas 13, 31 e 49 assinaladas no nível superior encontram-se representadas num sistema de coordenadas na Fig. 8.2. S13 encontrava-se em Abril em habitat emerso, contudo na segunda data de amostragem (08 de Maio) foi descoberta fora das delimitações. Esta lapa é um exemplo de deslocações executadas entre locais de refúgio, tendo trocado um lugar numa margem de poça por outra poça, que apesar de rasa submergia totalmente a lapa. Fez um percurso completo de 778.2cm. A lapa S31 até à primeira quinzena de Junho manteve-se próxima das marcas, mudando-se para uma fresta (lugar protegido e ensombrado) até ao fim da experiência. O padrão de movimento da lapa M49 é semelhante ao da S13, onde apenas na primeira data se manteve dentro das demarcações transitando para diversos locais de refúgio nos restantes meses, no entanto as suas deslocações foram mais concentradas em termos de espaço comparando com as distâncias percorridas por S13. Ainda assim o somatório de todas as suas movimentações fez um total de 391.0cm. O auge deste somatório é do domínio da lapa S30 (não representada), com 1658.9cm (ou 16.6m) – mais do que sete vezes o valor máximo dos somatórios no nível médio.

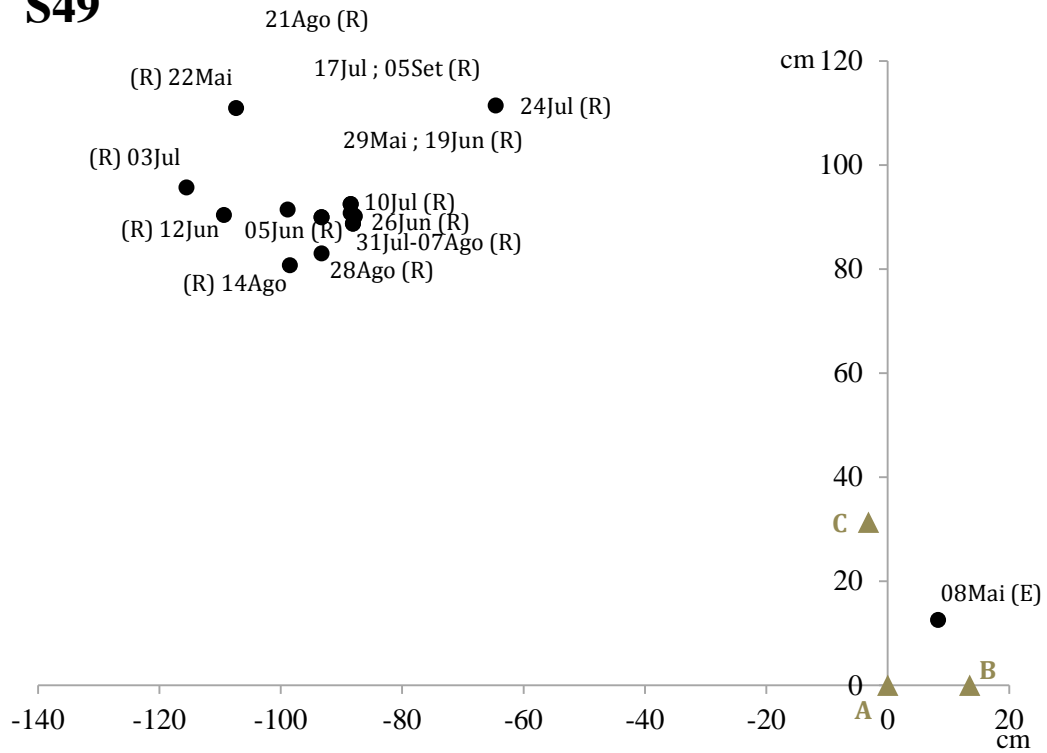
# S13



# S31



# S49



**Figura 8.2** – Deslocações realizadas (em centímetros) por três lapas da espécie *P. depressa* (códigos específicos: S13, S31 e S49), no nível superior da sua distribuição vertical. Marcadores com formato triangular representam as referências utilizadas para medir a distância percorrida pela lapa; Marcadores com formato circular retratam a localização da lapa na data associada a esse ponto, ao lado de cada data encontra-se o habitat correspondente nesse posicionamento (E – habitat ‘emerso’, R – habitat ‘locais de refúgio’).

**ANEXO B.** Representação gráfica da temperatura e mortalidade registada nas experiências manipulativas com a espécie *P. depressa*, a uma escala semanal, na Praia da Oliveirinha, nos três níveis verticais estudados (médio, superior e extremo).

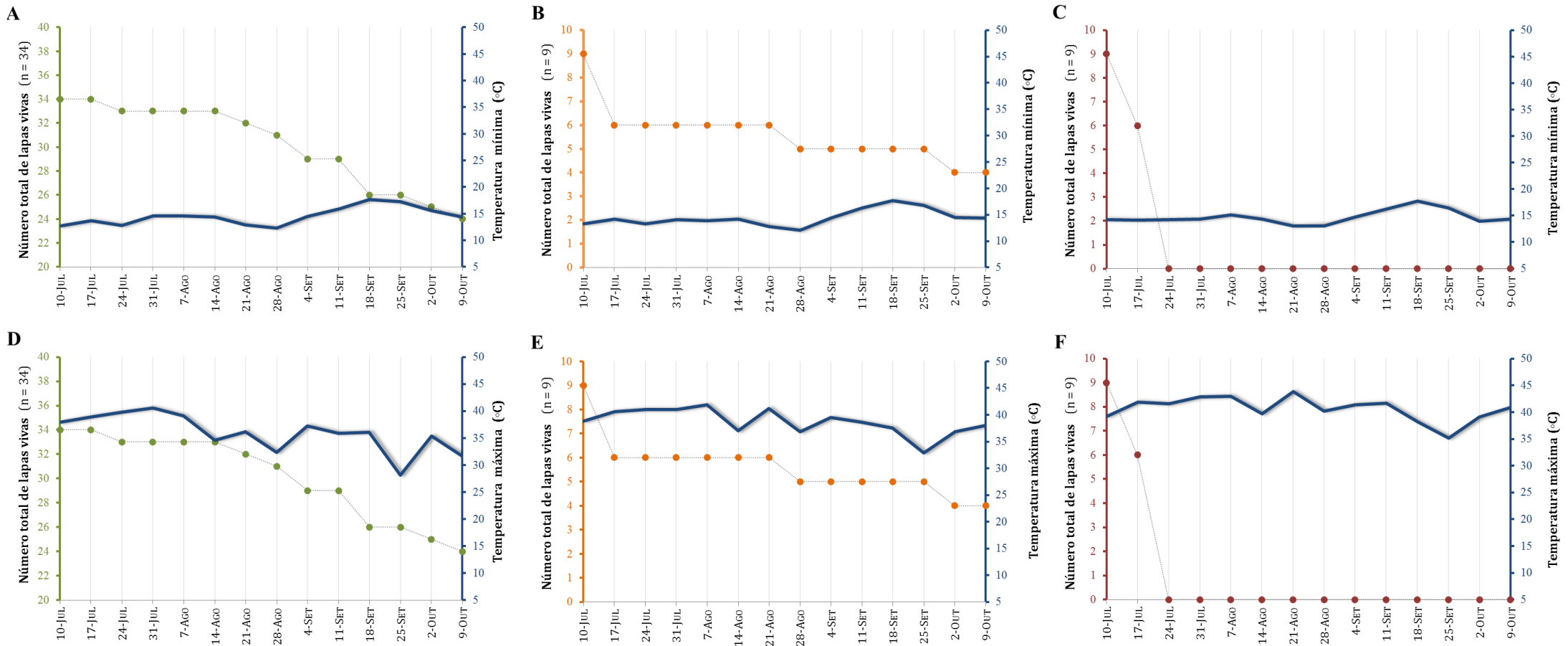
---

As lapas pequenas (com tamanho inferior a 2cm) foram acompanhadas de 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014. Não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos do nível tendo sido por isso agrupados em uma categoria única para facilitar a visualização da mortalidade à escala semanal neste nível (dados não transformados, Levene = 5.630,  $p = 0.001$ ; ANOVA,  $F_{5,28} = 1.264$ ,  $p = 0.307$ ) e manter-se o mesmo formato gráfico entre todos os níveis estudados.

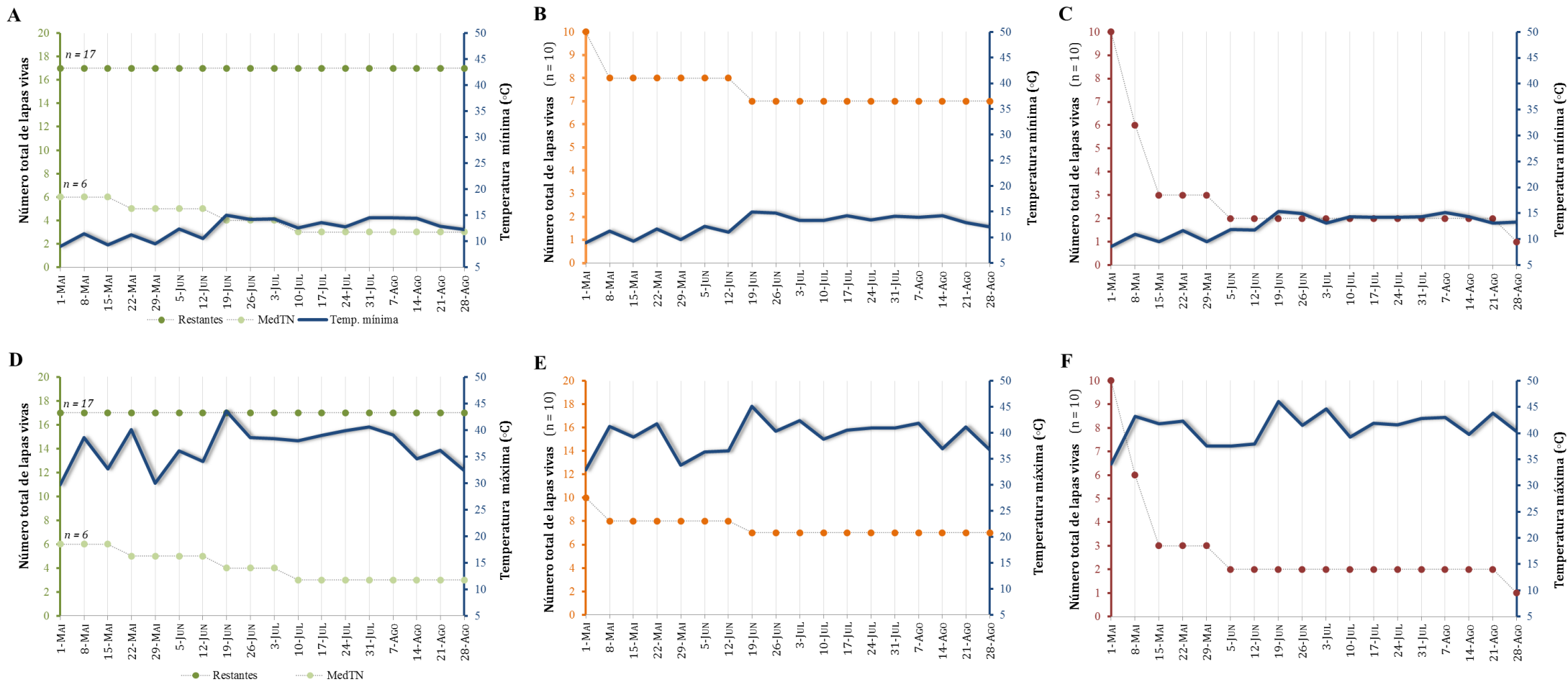
A mortalidade de lapas não aparenta estar associada nem à temperatura mínima ou máxima registada em cada nível (Fig. 8.3).

O estudo relativo às lapas grandes (com tamanho superior a 2cm) decorreu de 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. Através do teste estatístico ANOVA realizado entre as manipulações do nível médio, verificou-se que ‘MedTN’ (transplante para densidade natural, no nível médio) foi significativamente diferente quando comparado com os restantes (dados não transformados, Levene = 36.564,  $p < 0.001$ ; ANOVA,  $F_{3,19} = 4.150$ ,  $p = 0.020$ ), que formam um conjunto igual entre si (controlos, em densidade natural e sozinho, e transplante sozinho, no nível médio – ‘MedCN’, ‘MedC’, ‘MedT’) (testes de SNK,  $p < 0.05$ ). Mantendo-se assim esta distinção nos gráficos do nível médio.

A sobrevivência de indivíduos grandes não aparenta estar associada à temperatura mínima, em qualquer um dos níveis. Porém a temperatura máxima parece estar de alguma forma associada à mortalidade no nível superior (Fig. 8.4) (remeter à secção 4.2.3-b dos Resultados).



**Figura 8.3** – Número total de lapas vivas, da espécie *P. depressa*, com tamanho inferior a 2cm (eixo vertical principal) e temperatura registada, em grau Celsius (eixo vertical secundário) à escala semanal. **Período de estudo:** 10 de Julho a 09 de Outubro de 2014. **Temperatura mínima:** (A) nível médio; (B) nível superior; (C) nível extremo. **Temperatura máxima:** (D) nível médio; (E) nível superior; (F) nível extremo.



**Figura 8.4** – Número total de lapas vivas, da espécie *P. depressa*, com tamanho superior a 2cm (eixo vertical principal) e temperatura registada, em grau Celsius (eixo vertical secundário) à escala semanal. **Período de estudo:** 01 de Maio a 28 de Agosto de 2014. **Temperatura mínima:** (A) nível médio; (B) nível superior; (C) nível extremo. **Temperatura máxima:** (D) nível médio; (E) nível superior; (F) nível extremo. **Tratamentos médio:** MedTN – Transplante para densidade natural, no nível médio; Restantes – Controlos, em densidade natural e sozinho, e transplante sozinho, no nível médio.