



IPMA

Instituto Português
do Mar e da Atmosfera

RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS

SÉRIE DIGITAL

**O LABORATÓRIO DE ESCLEROCRONOLOGIA
E OS ESTUDOS DE IDADE E CRESCIMENTO DE
RECURSOS DA PESCA**

Inês Farias, Eduardo Soares, Ana Moreno, Ana Luísa
Ferreira, Andreia Silva, Bárbara Serra-Pereira, David
Dinis, Delfina Morais, Dina Silva, Eduardo Santos,
Isabel Meneses, Maria João Ferreira, Neide Lagarto,
Patrícia Gonçalves, Ricardo Alpoim, Sandra Dores,
Susana Garrido, Teresa Moura, Manuela Azevedo,
Ivone Figueiredo

2018

22



RELATÓRIOS CIENTÍFICOS E TÉCNICOS DO IPMA – SÉRIE DIGITAL

Destinam-se a promover uma divulgação rápida de resultados de carácter científico e técnico, resultantes da actividade de investigação e do desenvolvimento e inovação tecnológica nas áreas de investigação do mar e da atmosfera. Esta publicação é aberta à comunidade científica e aos utentes, podendo os trabalhos serem escritos em Português, Francês ou Inglês.

Edição

IPMA

Rua C - Aeroporto de Lisboa

1749-007 LISBOA

Portugal

Corpo Editorial

Francisco Ruano – Coordenador

Aida Campos

Irineu Batista

Lourdes Bogalho

Mário Mil-Homens

Rogélia Martins

Teresa Drago

Edição Digital

Anabela Farinha

As instruções aos autores estão disponíveis no sitio web do IPMA

<http://ipma.pt>

ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação

Capa

Conceição Almeida

ISSN

2183-2900

Todos os direitos reservados

O LABORATÓRIO DE ESCLEROCRONOLOGIA E OS ESTUDOS DE IDADE E CRESCIMENTO DE RECURSOS DA PESCA

Inês Farias, Eduardo Soares, Ana Moreno, Ana Luísa Ferreira, Andreia Silva, Bárbara Serra-Pereira, David Dinis, Delfina Morais, Dina Silva, Eduardo Santos, Isabel Meneses, Maria João Ferreira, Neide Lagarto, Patrícia Gonçalves, Ricardo Alpoim, Sandra Dores, Susana Garrido, Teresa Moura, Manuela Azevedo, Ivone Figueiredo

Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P., Divisão de Modelação e Gestão de Recursos da Pesca (DivRP),
Rua Alfredo Magalhães Ramalho, 6, 1495-006 Lisboa, Portugal

Recebido em 2018.05.07

Aceite em 2018.10.17

RESUMO

O presente relatório apresenta os estudos do crescimento de espécies haliêuticas desenvolvidos pelo IPMA, I.P. com ênfase nas espécies atualmente estudadas, quer no âmbito do Programa Nacional de Amostragem Biológica (PNAB), quer no de projetos e linhas de investigação de interesse para a instituição. Tendo como objetivo divulgar a importância dos múltiplos estudos de crescimento em curso e da sua aplicação na melhoria do conhecimento da biologia e da dinâmica das espécies, inclui-se um sumário descritivo das diversas técnicas e metodologias aplicadas no Laboratório de Esclerocronologia.

Palavras-chave: Crescimento, determinação de idades, otólitos, espinhos, ilícios, estatólitos.

ABSTRACT

Title: The Laboratory of Sclerochronology and the age and growth studies of fishing resources

A brief description of the growth studies developed by IPMA, I.P. is given in this report, with emphasis on the halieutic species currently studied both within the scope of the National Programme of Biological Sampling (under the EU/DG Fisheries' Data Collection Framework (DCF)) as of other research projects and research lines of interest for the Institute. With the aim of disseminating the importance of the multiple growth studies and of their application to improve the knowledge on the biology and dynamics of the commercially exploited species, a summary of the techniques and methodologies applied in the Laboratory of Sclerochronology is included.

Keywords: Growth, ageing, otoliths, spines, *illicia*, statoliths

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FARIAS, I.; SOARES, E.; MORENO, A.; FERREIRA, A.L.; SILVA, A.; SERRA-PEREIRA, B.; DINIS, D.; MORAIS, D.; SILVA, D.; SANTOS, E.; MENESES, I.; FERREIRA, M.J.; LAGARTO, N.; GONÇALVES, P.; ALPOIM, R.; DORES, S.; GARRIDO, S.; MOURA, T.; AZEVEDO, M.M.; FIGUEIREDO, I., 2018. O Laboratório de Esclerocronologia e os Estudos de Idade e Crescimento dos Recursos da Pesca. *Relat. Cient. Téc. IPMA*, nº 22 51 pp.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	10
ATRIBUIÇÃO DE GRUPOS DE IDADE E ESTUDOS DE CRESCIMENTO	10
Convenções internacionais adoptadas para a atribuição de idade	12
Outros padrões de deposição	15
Métodos de preparação das estruturas calcificadas	15
1. Protocolos de preparação de otólitos	16
1.1. Sem preparação	16
1.2. Queimados	16
1.3. Secções transversais	16
1.4. Polidos	17
1.5. Microestrutura do otólito	17
1.5.1. Anéis diários	17
1.5.2. Estados larvares	18
1.5.3. Estados juvenis	19
2. Protocolo de preparação de ilícios	20
3. Protocolo de preparação de espinhos caudais de raias	21
4. Protocolo de preparação de espinhos dorsais de tubarões Squaliformes	21
5. Protocolo de preparação de estatólitos	22
Métodos de observação das estruturas calcificadas	23
Validação de idade	23
Validação directa	23
Validação indirecta	23
Avaliação da exactidão e precisão dos grupos de idade atribuídos	24
Exercícios de calibração e intercâmbio de EC	24
ESPÉCIES ESTUDADAS	25
COOPERAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL	25
NOTA FINAL	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ACRÓNIMOS E TERMINOLOGIA

Acrónimos

DivRP – Divisão de Modelação e Gestão de Recursos da Pesca

ICES – *International Council for the Exploration of the Sea*/Conselho Internacional para a Exploração do Mar

IPMA, I.P. – Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.

LE – Laboratório de Esclerocronologia

NAFO – *Northwest Atlantic Fisheries Organization*/Organização das Pescas do Atlântico Noroeste

WGHANSA – *Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy and Sardine*

WKAEH – *Workshop on Age estimation of European hake*

WKAMDEEP – *Workshop on Age Estimation Methods of Deep-water Species*

WKARA – *Workshop on Age estimation of European anchovy (Engraulis encrasicolus)*

WKARAS – *Workshop on Age Reading of European Atlantic Sardine*

WKARBLUE – *Workshop on Age Estimation of Blue Whiting*

WKARHOM – *Workshop on Age reading of Horse Mackerel, Mediterranean Horse Mackerel and Blue Jack Mackerel (Trachurus trachurus, T. mediterraneus and T. picturatus)*

WKSABCAL – *Workshop on Statistical Analysis of Biological Calibration Studies*

Terminologia

A terminologia utilizada no presente relatório está conforme ao glossário do Manual de Esclerocronologia de Peixes (Panfili *et al.*, 2002), com alterações baseadas em Cailliet *et al.* (2006) para uniformização dos termos usados para peixes ósseos e cartilágineos. Para os estudos da microestrutura de otólitos de larvas e de juvenis usou-se a terminologia de Secor *et al.* (1992). Assim:

Anel – Par de bandas concêntricas, uma opaca, outra translúcida, em cuja interpretação se baseia a determinação de idade. O anel pode não ser contínuo nem claramente concêntrico. A sua aparência visual, que depende da própria estrutura calcificada e da espécie, não deve ser definida em termos das características específicas da estrutura.

Banda – Região com estrutura e densidade ótica semelhante. Sinónimo mais correto dos termos “anel”, “marca” e “zona”.

Banda “falsa” – Descontinuidade numa banda ou num microincremento (pode ser induzida por *stress* ambiental, por exemplo). Em termos microestruturais, aparecem regularmente como microincrementos com elevado contraste e com a banda opaca profundamente marcada ou como uma mudança abrupta no padrão de crescimento.

Banda opaca – Banda que limita a passagem da luz comparativamente com a banda translúcida. É um termo relativo porque é definido por comparação com a aparência das bandas adjacentes. Numa estrutura calcificada (EC) não tratada, com luz transmitida, a banda opaca é escura e a translúcida é clara. A banda opaca apresenta-se clara sob luz refletida e escura sob luz transmitida.

Banda translúcida – Banda que permite a passagem de maior quantidade de luz comparativamente com a banda opaca. Apresenta-se clara sob luz transmitida e escura sob luz refletida. É um termo relativo porque é definido por comparação com a aparência das bandas adjacentes (ver definição anterior).

Chaves de comprimento-idade – Tabelas onde normalmente se representam as idades em coluna e os comprimentos em linha, indicando a probabilidade de um espécime ter a idade *i* sabendo que tem o comprimento *j*.

Classe anual – Coorte de peixes provenientes de ovos desovados ou eclodidos num determinado ano (p. ex., a classe anual de 1990). É necessário especificar se se refere à data de desova ou de eclosão, porque espécies de latitudes mais elevadas apresentam um longo período de desenvolvimento pré-eclosão.

Classe diária – Coorte de indivíduos resultantes de ovos desovados ou eclodidos numa determinada data. É necessário especificar se se refere à data de desova ou de eclosão.

Coefficiente de variação (CV) - Índice estatístico para determinar o grau de concordância entre leituras, incorporando o desvio padrão das leituras, cuja equação é:

$$CV = 100\% \times \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^R \frac{(X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{R - 1}}}{\bar{X}_j}$$

onde X_{ij} é a *i*-ésima estimacão do grupo de idade do indivíduo *j*, \bar{X}_j é o grupo de idade média do indivíduo *j* e *R* é o número de vezes que o grupo de idade é atribuído ao espécime (Beamish e Fournier, 1981; Chang, 1982).

Comprimento total (TL, total length) – Distância entre o ponto mais anterior e o ponto mais posterior do corpo de um organismo vivo, representando a medida morfométrica mais comumente usada para descrever o tamanho de um peixe.

Comprimento padrão (SL, standard length) – Distância entre o ponto mais anterior do corpo e o limite posterior do uróstilo.

Coorte – Grupo de peixes com idade semelhante nascidos de ovos desovados durante o mesmo intervalo de tempo.

Centro (“core”) – Zona calcificada que envolve o primórdio e que delimita o primeiro incremento identificado (primeira zona descontínua), correspondendo à data de nascimento, *i.e.*, eclosão do ovo.

Espessura de um incremento – Medida linear de um incremento, composta por uma zona opaca e a zona translúcida adjacente. É medida ao longo de um eixo definido para cada espécie, o qual pode ser linear ou curvilíneo conforme o crescimento da Estrutura Calcificada é linear ou curvo.

Estimação de idade – processo de atribuição de idade a um espécime.

Estrutura calcificada (EC) – Órgãos ou elementos de base calcária, presentes tanto em vertebrados (por exemplo, otólitos e escamas dos peixes) como em invertebrados (por exemplo, estatólitos dos cefalópodes) que se formam por processos de acreção e têm o potencial de crescer ao longo de toda a vida do organismo.

Exatidão – Aproximação de uma estimativa (medida ou determinada matematicamente) ao seu valor real.

Grupo de idade – coorte de peixes de determinada idade (p. ex., grupo de idade 5) que é o número inteiro de anos entre a data adotada por convenção para o nascimento e um momento específico no tempo. Não é sinónimo de classe anual nem de classe diária.

Incremento – Região entre bandas semelhantes numa estrutura usada para estimar a idade. O termo refere-se a uma estrutura, mas pode referir-se também à porção (medida) da estrutura calcificada formada durante um determinado período. Um incremento anual compreende uma banda opaca e a banda translúcida adjacente. O incremento diário é aquele que se forma no intervalo de 24 horas, sendo também, constituído por duas zonas consecutivas, uma opaca e outra translúcida.

Incremento marginal – Zona situada a seguir à última banda de crescimento identificada na margem da estrutura usada para estimar a idade. Geralmente, é expresso quantitativamente em termos relativos, ou seja, como uma fração do último incremento completo anual ou diário.

Marca (“*Check*”) – Descontinuidade ou zona descontínua abrupta num anel ou na estrutura, resultante da ocorrência dum evento ocasional não periódico durante o ciclo de vida do indivíduo.

Notocorda – Cordão cartilaginóseo que se estende desde a cabeça até à cauda e que, na maioria dos peixes, é substituído por vértebras durante o desenvolvimento larvar.

Núcleo – Zona do otólito que antecede o primeiro anel, englobando o primórdio e o centro. Nos estados larvares dos peixes, o núcleo corresponde à fase de alimentação endógena, ou seja, à fase de absorção das reservas vitelinas.

Oxitetraciclina (OTC) – Antibiótico que é usado para marcação química de peixes, uma vez que o fluorocromo é incorporado nos otólitos e espinhos dorsais e visível sob a forma de marcas fluorescentes.

Padrão de crescimento – Um conceito do crescimento relativo de incrementos durante um período de vida da estrutura calcificada (p. ex., anel ou incrementos diários).

Erro percentual médio (APE, average percent error) – Índice estatístico para determinar o grau de concordância entre leituras. A sua equação é:

$$APE = 100\% \times \frac{1}{R} \sum_{i=1}^R \frac{|X_{ij} - \bar{X}_j|}{\bar{X}_j}$$

onde X_{ij} é a i -ésima estimação do grupo de idade do indivíduo j , \bar{X}_j é o grupo de idade médio do indivíduo j e R é o número de vezes que o grupo de idade é atribuído ao espécime (Beamish e Fournier, 1981).

Precisão – Aproximação entre os valores das repetições de uma medição. Para uma técnica de medição não estar sujeita a enviesamento, a precisão implica exatidão, mas os termos não são equivalentes.

Pós-rostro – Projecção mais posterior do otólito *sagitta*. Pode também referir-se a toda a margem posterior do otólito *sagitta* ou dorsal do estatólito.

Primórdio – Zona onde se inicia o crescimento do otólito. Usualmente localizados no centro, os primórdios podem fundir-se ou manter-se separados. Em algumas espécies formam-se primórdios acessórios (e.g. pescada, pleuronectídeos).

Rostró – Projecção mais anterior do otólito *sagitta* ou projecção ventral do estatólito.

Sulco – Zona mediana do otólito com forma côncava.

Uróstilo – Complexo ósseo da coluna vertebral que resulta da fusão das vértebras mais posteriores.

Validação – Processo de estimação da exatidão de um método de estimação de idade. Se o método envolve a contagem de bandas, então parte do processo de validação envolve a confirmação da significância temporal das bandas contadas.

Verificação – Processo para estabelecer que algo é verdadeiro. Estimativas de idades individuais podem ser verificadas se se aplicar um método validado de estimação de idade, o que implica testar uma hipótese que pode ser determinada em termos absolutos como verdadeira ou falsa.

Zona descontínua – Zona de incrementos de crescimento constituída principalmente por matriz orgânica resultando em sulcos bem visíveis quando observados com grande ampliação (*e.g.* microscópio eletrônico).

INTRODUÇÃO

O Laboratório de Esclerocronologia (LE) do Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P. (IPMA, I.P.), designado no passado por Laboratório de Crescimento, desenvolve atividades no âmbito das competências da Divisão de Modelação e Gestão de Recursos da Pesca (DivRP) e da missão do IPMA, I.P.

No LE, realizam-se, de forma continuada ou pontual, estudos de análise de estruturas calcificadas, cujos resultados contribuem para a melhoria do conhecimento da biologia e da estrutura populacional das espécies pescadas pela frota comercial. Os resultados obtidos constituem dados de entrada para os modelos utilizados na avaliação do estado de exploração de recursos comerciais e, deste modo, contribuem para o aconselhamento à sua gestão, compatível com o uso sustentável do oceano.

As principais linhas de atividade desenvolvidas no LE são:

- a) Desenvolvimento e aplicação de técnicas de preparação de estruturas calcificadas (EC), com vista a:
 - a. Atribuição de idade;
 - b. Análise de composição microquímica;
- b) Desenvolvimento e aplicação de metodologias de observação e análise de EC.

A atribuição de idade é aplicada na estimação de parâmetros de crescimento e tem as seguintes atividades inerentes:

- i. Validação direta e indireta;
- ii. Estimação de precisão e de exatidão (*e.g.*, exercícios de calibração e intercâmbio de EC).

Estas atividades encontram-se inseridas no âmbito de diversos projetos de investigação sobre a biologia de espécies haliêuticas em curso no IPMA, I.P., envolvendo a colaboração com outras instituições de investigação congéneres, quer nacionais quer internacionais.

ATRIBUIÇÃO DE GRUPOS DE IDADE E ESTUDOS DE CRESCIMENTO

A atribuição de grupos de idade a exemplares de espécies animais aquáticas tem sido tradicionalmente efetuada com recurso a estruturas calcificadas (EC), como otólitos, vértebras, ilícios, espinhos ou estatólitos (Figura 1).

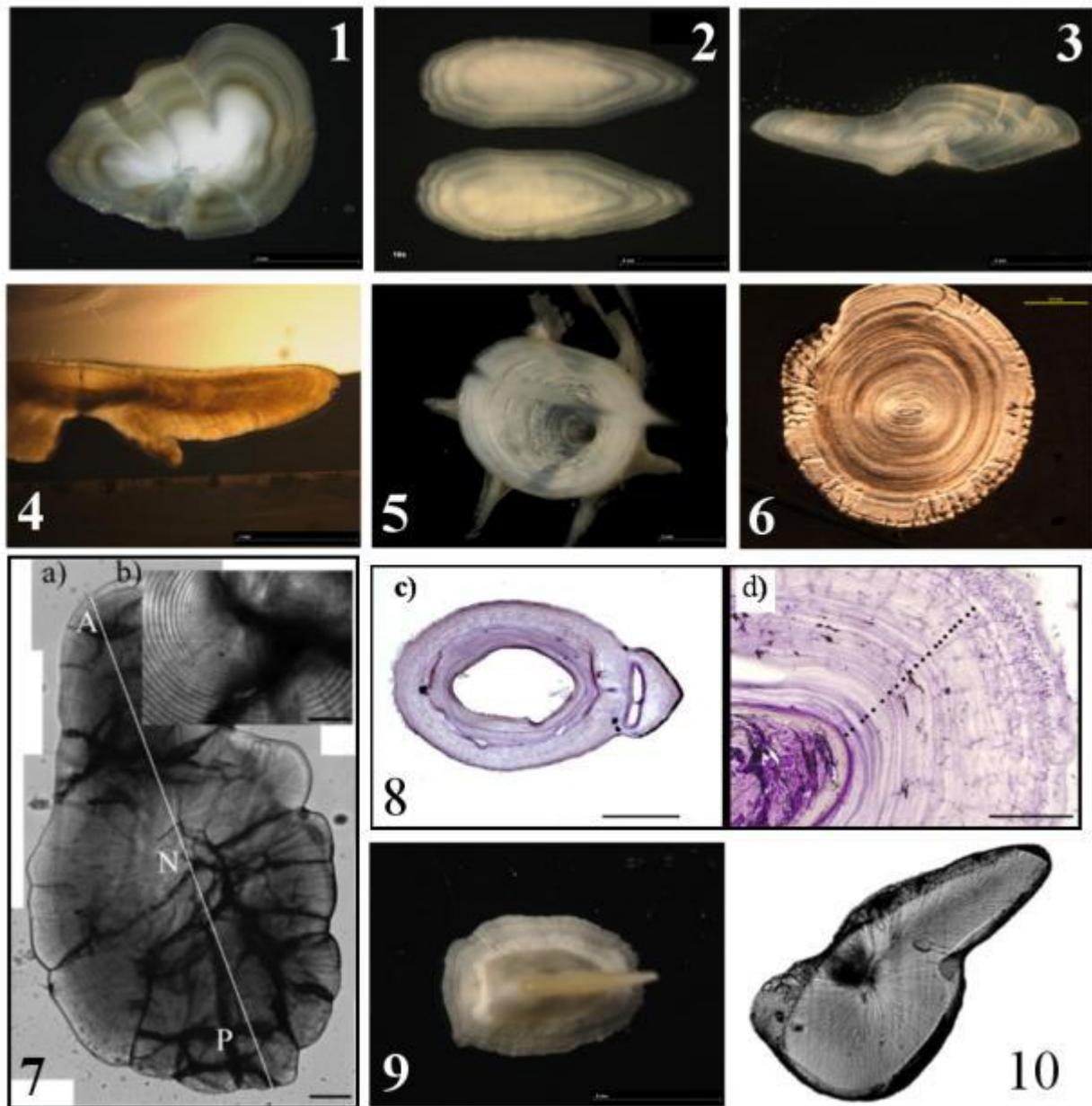


Figura 1 – Tipos de estruturas calcificadas analisadas no Laboratório de Esclerocronologia. (1) Corte transversal de otólito *sagitta* queimado de *Trisopterus luscus* (faneca), escala = 2 mm; (2) Par de otólitos *sagitta* inteiros de *Micromesistius poutassou* (verdinho), escala = 5 mm; (3) Corte transversal de otólito *sagitta* de *Merluccius merluccius* (pescada), escala = 2 mm; (4) Pormenor de corte transversal de otólito *sagitta* de *Aphanopus carbo* (peixe-espada preto), escala = 1 mm; (5) Vértebra de *A. carbo*, escala = 2 mm; (6) Corte transversal de ilício de *Lophius piscatorius* (tamboril), escala = 0.5 mm; (7) Otólito *sagitta* inteiro de juvenil de *Sardina pilchardus* (sardinha): a) Mosaico composto por 26 fotografias parciais do otólito, escala = 100 μ m; A, rostro; P, pós-rostro; N, núcleo; linha representa o diâmetro do otólito; b) Detalhe do núcleo do otólito, escala = 50 μ m, adaptado de Silva *et al.* (2015); (8) Secção transversal de um espinho de *Centroscygnus coelolepis* (carocho): c) vista geral, escala = 500 μ m; d) vista detalhada, escala = 200 μ m; adaptado de Moura (2011); (9) Espinho dorsal de *Raja clavata* (raia-lenga), escala = 5 mm; (10) Estatólito de *Loligo vulgaris* (lula). Iluminação: imagens 4, 6-8 e 10 com luz transmitida; imagens 1-3, 5 e 9 com luz refletida.

Figure 1 – Types of calcified structures analysed at the Laboratory of Sclerochronology. (1) Transverse section of burnt *sagitta* otolith of *Trisopterus luscus* (pouting), scale bar = 2 mm; (2) Whole *sagitta* otoliths pair *Micromesistius poutassou* (blue whiting), scale bar = 5 mm; (3) Transverse section of *sagitta* otolith of *Merluccius merluccius* (hake), scale bar = 2 mm; (4) Detail of transverse section of *sagitta* otolith of *Aphanopus carbo* (black scabbardfish), scale bar = 1 mm; (5) Vertebrae of *A. carbo*, scale bar = 2 mm; (6) Transverse

section of *illicium* of *Lophius piscatorius* (angler), scale bar = 0.5 mm; (7) Whole *sagitta* otolith of juvenile *Sardina pilchardus* (sardine): a) Mosaic composed of 26 partial photographs of the otolith, scale bar = 100 μ m; A, rostrum; P, post-rostrum; N, nucleus; line represents the otolith's diameter; b) Detail of otolith's nucleus, scale bar = 50 μ m, adapted from Silva *et al.* (2015); (8) Transverse section of dorsal spine of *Centroscymnus coelolepis* (Portuguese dogfish): c) general view, scale bar = 500 μ m; d) detail, scale bar = 200 μ m; adapted from Moura (2011); (9) Dorsal spine of *Raja clavata* (thornback skate), scale bar = 5 mm; (10) Statolith of *Loligo vulgaris* (common squid). Illumination: images 4, 6-8, and 10 with transmitted light; images 1-3, 5, and 9 with reflected light.

A utilização destas estruturas para atribuição de idade advém do facto de elas apresentarem a deposição de material mineral e orgânico de uma forma periódica ao longo de, potencialmente, toda a vida do organismo, ou seja, apresentarem um padrão de crescimento (Morales-Nin e Panfili, 2002a). Na sequência desta deposição, verifica-se a existência de camadas denominadas como bandas de crescimento (Figura 1).

No caso dos teleósteos (vulgarmente conhecidos como “peixes ósseos”), os otólitos são as estruturas mais usualmente analisadas para atribuição de idade (Figura 1-1 a 1-4, 1-7). Estes localizam-se no ouvido interno dos peixes e formam-se por acreção de camadas concêntricas de carbonato de cálcio (na forma de aragonite) cristalizado numa matriz de otolina (uma proteína do tipo das queratinas) (Degens *et al.*, 1969; Wright *et al.*, 2002). No caso particular do tamboril, como alternativa aos otólitos, usam-se os ilícios, que correspondem ao primeiro raio da barbatana dorsal modificado e que funcionam como isco para as suas presas (Figura 1-6). Nalgumas espécies, é também possível fazer a atribuição de idade com base na deposição de bandas nas vértebras (Figura 1-5). No caso dos peixes cartilagíneos (raias e tubarões), as estruturas preferenciais para a atribuição de idades são os espinhos dorsais (Squaliformes) (Figura 1-8), os espinhos caudais (Rajidae) (Figura 1-9) e as vértebras. Os estudos de crescimento de cefalópodes são realizados com base na análise de estatólitos, partículas cristalinas de carbonato de cálcio e proteína localizados no ouvido interno (Figura 1-10).

Convenções internacionais adotadas para a atribuição de idade

Por convenção internacional, assume-se o primeiro dia de janeiro como data de nascimento de uma espécie do Atlântico Norte (Williams e Bedford, 1974). A adoção de uma data de nascimento para todos os indivíduos nascidos num determinado ano permite o seu agrupamento em classes. Essas classes são anuais se a unidade de tempo utilizada na avaliação for o ano. De notar que se adota o dia 1 de janeiro porque o período de reprodução ocorre no final do ano (último trimestre) para a maioria das espécies do Atlântico Norte. Assim, se a unidade de tempo for o ano, considera-se que a 1 de janeiro de cada ano, os indivíduos de uma coorte transitam para a classe anual e para o grupo de idade seguintes.

Recentemente, foi introduzido um ajuste ao critério da data de nascimento na análise de idades de sardinha. Na campanha PELAGO de 2015, realizada pelo IPMA, I.P., verificou-se que a maioria dos espécimes capturados no Golfo de Cádiz eram demasiado pequenos para serem incluídos no grupo de idade 1, verificando-se um hiato na distribuição de comprimentos (Moreno *et al.*, 2016). Analisando a estrutura dos seus otólitos, verificou-se que indivíduos com comprimento total inferior a 9 cm não apresentavam banda translúcida e só seriam incluídos na idade 1 na campanha da primavera de 2017. Assim, o WGHANSA decidiu que as sardinhas capturadas no primeiro semestre com comprimento total inferior a 10 cm deverão ser incluídas no grupo de idade 0 (ICES, 2016a).

Em geral, chama-se “incremento” à deposição de duas bandas distintas consecutivas, uma banda translúcida, que apresenta maior proporção de carbonato de cálcio (aragonite) e menor proporção de matriz orgânica (otolina), e uma banda opaca, à qual corresponde menor proporção de aragonite e maior proporção de otolina (Wright *et al.*, 2002b). Em espécies nas quais se verifica a deposição de duas bandas distintas por ano, o incremento diz-se anual, atribuindo-se a idade por contagem do número de bandas translúcidas (crescimento de inverno) e tendo em conta a natureza do bordo (translúcido ou opaco) e a data de captura (Chilton e Beamish, 1982). No otólito, a banda opaca aparece escura com luz transmitida e branca sob luz refletida, enquanto que a banda translúcida aparece clara com luz transmitida e escura sob luz refletida (Figura 2).

Para atribuir uma classe ou grupo de idade a um espécime a partir da sua EC, conta-se o número de incrementos anuais do centro para o bordo da EC (Figura 2). Apenas são consideradas as bandas que podem ser seguidas em torno de toda a estrutura (ou secção). O grupo de idade ou classe de idade no qual um indivíduo é incluído depende do ano em que foi efetuada a sua desova e da data da sua captura, contando-se o número de anos do calendário desde a data de nascimento (Morales-Nin e Panfili, 2002a). Assim, se o indivíduo for capturado no segundo semestre e o bordo for opaco ou se for capturado no primeiro semestre e o bordo for translúcido, o grupo de idade corresponde ao número de bandas translúcidas; se for capturado no primeiro semestre e o bordo for opaco, considera-se que o indivíduo pertence ao grupo de idade seguinte (número de bandas translúcidas mais um); se for capturado no segundo semestre e o bordo for translúcido, a banda do bordo não é contabilizada na atribuição do grupo de idade (número de bandas translúcidas menos um) (C.A.R.E., 2006).

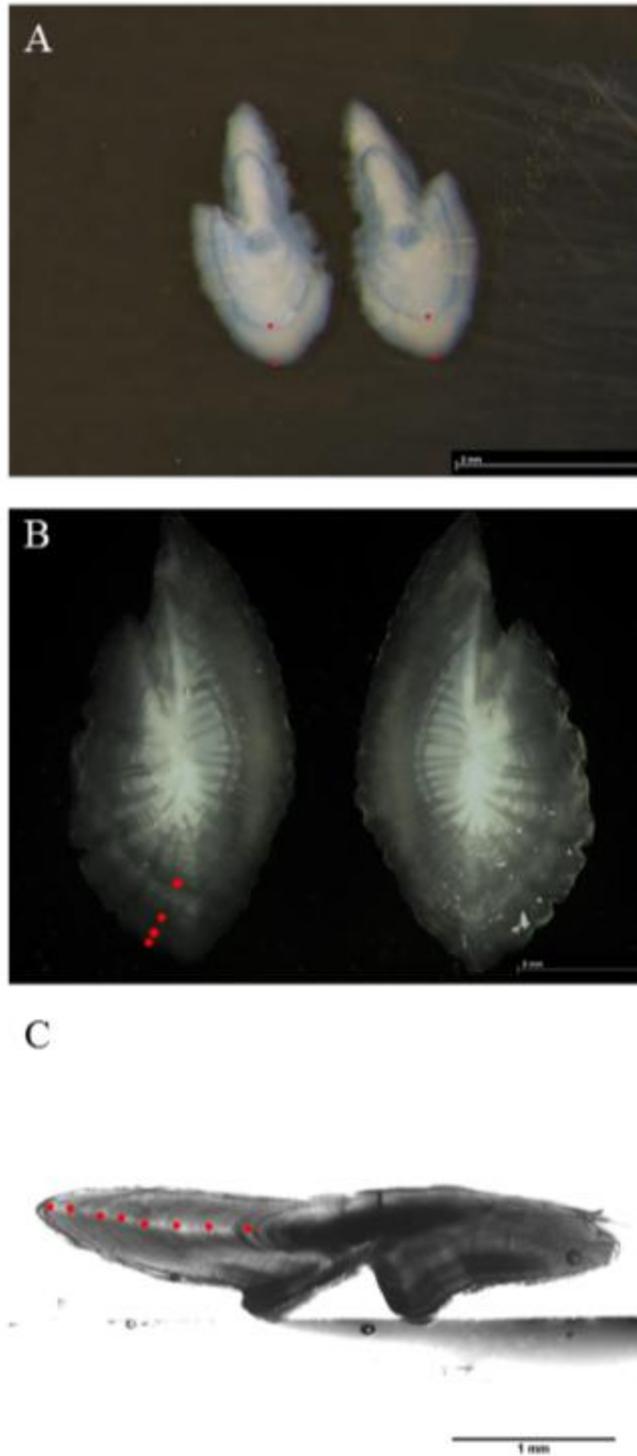


Figura 2 – Exemplos de otólitos com marcação das bandas de crescimento. **(A)** Otólitos *sagittae* inteiros de *Sardina pilchardus* (sardinha; NW França; Março de 2000; 19,4 cm; grupo de idade 2); **(B)** Otólitos *sagittae* inteiros de *Trachurus trachurus* (carapau; S Portugal; Abril de 2015; 21,5 cm; grupo de idade 4); **(C)** Otólito *sagitta* esquerdo seccionado de *Aphanopus carbo* (peixe-espada preto; Madeira, Portugal; Novembro de 2010; 109,7 cm; grupo de idade 8). Iluminação: imagens A e B com luz refletida; imagem C com luz transmitida.

Figure 2 – Examples of otoliths with marked growth bands. **(A)** Whole *sagittae* otoliths of *Sardina pilchardus* (sardine; NW France; March 2000; 19.4 cm; age group 2); **(B)** Whole *sagittae* otoliths of *Trachurus trachurus* (Atlantic horse mackerel; S Portugal; April 2015; 21,5 cm; age group 4); **(C)** Left sectioned *sagitta* otolith of

Aphanopus carbo (black scabbardfish; Madeira, Portugal; November 2010; 109,7 cm; age group 8). Illumination: images A and B with reflected light; image C with transmitted light.

Outros padrões de deposição

Em alguns teleósteos, é possível discriminar estruturas de deposição que correspondem a uma periodicidade de crescimento inferior a um ano. Nos casos em que se assume uma periodicidade inferior a 24 horas, a atribuição de idade pode ser feita em dias, baseando-se na contagem do número de incrementos diários (Pannella, 1971; Campana, 1992; Geffen, 1992; Morales-Nin *et al.*, 2005). Cada incremento diário é constituído por uma zona opaca e uma zona translúcida consecutivas (Figura 1-7b). Pensa-se que a deposição circadiana é o resultado de um ritmo endógeno que pode ser afetado por condições ambientais (Campana e Neilson, 1985; Morales-Nin, 2000). Estes incrementos podem apresentar padrões mais ou menos evidentes ou difusos. Na análise da microestrutura dos otólitos, é também possível observar marcas correspondentes a diferentes fases da ontogenia dos estados larvares e dos juvenis (eclosão, primeira alimentação exógena, metamorfose, etc.).

Para estimar a sobrevivência da sardinha [*Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)] durante os estados larvar e juvenil, está a decorrer um estudo de crescimento diário cujo objetivo é validar a primeira banda de crescimento e atribuição de idade em anos (Anexo I). Anteriormente, foram desenvolvidos estudos pontuais baseados na microestrutura de otólitos de pescada [*Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758)], de verдинho [*Micromesistius poutassou* (Risso, 1827)] e de escolarinho [*Benthoosema glaciale* (Reinhardt, 1837)] (García-Seoane *et al.*, 2015).

Métodos de preparação das estruturas calcificadas

Quando não é possível observar diretamente os padrões de deposição das bandas de crescimento nas EC utilizadas para atribuir idade, recorre-se a técnicas que visam melhorar a visibilidade dessas bandas. De um modo geral, a EC é analisada inteira (superfície) ou é manipulada (seccionada, partida, polida) para se encontrar uma região onde o padrão de deposição seja mais evidente. As EC podem ainda ser queimadas ou coradas para aumentar o contraste entre bandas translúcidas e opacas (*e.g.* solha americana com TL < 30 cm).

Em espécies de teleósteos com longevidade média a longa, a identificação das bandas de idades mais avançadas em otólitos inteiros é difícil pois a espessura relativa dos incrementos tende a diminuir progressivamente à medida que o otólito cresce (ICES, 2013). Em otólitos muito espessos, como os da faneca, a identificação das bandas de crescimento também não é clara quando se observa a superfície do otólito. Nesses casos, a alternativa é observar uma secção do otólito feita ao nível do núcleo por corte

transversal dorso-ventral (*e.g.* carapau, peixe-espada preto, pescada). Para serem seccionados, os otólitos são incluídos num bloco de resina (individualmente ou em grupo). No LE, o corte dos otólitos em secções (em geral, com 0,5 mm de espessura) é feito com recurso a uma máquina de corte de precisão de alta velocidade (*Labcut 250 Abrasive Cutting Machine*¹), usando uma lâmina de diamante. Esta máquina trabalha com blocos de resina com 36-49 otólitos incluídos, permitindo cortar vários otólitos em simultâneo.

Os otólitos de pequenas dimensões cujo padrão de deposição não é visível à superfície são normalmente polidos até ao nível do núcleo, manualmente ou com recurso a uma máquina de polimento. Otólitos de grandes dimensões podem ser cortados ao nível do núcleo com recurso a ferramentas manuais e observados diretamente (*e.g.* bacalhau).

Os principais métodos de preparação de estruturas calcificadas utilizados no LE e a sua aplicação às diferentes espécies estudadas estão resumidos no Anexo II.

O conjunto de procedimentos adotados para as diferentes espécies é designado por Protocolo de Preparação de EC.

1. Protocolos de preparação de otólitos

1.1. Sem preparação

- i. Imergir otólito em água durante 24h (objetivo: hidratar).

1.2. Queimados

- i. Queimar num forno a 200 °C durante 1 h.

1.3. Secções transversais

- i. Imergir otólito numa solução 1:1 de glicerina-álcool durante 24h (objetivo: hidratar);
- ii. Preparar uma camada de resina Epoxy SP106² (*Multi-purpose Epoxy System*) com corante preto (*SP Epoxy Pigment Black*) num suporte desmontável e deixar solidificar (12-24h);
- iii. Preparar uma segunda camada de resina com corante;

¹*D.R. Bennett Limited, Middlesex, Reino Unido.*

²*Gurit SPTM, Newport, Reino Unido.*

- iv. Quando a segunda camada estiver com uma textura elástica (ca. 1h), montar os otólitos com os núcleos alinhados ao nível do plano transversal num esquema de 6 colunas x 7 linhas, com auxílio de um sistema de imagem digital;
- v. Preparar a camada superior de resina sem corante e cobrir os otólitos;
- vi. Deixar solidificar a última camada (24h);
- vii. Cortar os blocos de resina na máquina de corte de alta velocidade *Labcut 250 Abrasive Cutting Machine*¹, obtendo secções ao nível do núcleo dos otólitos (3 cortes por bloco para assegurar abranger o núcleo de todos os otólitos);
- viii. Montar as secções em lâminas de vidro em meio de montagem de secagem rápida *Entellan*² ou *DPX*³ (objetivo: preparação definitiva).

1.4. Polidos

- i. Montar o otólito com o sulco voltado para baixo numa lâmina de vidro com cimento termoplástico (*Thermo Plastic Cement*⁴);
- ii. Polir com polidora automática *Buehler Ecomet 3*⁴, a uma velocidade de 120-130 r.p.m.

1.5. Microestrutura do otólito

1.5.1. Anéis diários

- i. Montar o otólito numa lâmina de vidro com a parte convexa voltada para cima no caso dos estados larvares, e com o sulco voltado para baixo no caso dos juvenis, utilizando meio de montagem (*Entellan*³, *DPX*⁴, ou *Crystalbond*TM 509⁵);
- ii. Secar à temperatura ambiente durante pelo menos 24 horas, no caso do *DPX*⁴ ou na estufa a 37-40°C, no caso do *Entellan*³ e do *Crystalbond*TM 509⁵, durante pelo menos 12 horas;
- iii. Lixar o otólito com lixas microabrasivas com grão decrescente (30 a 9 µm) humedecidas com água;

¹ D.R. Bennett Limited, Middlesex, Reino Unido.

² Merck, Darmstadt, Alemanha.

³ Merck, Darmstadt, Alemanha.

⁴ Buehler, Lake Bluff, E.U.A.

⁵ Aremco Products, Inc., Valley Cottage, E.U.A.

- iv. Observar o otólito ao microscópio regularmente durante o processo anterior até alcançar um plano onde todos os microincrementos são visíveis a partir do núcleo; ou, quando os incrementos já se encontram em planos muito diferentes (indivíduos maiores), fazer leituras à medida que se lixa;
- v. Polir a superfície do otólito com uma lixa abrasiva de grão 0,3 µm até obter uma superfície espelhada (Secor *et al.*, 1992);
- vi. Deixar secar durante, pelo menos, duas horas antes de observar;
- vii. Para observação em ampliações maiores, utilizar óleo de imersão.

1.5.2. Estados larvares

Larvas de sardinha (*Sardina pilchardus*) em diferentes estados de desenvolvimento foram mantidas em cativeiro nas instalações do Oceanário de Lisboa (projeto VITAL, FCT PTDC/MAR/111304/2009) com o objetivo de estudar a influência da disponibilidade alimentar nos padrões de crescimento ao nível da microestrutura dos otólitos *sagittae*. Os procedimentos foram os seguintes:

- i. Dissecar a larva diretamente na lâmina de vidro para extração dos otólitos;
- ii. Secar cuidadosamente os otólitos e remover todos os resíduos;
- iii. Deitar uma gota de resina DPX¹ sobre cada otólito;
- iv. Deixar secar durante cerca de 24 horas à temperatura ambiente;
- v. Observar com ampliação de 1000× usando o microscópio de inversão munido de uma câmara de vídeo digital e de computador com um programa de análise de imagem (especificações preferenciais: iluminação LED de alto brilho, sistema de melhoramento de brilho e contraste);
- vi. Fazer as contagens e medições dos incrementos, utilizando o programa de análise de imagem.

A validação das idades dos estados larvares de sardinha é feita com um microscópio eletrónico de varrimento (SEM), de acordo com o seguinte protocolo:

- i. Arrefecer a lâmina de vidro, onde o otólito está fixado com DPX¹, com uma placa de gelo ou um elemento de congelação;

¹ Merck, Darmstadt, Alemanha.

- ii. Polir a resina o mais possível, com papel abrasivo de grão progressivamente mais fino;
- iii. Destacar o otólito, recortando a resina excedente;
- iv. Aquecer ligeiramente outra lâmina de vidro;
- v. Colocar nesta lâmina uma pequena porção de *Crystalbond*²;
- vi. Transferir o otólito destacado anteriormente para o *Crystalbond*²;
- vii. Voltar a polir cuidadosamente para obter a maior clareza possível dos incrementos diários;
- viii. Remover, novamente, o otólito da lâmina de vidro;
- ix. Transferir para cilindros de liga de cobre munidos de fita condutora de carbono dupla-face;
- x. Colocar uma gota de EDTA a 4% (Campana *et al.*, 1987) durante alguns minutos dependendo do tamanho dos otólitos (5 a 7 minutos para os estados larvares com cerca de 50 dias de idade);
- xi. Lavar com água e secar cuidadosamente;
- xii. Observar utilizando um SEM a baixa pressão³.

1.5.3. Estados juvenis

No Anexo I, está descrito o protocolo adotado para aquisição de imagens necessárias para a observação e interpretação da microestrutura dos otólitos de juvenis de sardinha, utilizando um microscópio ótico com câmara de vídeo associada e o programa TNPC⁴ desenvolvido pelo IFREMER.

Num outro trabalho, a microestrutura de otólitos de juvenis de escolarinho (*Benthoosema glaciale*) foi observada e interpretada com um microscópio universal (Figura 3-A), tendo a interpretação inicial sido validada com recurso a um microscópio eletrónico de varrimento (SEM) (Figura 3-B). O protocolo para preparação dos otólitos para observação com o SEM foi:

- i. Remover os otólitos das lâminas de vidro mergulhando-as em água até cerca de 30 minutos;

¹ Merck, Darmstadt, Alemanha.

² Aremco Products, Inc., Valley Cottage, E.U.A.

³ No trabalho da sardinha, utilizou-se um SEM Hitachi® Tabletop Microscope, TM3030Plus, disponibilizado ao IPMA, I.P., por um período experimental, pela firma que o comercializa.

⁴ Thermo Scientific™, Hillsboro, E.U.A. (anteriormente, Noesis, S.A.©, Courtaboeuf, França).

- ii. Deitar uma gota de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) Titriplex[®] III¹ a 4% (Campana *et al.*, 1987) e deixar atuar por 4 minutos;
- iii. Lavar com água;
- iv. Montar em cilindros de cobre com fita condutora de carbono dupla-face;
- v. Cobrir com pó de ouro em câmara de vácuo JEOL JFC-1100E.

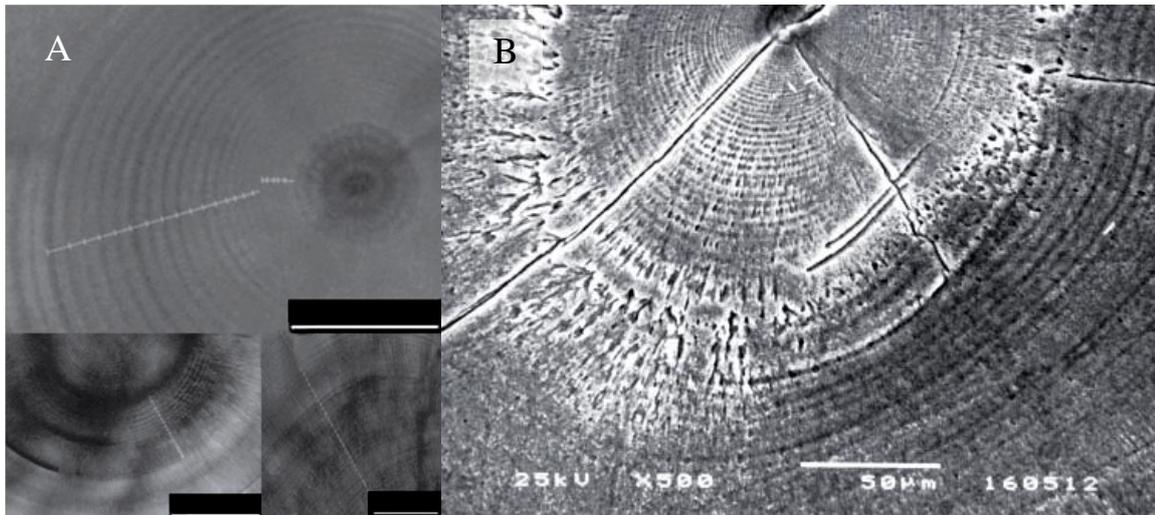


Figura 3 □ Otólito de *Benthosema glaciale* (escolarinho) observado com (A) microscópio universal com diferentes ampliações e (B) SEM com ampliação de 500× [adaptado de García-Seoane *et al.* (2015)].

Figure 3 – Otolith of *Benthosema glaciale* (glacier lanternfish) observed with (A) universal microscope with different magnifications and (B) SEM with a magnification of 500× [adapted from García-Seoane *et al.* (2015)].

2. Protocolo de preparação de ilícios

- i. Cortar uma porção do ilício junto à base, demolhar em água e remover a pele;
- ii. Preparar uma camada de resina *Epoxy SP106*² com corante preto num suporte desmontável;
- iii. Quando a resina estiver com uma textura elástica (ca. 1h), montar os ilícios, com auxílio de um sistema de imagem digital;
- iv. Preparar a camada superior de resina com corante e cobrir os ilícios;
- v. Deixar solidificar a última camada (24h);

¹ Merck, Darmstadt, Alemanha.

² Gurit SPTM, Newport, Reino Unido.

- vi. Cortar o bloco de resina na máquina de corte de alta velocidade *Labcut 250 Abrasive Cutting Machine*¹, obtendo secções transversais dos ilícios com 0,50-0,55 mm de espessura.
- vii. Montar as secções em lâminas de vidro com *Entellan*^{®2} (objetivo: preparação definitiva).

3. Protocolo de preparação de espinhos caudais de raias

- i. Extrair os espinhos dérmicos ao nível da cauda;
- ii. Imergir em tripsina a 5% com tampão fosfato pH 7,5 em banho a 50°C durante 20 min (objetivo: remover o tecido mole envolvente);
- iii. Lavar com água destilada;
- iv. Imergir em EDTA Titriplex^{® III} 5%, durante cerca de 10 min (objetivo: clarificar as bandas de crescimento);
- v. Secar os espinhos ao ar.

4. Protocolo de preparação de espinhos dorsais de tubarões Squaliformes

- i. Avaliar se a melhor estrutura para leitura de bandas de crescimento é o espinho da 1ª ou da 2ª barbatana dorsal e analisar o mesmo espinho para todos os indivíduos da espécie;
- ii. Extrair o espinho;
- iii. Colocar o espinho em água a ferver durante ca. 2 min (objetivo: remover o tecido mole envolvente);
- iv. Imergir o espinho numa solução de HNO₃ a 5% (o tempo varia consoante a espécie) (objetivo: descalcificar);
- v. Cortar secções transversais com 30 µm de espessura com um micrótomo de congelação Microm⁴ HM315;
- vi. Corar os cortes em solução de hematoxilina de *Mayer* (o tempo varia consoante a espécie);

¹*D.R. Bennett Limited, Middlesex, Reino Unido.*

²*Merck, Darmstadt, Alemanha.*

³*Merck, Darmstadt, Alemanha.*

⁴*Bicester, Reino Unido.*

- vii. Montar as secções em lâmina de vidro com *Entellan*^{®1}, cobrindo com uma lamela (objetivo: preparação definitiva).

5. Protocolo de preparação de estatólitos

- i. Lavar com água destilada o estatólito que foi guardado em álcool a 95% e secar;
- ii. Lixar o lado côncavo e o lado convexo do estatólito com lixas manuais. Nos estatólitos de lulas com comprimento do manto inferior a 40 mm, apenas se lixa o lado côncavo;
- iii. Colocar uma gota de *Entellan*^{®1} numa lâmina de vidro e deixar secar;
- iv. Abrir lateralmente na gota seca uma fenda com um bisturi e colocar outra gota de *Entellan*^{®2};
- v. Montar o estatólito no centro da segunda gota com o lado côncavo para cima (asa no plano superior) e o rostro orientado para o centro da primeira gota;
- vi. Deixar secar o meio de montagem à temperatura ambiente, durante 18-24 h;
- vii. Lixar o lado côncavo:
 - a. Com um quadrado de lixa impermeável (30 µm) humedecida com água destilada, pressionar e mover circularmente a lâmina sobre a lixa. Lavar a lixa frequentemente com um esguicho de água destilada;
 - b. Terminar o processo de lixar quando o anel de eclosão estiver imediatamente abaixo do plano superior da preparação ou quando a asa for completamente removida ou/e se atingir a extremidade do rostro, verificando frequentemente ao microscópio;
 - c. Polir com uma lixa fina impermeável (1 µm). Lavar a lixa frequentemente com um esguicho de água destilada;
- viii. Imergir a preparação em água destilada durante 2-3 h;
- ix. Descolar, cuidadosamente, a gota de resina com o estatólito embebido, secar a lâmina com um pano, colocar nova gota de *Entellan*^{®1} e colar o estatólito com o lado convexo para cima;
- x. Deixar secar o meio de montagem à temperatura ambiente durante 18-24 h;

¹ Merck, Darmstadt, Alemanha.

- xi. Lixar o lado convexo:
 - a. Repetir o procedimento seguido para o lado côncavo;
 - b. Terminar o processo de lixar quando a superfície da preparação se estender até à extremidade do rostro e à extremidade da cúpula lateral;
 - c. Polir como descrito acima;
- xii. Secar a preparação com um pano;
- xiii. Cobrir o estatólito com uma camada fina de resina (objetivo: preparação definitiva).

Métodos de observação das estruturas calcificadas

As estruturas, tanto sujeitas a métodos de preparação como sem preparação, são observadas com recurso a uma lupa, estereomicroscópio ou microscópio, existindo diversos métodos vulgarmente empregues para facilitar e melhorar a deteção dos padrões de deposição. Os métodos de observação de EC aplicados no LE são apresentados no Anexo III.

Validação de idade

A validação de uma técnica de atribuição de idade é a forma de garantir que essa técnica é exata e é um passo crucial no processo de estimação de idade e crescimento, uma vez que não é possível saber a idade absoluta e real de um peixe capturado aleatoriamente no seu meio natural. Os métodos de validação de idade para espécimes que vivem em meio natural podem ser diretos ou indiretos.

Validação direta

Os métodos de validação direta incluem: (a) cultivo e captura de indivíduos com idades conhecidas; (b) marcação-recaptura, que inclui marcação com oxitetraciclina quer por imersão ou por injeção, que é incorporada na estrutura naquele momento e detetada quando o espécime é recapturado; (c) datação radioquímica usando uma série conhecida de decaimento radioativo de isótopos naturais; (d) radiocarbono incorporado nas estruturas calcificadas a partir dos testes com bombas nucleares realizados nos anos 50 do século passado (só para espécies de maior longevidade); (e) marcadores detetados nas bandas que podem ser associados a fenómenos naturais e datados (Wright *et al.*, 2002a).

Validação indireta

Os principais métodos indiretos são: (a) análise da progressão temporal de modas de crescimento discretas e (b) análise de incrementos marginais. Existe ainda um método semidireto de validação que consiste em selecionar uma marca no bordo de estruturas calcificadas e seguir a sua formação dentro da mesma população ao longo do tempo.

A identificação da primeira banda é um dos primeiros critérios que necessita de validação, sendo crítico para grande parte das espécies (C.A.R.E., 2006). Para tal, é necessário observar estruturas de espécimes juvenis, especialmente da classe de idade 0+. A análise de estruturas de espécimes capturados ao longo do ano permite definir quando se dá a formação das bandas.

Avaliação da exatidão e precisão dos grupos de idade atribuídos

Em estudos de idade, “precisão” refere-se à concordância entre leituras do mesmo espécime e entre leitores (Eltink *et al.*, 2000). A “exatidão” é a proximidade das idades atribuídas pelos leitores à idade real de um espécime de idade conhecida (Kimura and Lyons, 1991). Assim, a exatidão só pode ser demonstrada depois de a atribuição de idade ser validada (Beamish e McFarlane, 1983). Para uma técnica de medição sem enviesamento, a precisão implica exatidão, mas são parâmetros diferentes (Morales-Nin e Panfili, 2002b). Um método de determinação de idade só pode ser considerado exato depois de ser feita a validação de idade (C.A.R.E., 2006).

Exercícios de calibração e intercâmbio de EC

O objetivo dos exercícios de calibração e intercâmbio é estimar a precisão e o viés relativo ou absoluto entre as leituras de idade feitas por leitores de diferentes laboratórios (Eltink *et al.*, 2000). As diferenças entre leituras tanto podem ser causadas pelo recurso a diferentes métodos de leitura como pelo uso de diferentes técnicas de preparação das EC ou pelo uso de diferentes EC para a mesma espécie. Assim, as técnicas de leitura só podem ser comparadas se todos os leitores recorrerem à mesma EC e esta for preparada e observada com recurso ao mesmo método. Por outro lado, num exercício de calibração pode-se testar se o tipo de EC e se os métodos de preparação causam diferenças significativas nos resultados de leitura de idade.

O intercâmbio de EC consiste na troca de estruturas ou suas imagens entre leitores de diferentes laboratórios. O intercâmbio tem a vantagem de implicar custos mais baixos do que um exercício de calibração e as estimativas de precisão e viés são mais objetivas porque os leitores usam o seu próprio equipamento e não há constrangimentos de tempo (Elsink *et al.*, 2000). Depois de um intercâmbio de

EC, poderá ser necessário realizar um *workshop*, no qual todos os leitores se juntam para analisar as mesmas estruturas e calibrar os métodos de preparação e de leitura para atribuição de idade.

ESPÉCIES ESTUDADAS

No LE realizam-se estudos de idade e crescimento de 17 espécies de teleósteos, de quatro espécies de elasmobrânquios e de uma espécie de cefalópode. A maioria destes trabalhos é realizada no âmbito do PNAB (Plano Nacional de Amostragem Biológica), sendo os respetivos resultados aplicados nas avaliações do estado dos recursos da pesca feitas ao nível do ICES e da NAFO. Atualmente, estão em curso estudos de rotina de oito espécies de teleósteos, nomeadamente, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) (anchova), *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (bacalhau), *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius, 1780) (solha americana), *Micromesistius poutassou* (Risso, 1827) (verdinho), *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1972) (sardinha), *Scomber colias* Gmelin, 1789 (cavala), *S. scombrus* Linnaeus, 1758 (sarda) e *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) (carapau). A estes estudos, acrescem estudos pontuais sobre outras espécies [*Aphanopus carbo* Lowe, 1839 (peixe-espada preto), *Bentosema glaciale* (Reinhardt, 1837) (escolarinho) e *Trisopterus luscus* (Linnaeus, 1758) (faneca)], assim como estudos descontinuados de sete espécies [*Lophius budegassa* Spinola, 1807 (tamboril preto), *L. piscatorius* Linnaeus, 1758 (tamboril), *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (pescada), *Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1792) (palmeta), *Sebastes mentella* Travin, 1951, *S. fasciatus* Storer, 1854 e *S. norvegicus* (Ascanius, 1772) (peixes-vermelhos)]. As espécies de elasmobrânquios objeto de estudos de idade pontuais são *Centrophorus squamosus* (Bonnaterre, 1788) (lixa), *Deania calcea* (Lowe, 1839) (sapata), *Raja brachyura* Lafont, 1871 (raia-pontuada) e *Raja clavata* Linnaeus, 1758 (raia-lenga). Foram ainda feitos estudos de idade e crescimento pontuais sobre o cefalópode *Loligo vulgaris* Lamarck, 1798 (lula).

Os estudos realizados no LE com estruturas calcificadas destas espécies são resumidos no Anexo IV, sendo especificado o número aproximado de ECs recolhidas por ano e o tempo aproximado despendido na respetiva preparação e leitura.

COOPERAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL

O IPMA, I.P. está envolvido em diversos grupos de trabalho nacionais e internacionais cujas atividades incidem sobre temas como pescas, avaliação e modelação, amostragem e campanhas de investigação. As atividades dos grupos de trabalho são concretizadas em reuniões de especialistas e exercícios (*workshops*).

Determinados estudos sobre biologia das espécies marinhas são peças-chave para os trabalhos de avaliação e modelação, nomeadamente os estudos de crescimento, sendo os grupos de trabalho essenciais para cruzar informação de diferentes países e regiões e definir critérios para standardizar essa informação. Nesse sentido, um dos objetivos dos exercícios de calibração e de intercâmbio de leituras é a otimização da precisão dos resultados dos estudos de idade e crescimento através da definição de procedimentos e protocolos standardizados, que devem ser adotados pelos membros e instituições participantes. Neste enquadramento, a precisão pode ser definida em termos da posição e medição das bandas de crescimento ou da estimação de idade ou número de bandas de crescimento.

No Anexo V, apresenta-se, por espécie, o resumo dos resultados obtidos em exercícios de calibração e de intercalibração nos quais membros do LE participaram recentemente. Incluem-se também colaborações nacionais de caráter pontual e estudos integrados em trabalhos académicos.

Em 2017, realizaram-se os seguintes exercícios de leitura de idades:

- WKARBLUE2 (ICES, 2017c)
 - Espécie: *Micromesistius poutassou*:
 - Objetivos: Identificar a posição da primeira banda de crescimento e de bandas “falsas” e interpretar o bordo do otólito.
- WGHANSA (ICES, 2017b)
 - Espécies: *Trachurus trachurus*, *T. picturatus* (Bowdich, 1825), *Engraulis encrasicolus* e *Sardina pilchardus*:
 - Objetivos: Avaliar o estado dos *stocks* e providenciar previsões a curto-prazo para os *stocks* de biqueirão da Divisão 9a, sardinha nas Divisões 8c e 9a, carapau na Divisão 9a e carapau-negrão na Divisão 10 (Açores).

Em 2016:

- WKARA2 (ICES, 2017d)
 - Espécie: *Engraulis encrasicolus*:
 - Objetivos: Rever informação referente a estimação de idade, discutir os resultados do intercâmbio anterior (2014), rever métodos de validação existentes para a espécie, clarificar a interpretação de bandas anuais, atualizar o protocolo de leitura de idade e preparar uma coleção de referência de otólitos.
- WKARGH2 (ICES, 2017e)

- Espécie: *Reinhardtius hippoglossoides*:
 - Objetivos: Chegar a um consenso quanto ao método de determinação de idade baseado em estudos de validação, fazer a intercalibração entre leitores com base em dois métodos promissores e determinar se as idades estimadas com base em um, ou nos dois métodos, podem ser usadas em avaliação de *stocks*.

Em 2015:

- WKARHOM2 (ICES, 2015)
 - Espécies: *Trachurus trachurus*, *T. mediterraneus* (Steindachner, 1868) e *T. picturatus*:
 - Objetivos: Rever, documentar e fazer recomendações sobre os métodos atualmente usados na atribuição de idade de espécies do género *Trachurus*.

NOTA FINAL

Os trabalhos de investigação desenvolvidos no LE envolvem tanto a utilização de metodologias de preparação e de análise das estruturas calcificadas como a investigação de novas metodologias e técnicas, de forma a obter uma maior precisão na determinação das idades e a contribuir para um melhor conhecimento sobre a biologia do crescimento das espécies que constituem os recursos pesqueiros nacionais e das que ocorrem em águas internacionais em cuja exploração participa a frota pesqueira portuguesa.

Os resultados obtidos, bem como toda a informação associada recolhida, revestem-se duma importância fundamental para a avaliação do estado dos recursos pesqueiros, realizada anualmente por Grupos de Trabalho de organismos internacionais como o ICES, em que investigadores do IPMA, I.P. participam e cujo objetivo é aconselhar comissões internacionais e governos com propostas de medidas cientificamente fundamentadas que visam a exploração sustentável dos recursos nas áreas de atuação das respetivas frotas pesqueiras.

Para a concretização dos objetivos do LE é fundamental garantir a qualidade dos trabalhos e a fiabilidade dos seus resultados. Os trabalhos efetuados envolvem com alguma frequência a participação dos técnicos e investigadores em intercâmbios, nacionais e internacionais, de leitura de idades para aferição de concordância entre leitores e em exercícios de calibração para uniformização de critérios de leitura de idade visando o aumento da respetiva precisão e fiabilidade.

Face às exigências de execução dos projetos de investigação no âmbito do estudo do crescimento, os quais têm vindo a estender-se a mais espécies, é importante o LE acompanhar os desenvolvimentos metodológicos e tecnológicos na área da esclerocronologia e estudos de crescimento. No futuro, o LE poderá vir a reunir condições para ser um laboratório certificado e constituir uma fonte de receita para o IPMA, I.P., através da realização de trabalhos pagos por instituições externas que os solicitem ao Instituto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M.; SILVA, C.; VØLSTAD, J.H., (em preparação). Portuguese onshore sampling for horse-mackerel (*Trachurus trachurus*): Estimating the catch length/age composition using commercial size category approach.

AZEVEDO, M.; SILVA, C.; VØLSTAD, J.H.; PRISTA, N.; ALPOIM, R.; MOURA, T.; FIGUEIREDO, I.; DIAS, M.; FERNANDES, A.C.; LINO, P. G.; FELÍCIO, M.; CHAVES, C.; SOARES, E.; DORES, S.; GONÇALVES, P.; COSTA, A.M.; NUNES, C. 2014. Report of the Workshop on Sampling Design and Optimization of fisheries data. *Relatórios Científicos e Técnicos do IPMA* (<http://ipma.pt>), nº 2, 79 pp.

BEAMISH, R.J.; FOURNIER, D.A., 1981. A method for comparing the precision of a set of age determinations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38 (8): 982-983.

BEAMISH, R.J.; MCFARLANE, G.A., 1983. The forgotten requirements for age validation in fisheries biology. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 735-743.

CAILLIET, G.M.; SMITH, W.D.; MOLLET, H.F.; GOLDMAN, K.J., 2006. Age and growth studies of chondrichthyan fishes: the need for consistency in terminology, verification, validation, and growth function fitting. *Environmental Biology of Fishes*, 77: 211–228.

CAMPANA, S.E., 1992. Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. In: D. K. STEVENSON, S. E. CAMPANA (Ed.), *Otolith microstructure examination and analysis*. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 117: 59-71.

CAMPANA, S.E.; GAGNÉ, J.A.; MUNRO, J., 1987. Otolith microstructure of larval herring (*Clupea harengus*): image or reality? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44: 1922-1929.

CAMPANA, S.E.; NEILSON, J.D., 1985. Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42: 1014-1032.

- C.A.R.E., 2006. *Manual on Generalized Age Determination – Procedures for Groundfish*. Committee of Age Reading Experts, Pacific States Marine Fisheries Commission, 52 pp.
- CHANG, N.Y.B., 1982. A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39 (8): 1208-1210.
- CHILTON, D.E.; BEAMISH, R.J., 1982. Age determination methods for fishes studied by the Groundfish Program at the Pacific Biological Station *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60: 102 pp.
- DEGENS, E.T.; DEUSER, W.G.; HAEDRICH, R.L., 1969. Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology*, 2: 105-113.
- DORES, S.; GONÇALVES, P., 2017. Age reading of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) of the Portuguese coast. Working document presented at the ICES Workshop on Age estimation of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) (WKARBLUE2).
- ELTINK, A.T.G.W.; NEWTON, A.W.; MORGADO, C.; SANTAMARIA, M.T.G.; MODIN, J., 2000. Guidelines and tools for age reading. (PDF document version 1.0 October 2000 at www.efan.no).
- FARIAS, I.; VIEIRA, A.R.; GORDO, L.S.; FIGUEIREDO, I., 2009. Otolith shape analysis as a tool for population discrimination of black scabbardfish (*Aphanopus carbo* Lowe, 1839) in Portuguese waters. *Scientia Marina*, 73S2: 47–53.
- GARCÍA-SEOANE, E.; MENESES, I.; SILVA, A., 2015. Microstructure of the otoliths of the glacier lanternfish, *Benthoosema glaciale*. *Marine and Freshwater Research*, 66: 70–77.
- GARRIDO, S.; FERREIRA, S.; SOARES, C.; MENESES, I.; BAYLINA, N.; TEODÓSIO, A.; SANTOS, A.M.P.; RÉ, P., (em preparação). Validation of daily increments in the otoliths of European sardine larvae (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792) reared with different diets.
- GEFFEN, A.J., 1992. Validation of otolith increment deposition rate. In: D.K. STEVENSON, S.E. CAMPANA (Eds.). Otolith microstructure examination and analysis. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 117: 101-113.
- GONÇALVES, P., ABOIM, M.A., MAHÉ, K., ELLEBOODE, R., CHANTRE, C., ÁVILA DE MELO, A., MURTA, A.G., CABRAL, H.N., (em preparação). Integrating microsatellite and otolith methodologies to assess population structure of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) off the Portuguese coast.

GONÇALVES, P.; DORES, S., 2017. Validation study on blue whiting age reading - ‘puzzle out’. Working document presented in the ICES Workshop on Age estimation of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) (WKARBLUE2).

GONÇALVES, P.; MAHÉ, K.; ELLEBOODE, R.; CHANTRE, C.; MURTA, A.G., ÁVILA DE MELO, A.; CABRAL, H.N., 2017. Blue whiting otoliths pair’s symmetry side effect. *International Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 5 (3): 6-9.

GONÇALVES, P.; VAZ DA SILVA, V., 2017. OtoRing. Available at: <http://imagej.net/OtoRing>.

GONÇALVES, P.; VAZ DA SILVA, V.; MURTA, A.G., ÁVILA DE MELO, A.; CABRAL, H.N., 2017. Image analysis as a tool to age estimations in fishes: an approach using blue whiting on ImageJ. In: L.M. CAMARINHA-MATOS, M. PARREIRA-ROCHA, J. RAMEZANI (Eds.), *8th IFIP WG 5.5/SOCOLNET Advanced Doctoral Conference on Computing, Electrical and Industrial Systems, DoCEIS 2017*, IFIP Advances in Information and Communication Technology, Springer, Cham., 499: 167–174.

ICES, 2010. Report of the Workshop on Age estimation of European hake (WKA EH), 9-13 November 2009, Vigo, Spain. ICES CM 2009/ACOM:42. 68 pp.

ICES, 2011. Report of the Workshop on Age Reading of Greenland Halibut (WKARGH), 14-17 February 2011, Vigo, Spain. ICES CM 2011/ACOM:41. 39 pp.

ICES, 2013. Report of the Workshop on Age Estimation Methods of Deep-water Species (WKAMDEEP). 21-25 October 2013, Mallorca, Spain. ICES CM 2013/ACOM: 83. 81pp.

ICES, 2014. Report of the Workshop on Statistical Analysis of Biological Calibration Studies (WKSABCAL). ICES CM 2014/ACOM:35.

ICES, 2015. Report of the Workshop on Age reading of Horse Mackerel, Mediterranean Horse Mackerel and Blue Jack Mackerel (*Trachurus trachurus*, *T. mediterraneus* and *T. picturatus*) (WKARHOM2), 26–30 October 2015, Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain. ICES CM 2015 / SSGIEOM:14. 93 pp.

ICES, 2016a. Report of the Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy and Sardine (WGHANSA), 24–29 June 2016, Lorient, France. ICES CM 2016/ACOM:17. 588 pp.

ICES, 2017a. Report of the Benchmark Workshop on Pelagic Stocks, 6–10 February 2017, Lisbon, Portugal. ICES CM 2017/ACOM:35. 278 pp.

ICES, 2017b. Report of the Working Group on Southern Horse Mackerel, Anchovy and Sardine (WGHANSA), 24–29 June 2017, Bilbao, Spain. ICES CM 2017/ACOM:17. 602 pp.

ICES, 2017c. Report of the Workshop on Age estimation of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) WKARBLUE2, 6-9 June 2017, Lisbon, Portugal. ICES CM 2017/SSGIEOM:22. 60 pp.

ICES, 2017d. Report of the Workshop on Age estimation of European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). WKARA2 2016 Report 28 November - 2 December 2016. Pasaia, Spain. ICES CM 2016/SSGIEOM:17. 223 pp.

ICES, 2017e. Report of the Workshop on age reading of Greenland halibut 2 (WKARGH2), 22-26 August 2016, Reykjavik, Iceland. ICES CM 2016/SSGIEOM:16. 40 pp.

KIMURA, D.K.; LYONS, J.J., 1991. Between-reader bias and variability in the age-determination process. *Fishery Bulletin*, 89 (1): 53-60.

MORALES-NIN, B., 2000. Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, 46: 53-67.

MORALES-NIN, B.; BJELLAND, R.M.; MOKNESS, E., 2005. Otolith microstructure of a hatchery reared European hake (*Merluccius merluccius*). *Fisheries Research*, 74: 300–305.

MORALES-NIN, B.; PANFILI, J., 2002a. Schlerochronological studies: Age estimation *In: J. PANFILI, H. de PONTUAL, H. TROADEC, P.J. WRIGHT (Eds.). Manual of Fish Schlerochronology*. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, pp. 91-98.

MORALES-NIN, B.; PANFILI, J., 2002b. Validation and verification methods: Verification. *In: J. PANFILI, H. de PONTUAL, H. TROADEC, P.J. WRIGHT (Eds.). Manual of Fish Schlerochronology*. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, pp. 138-142.

MORENO, A.; AZEVEDO M.; PEREIRA, J.; PIERCE, G.J., 2007. Growth strategies in the squid *Loligo vulgaris* from Portuguese waters. *Marine Biology Research*, 3: 49-59.

MORENO, A.; GARRIDO, S.; MENESES, I.; SILVA, A.V.; SOARES, E., 2016. Pelago 2016 – Age of juvenile sardines in Cadiz area. Working Document to the Working group WGHANSA, Lorient, 24 -29 June 2016.

MORENO, A.; PEREIRA, J.; CUNHA, M.M., 2005. Environmental influences on age and size-at-maturity of *Loligo vulgaris*. *Aquatic Living Resources*, 18: 377-384.

- MOURA, M.T.N.S.S., 2011. Reproductive strategy and population structure of *Centroscymnus coelolepis* (Chondrichthyes: Somniosidae): a scientific support for management advice. Tese de Doutoramento em Ciências do Mar, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 247 p.
- MOURA, T.; FIGUEIREDO, I.; FARIAS, I.; SERRA-PEREIRA, B.; COELHO, R.; ERZINI, K.; NEVES, A.; GORDO, L.S., 2007. The use of caudal thorns for ageing *Raja undulata* from the Portuguese continental shelf, with comments on its reproductive cycle. *Marine and Freshwater Research*, 58: 983–992.
- PANFILI, J.; MORALES-NIN, B., 2002. Validation and verification methods: Semi-direct validation. In: J. PANFILI, H. de PONTUAL, H. TROADEC, P.J. WRIGHT (Eds.). *Manual of Fish Schlerochronology*. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, pp. 129-134.
- PANNELLA, G., 1971. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science*, 173: 1124-1127.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* 9 (7): 671–675.
- SECOR, D.H.; DEAN, J.M.; LABAN, E.H., 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination, p.19-57. In: D.K. STEVENSON, S.E. CAMPANA (Eds.). Otolith microstructure examination and analysis. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 117: 19-57.
- SERRA-PEREIRA, B.; FIGUEIREDO, I.; FARIAS, I.; MOURA, T.; GORDO, L.S., 2008. Description of dermal denticles from the caudal region of *Raja clavata* and their use on the estimation of age and growth. *ICES Journal of Marine Science*, 65: 1701–1709.
- SILVA, A.V.; MENESES, I.; SILVA, A., 2015. Predicting the age of sardine juveniles (*Sardina pilchardus*) from otolith and fish morphometric characteristics. *Scientia. Marina*, 79 (1): 35-42.
- SILVA, C.; AZEVEDO, M.; CHAVES, C.; COELHO, R.; COSTA, A.M.C.; DINIS, D.; DORES, S.; FERNANDES, A.C.F.; GONÇALVES, P.; LINO, P.G.; MENDES, H.; MOURA, T.; NUNES, C.; OROSZLÁNYOVÁ, M.; PINTO, D.; SILVA, M.C., 2017. Report of the Workshop on Sampling Effort for Biological Parameters (WKSEBP), IPMA, Lisbon 18–20 April. Relatórios Científicos e Técnicos do IPMA (<http://ipma.pt>), nº 17, 55 p+ 4 Anexos.
- VIEIRA, A.R.; FARIAS, I.; FIGUEIREDO, I.; NEVES, A.; MORALES-NIN, B.; SEQUEIRA, V.; MARTINS, M.R.; GORDO, L.S., 2009. Age and growth of black

scabbardfish (*Aphanopus carbo* Lowe, 1839) in the southern NE Atlantic. *Scientia Marina*, 73 (S2): 33-46.

WILLIAMS, T.; BEDFORD, B.C., 1974. The use of otoliths for age determination. *In*: T.B. BAGENAL (Ed.). The ageing of fish. Unwin Brothers, Ltd. England, pp. 114-123.

WRIGHT, P.J.; PANFILI, J.; FOLKVORD, A.; MOSEGAARD, H.; MEUNIER, F.J., 2002a. Age validation methods: Direct validation. *In*: J. PANFILI, H. de PONTUAL, H. TROADEC, P.J. WRIGHT (Eds.). *Manual of Fish Schlerochronology*. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, pp. 114-127.

WRIGHT, P.J.; PANFILI, J.; MORALES-NIN, B.; GEFFEN, A.J., 2002b. Types of calcified structures: Otoliths. *In*: J. PANFILI, H. de PONTUAL, H. TROADEC, P.J. WRIGHT (Eds.). *Manual of Fish Schlerochronology*. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, pp. 31-57.

ANEXO I

Sardina pilchardus (Walbaum, 1792) (sardinha)
Andreia Silva, Isabel Meneses, Susana Garrido

A sobrevivência da sardinha durante os estados iniciais (larvar e juvenil) é particularmente importante para o recrutamento da espécie.

Objetivo: Validar a primeira banda de crescimento e atribuição de idade em anos.

Metodologia:

Dada a complexidade da interpretação da microestrutura (anéis diários) dos otólitos de juvenis de sardinha, a aquisição de imagens digitais é essencial, podendo o número chegar a 60 por otólito e sendo necessário construir, posteriormente, um mosaico de imagens para cada otólito.

Depois de todas as imagens correspondentes ao mesmo otólito serem adquiridas, utiliza-se a funcionalidade *photomerge* do programa *Adobe®¹ Photoshop CS3* para reconstituir o mosaico numa só imagem. Esta opção permite alinhar as imagens manualmente o que, neste caso, é importante para que não haja distorções resultantes da automatização. Depois de completo todo o mosaico, grava-se a imagem final em formato TIFF e converte-se para escala de cinzentos com a finalidade de se proceder a melhoramentos de contraste e luminosidade.

A interpretação e contagem dos incrementos é realizada com a aplicação TNPC 4 do programa *Visilog 6.3²*.

Frequentemente, a zona do núcleo do otólito é difícil de ler e interpretar. As razões desta dificuldade podem relacionar-se com diversos fatores, *e.g.*, polimento inadequado (sobre- ou sub-polimento), bandas de crescimento pouco claras, marcação de falsas bandas. Nesses casos, ter-se-á de fazer uma interpretação com base nos conhecimentos previamente adquiridos sobre a espécie-alvo.

No caso da sardinha, assume-se que a marca de identificação do anel de Primeira Alimentação (FF, *first feeding*) se faz entre os 12 e 18 μm , a que corresponde uma distância média ao primórdio de 15 μm (Fig. I-3).

¹ *Adobe Systems Incorporated, San Jose, E.U.A.*

² *Thermo Scientific™, Hillsboro, E.U.A. (anteriormente, Noesis, S.A.©, Courtaboeuf, França).*

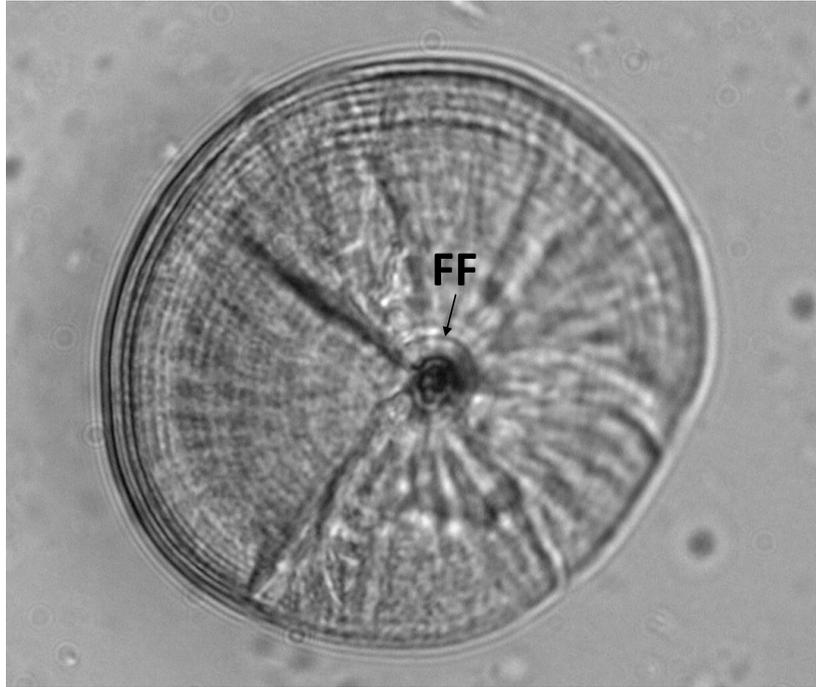


Figura I-3. Otólito *sagitta* de estado larvar de *Sardina pilchardus* mostrando a banda de crescimento que marca o início da alimentação exógena (FF). Microscópio Zeiss Axioplan2 Imaging, objetiva 63×.

Figure I-3. *Sagitta* otolith of *Sardina pilchardus* larval stage, showing the growth band that marks the start of exogenous feeding (FF), Microscope Zeiss Axioplan2 Imaging, 63× objective.

Quando a primeira banda identificável (A1) se situar para além desta distância de 15 μm , procede-se como segue (Fig. I-4):

1. Descontar o raio médio de FF (que se assume ser 15 μm) ao raio da banda A1, obtendo-se a espessura do segmento entre FF e A1;
2. Medir o segmento seguinte contendo 5 bandas;
3. Estimar o número de bandas para o segmento ilegível, *i.e.*, entre a banda FF e a banda A1, com base no valor anterior.

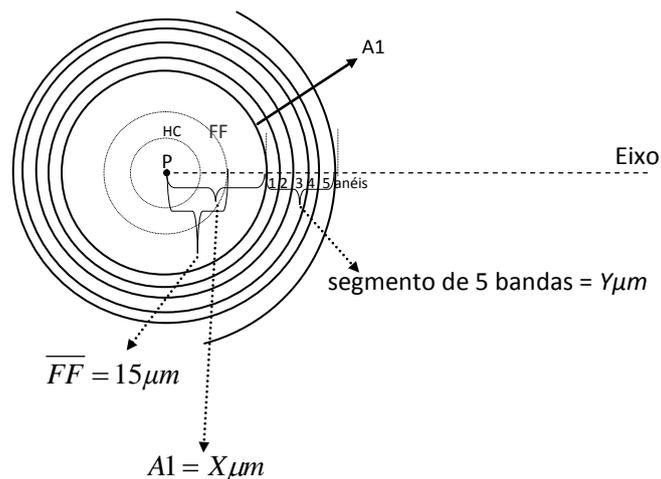


Figura I-4. Ilustração do procedimento para estimar o número de bandas na fase larvar depois do início da alimentação exógena, numa zona de leitura de idade difícil adjacente ao primórdio (P). HC (*hatch check*), anel de eclosão; FF (*first feeding*), início da alimentação exógena; A1, primeira banda identificável; Eixo de crescimento escolhido para as medições dos raios; segmento de 5 bandas adjacentes a A1.

Figure I-4. Schematic representation of the procedure to estimate the number of bands within the larval stage deposited after the start of the exogenous feeding, in a zone of difficult age reading adjacent to the primordium (P). HC, hatch check, band corresponding to hatching; FF, first feeding, start of exogenous feeding; A1, first identifiable band; *Eixo*, axis chosen for measuring the radius; *segmento de 5 bandas*, segment of five bands adjacent to A1.

Como a metodologia para preparação de otólitos para leitura de anéis diários é um processo moroso, procurou-se encontrar um método de estimação de idade em dias mais rápido. Assim, estimaram-se medidas morfométricas do otólito (diâmetro e peso) e do corpo (comprimento total e peso total) de sardinhas juvenis (menos de um ano).

Resultados: A análise de incrementos diários em otólitos de juvenis de sardinha corroborou a atribuição de idade em anos. O diâmetro da primeira banda, que se estimou medir 2 mm, está positivamente correlacionado com o comprimento do peixe na altura da sua formação. A medida do raio de potenciais bandas “falsas” não se sobrepôs à medida do raio de bandas verdadeiras, mas não foi possível distingui-las por observação do otólito (Silva *et al.*, 2015). Verificou-se também que o diâmetro e o peso do otólito estão linearmente relacionados com a idade em dias, sendo a estimativa da idade mais precisa quando se considera a primeira medida e em juvenis com menos de 200 dias (Silva *et al.*, 2015).

Observações: Um trabalho de validação da deposição de incrementos diários nos otólitos de larvas de sardinha mantidas em cativeiro demonstrou que a disponibilidade alimentar afeta a deposição de anéis, principalmente nas primeiras semanas após eclosão (Garrido *et al.*, em preparação).

ANEXO II

Métodos de preparação das estruturas calcificadas aplicados em estudos de idade e crescimento no Laboratório de Esclerocronologia

Legenda: EC, estrutura calcificada; TL, comprimento total.

EC	Método(s) de preparação	Razão de utilização do método	Limitações	Espécie(s)
Otólito	Imersão em água destilada 24-48h (dependendo do tamanho da EC)	Hidratação e clarificação das bandas de crescimento	-	Carapau (TL < 27 cm), verdinho
Otólito	1) Inclusão em resina; 2) Corte transversal.	Maior definição das bandas de crescimento, nomeadamente as mais periféricas em espécimes adultos.	Dificuldade em abranger o núcleo da EC; inclusão é definitiva; posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Carapau (TL ≥ 27 cm), peixe-espada preto, pescada
Otólito	Polimento	Clarificação das bandas de crescimento	Posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Solha americana, carapau ²
Otólito	Queima	Aumentar contraste entre as bandas opacas e translúcidas.	Posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Palmeta
Otólito	Inclusão em meio de montagem em placas de acrílico preto	Clarificação das bandas de crescimento	Inclusão é definitiva; posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Biqueirão, cavala, sarda, sardinha
Otólito	1) Inclusão em meio de montagem sobre lâminas de vidro; 2) Polimento com lixas com grão de 30, 9 e 0,3 µm até os incrementos e o núcleo estarem visíveis.	Clarificação das bandas de crescimento	Polimento é definitivo; posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Sardinha, verdinho, peixe lanterna (anéis diários)
Otólito	1) Causticação com EDTA Titriplex® III 5%; 2) Montagem em fita de carbono; 3) Cobertura com ouro em câmara de vácuo.	Realce das bandas, fixação de um otólito de dimensões muito pequenas.	Tratamento definitivo; posteriores aplicações da EC limitadas ¹	Peixe lanterna, sardinha (anéis diários)
Otólito	Quebra	Clarificação das bandas de crescimento	Poderá ter de ser posteriormente polido ou queimado	Bacalhau
Otólito	1) Quebra; 2) Queima.	Clarificação das bandas de crescimento	Posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Peixes vermelhos

¹ Nomeadamente, quebra, corte e polimento invalidam a análise de forma do contorno porque a forma é alterada; queima altera a composição química e a inclusão em resina ou outro meio compromete a composição elementar, invalidando o uso da EC para microquímica.

² Esta técnica já não é aplicada em otólitos de carapau.

³ Merck, Darmstadt, Alemanha.

EC	Método(s) de preparação	Razão de utilização do método	Limitações	Espécie(s)
Otólito	1) Queima; 2) Inclusão em resina; 3) Corte transversal.	Maior definição das bandas de crescimento, nomeadamente as mais periféricas em espécimes adultos.	Dificuldade em abranger o núcleo da EC; inclusão é definitiva; posteriores aplicações da EC limitadas ¹ .	Faneca
Otólito	Etanol-glicerina 1:1	Clarificação das bandas de crescimento; aplica-se depois de inclusão, corte e queima.	Contaminação que invalida o uso da EC para microquímica.	Peixe-espada preto
Ilício	1) Inclusão em resina; 2) Corte transversal.	Clarificação das bandas de crescimento, nomeadamente as mais periféricas em espécimes adultos	Dificuldade em abranger apenas um segmento do ilício no mesmo corte.	Tamboril
Espinho dorsal	Imersão em tripsina em banho 50°C	Remoção do tecido mole envolvente	Pode danificar a estrutura.	Raias
Espinho dorsal	Imersão em EDTA Titriplex [®] III ² 5%	Clarificação das bandas de crescimento	-	Raias
Espinho dorsal	Fervura em água	Remoção do tecido mole envolvente	-	Tubarões
Espinho dorsal	Imersão em HNO ₃ 5%	Descalcificação	-	Tubarões
Espinho dorsal	Corte transversal com micrótomo	Visualização das bandas de crescimento no mesmo plano	-	Tubarões
Espinho dorsal	Coloração com hematoxilina de Mayer	Amplificação do contraste entre as bandas de crescimento	Contaminação que invalida o uso da EC para microquímica.	Tubarões
Espinho dorsal	Montagem em meio de montagem em lâmina	Preservação	Inclusão é definitiva.	Tubarões

¹ Nomeadamente, quebra, corte e polimento invalidam a análise de forma do contorno porque a forma é alterada; queima altera a composição química e a inclusão em resina ou outro meio compromete a composição elementar, invalidando o uso da EC para microquímica.

² Merck, Darmstadt, Alemanha.

ANEXO III

Métodos de observação das estruturas calcificadas (EC) aplicados em estudos de idade e crescimento no Laboratório de Esclerocronologia

Método(s) de observação	Descrição	Objetivo
Observação direta	Com recurso a lupa binocular, estereomicroscópio ou microscópio	Contagem de bandas; medições na EC.
Observação indireta com sistema digital (câmara+computador)	EC é observada com recurso a um programa informático, sendo a imagem capturada com uma câmara digital adaptada a equipamento de ampliação (estereomicroscópio ou microscópio)	Armazenamento de imagens para posteriores leituras, intercâmbios e <i>workshops</i> ; medições na EC e anotações.
Manipulação digital	Alterar contraste entre bandas com recurso a um programa de tratamento de imagem	Clarificação das bandas de crescimento
Observação com luz transmitida	Colocação da fonte de luz abaixo do objeto	Clarificação das bandas de crescimento
Observação com luz refletida	Colocação da fonte de luz acima do objeto	Clarificação das bandas de crescimento
Recurso a solução 1:1 de glicerina e álcool, timol ou óleo mineral	Imergir ou pincelar a EC	Clarificação das bandas de crescimento
Ampliação	Quando se faz observação direta, fazer variar a ampliação ajuda a identificar as bandas. Para cada espécie, usa-se a mesma ampliação, tanto para espécimes pequenos como grandes, e entre leitores. Se forem gravadas imagens digitais, a ampliação deve ser registada e deve-se acrescentar uma escala de calibração à imagem.	Clarificação das bandas de crescimento

ANEXO IV

Resumo, por espécie, dos estudos com estruturas calcificadas (EC) realizados no Laboratório de Esclerocronologia.

Legenda: ND, não disponível.

Nome científico	Nome comum	EC	Compromisso	Regularidade	EC recolhidas por ano ²⁶		Ano início	Tempo médio para atribuição de idade (dia)	Nº leitores envolvidos
					Campanhas	Desembarques			
<i>Aphanopus carbo</i> Lowe, 1839	Peixe-espada preto	Otólito	-	Pontual	0	360	1997	25	ND
<i>Benthoosema glaciale</i> (Reinhardt, 1837)	Escolarinho	Otólito	-	Pontual	ND	0	2011	ND	2
<i>Engraulis encrasicolus</i> (Linnaeus, 1758)	Biqueirão	Otólito	ICES	Rotina	ND	Variável	2008	ND	2
<i>Centrophorus squamosus</i> (Bonmatere, 1788)	<i>Lixa</i>	Espinho dorsal	-	Pontual	0	200	2010	60	3
<i>Centroscymnus coelolepis</i> Barbosa du Bocage & de Brito Capello, 1864	<i>Carocho</i>	Espinho dorsal	-	Pontual	0	200	2011	60	3
<i>Gadus morhua</i> Linnaeus, 1758	Bacalhau	Otólito	NAFO	Rotina	300	0	1970's	ND	1(+1)
<i>Hippoglossoides platessoides</i> (Fabricius, 1780)	Solha americana	Otólito	NAFO	Rotina	1000	0	1980's	28	1(+1)
<i>Loligo vulgaris</i> Lamarck, 1798	Lula	Estatólito	-	Pontual	ND	360 ²⁷	1990	ND	1
<i>Lophius budegassa</i> , Spinola, 1807; <i>L. piscatorius</i> Linnaeus, 1758	Tamboril	Ilício	ICES	Parado	ND	ND	1990's	ND	1(+1)

²⁶ Número aproximado.

²⁷ Entre 1990 e 1996.

Nome científico	Nome comum	EC	Compromisso	Regularidade	EC recolhidas por ano ²⁸		Ano início	Tempo médio para atribuição de idade (dia)	Nº leitores envolvidos
					Campanhas	Desembarques			
<i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758)	Pescada	Otólito	ICES	Parado	800	1300	1979	180	1
<i>Micromesistius poutassou</i> (Risso, 1827)	Verdinho	Otólito	ICES	Rotina	300	500	1993	15	3
<i>Octopus vulgaris</i> Cuvier, 1797	Polvo	Estatólito	-	Pontual	ND		2014	ND	2
<i>Raja brachyura</i> Lafont, 1871	Raia-pontuada	Espinho caudal	-	Pontual ²⁹	ND	ND	2004	NA	1
<i>Raja clavata</i> Linnaeus, 1758	Raia-lenga	Espinho caudal	-	Pontual	ND	ND	2003	ND	ND
<i>Reinhardtius hippoglossoides</i> (Walbaum, 1792)	Palmeta	Otólito	NAFO	Parado	ND	ND	1990's	ND	1(+1)
<i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792)	Sardinha	Otólito	ICES	Rotina	1000	2000-5000	1970's	ND	4
<i>Scomber colias</i> Gmelin, 1789	Cavala	Otólito	ICES	Rotina	285 ³⁰	600	2002	12	1(+1)
<i>Scomber scombrus</i> Linnaeus, 1758	Sarda	Otólito	ICES	Rotina	102 ³¹	700	1996	12	1

²⁸ Número aproximado.

²⁹ Tese de mestrado.

³⁰ Soma das três campanhas de 2017.

³¹ Soma das três campanhas de 2017.

Nome científico	Nome comum	EC	Compromisso	Regularidade	EC recolhidas por ano ³²		Ano início	Tempo médio para atribuição de idade (dia)	Nº leitores envolvidos
					Campanhas	Desembarques			
<i>Sebastes mentella</i> Travin, 1951; <i>S. fasciatus</i> Storer, 1854; <i>S. norvegicus</i> (Ascanius, 1772)	Peixes-vermelhos	Otólito	NAFO	Parado	ND	ND	1990's	ND	1(+1)
<i>Trachurus trachurus</i> (Linnaeus, 1758)	Carapau	Otólito	ICES	Rotina	variável	1600	1975	150	2
<i>Trisopterus luscus</i> (Linnaeus, 1758)	Faneca	Otólito	ICES	Pontual	ND	600	2014	90	3

³² Número aproximado.

ANEXO V

Resumo de resultados obtidos em workshops nos quais participam membros do Laboratório de Esclerocronologia.

CV, coeficiente de variação.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<i>Aphanopus carbo</i> Lowe, 1839 (peixe-espada preto)	APHACARBO (2005-2009)	<ul style="list-style-type: none"> - Otólitos seccionados são melhor método para determinar idade do que otólitos inteiros e vértebras; - Espécie de crescimento rápido; - Idade máxima atribuída foi 15 anos; - Forma de otólito permitiu diferenciar espécimes da Madeira e do continente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Farias <i>et al.</i>, 2009 ; - Vieira <i>et al.</i>, 2009 ; - O número de exemplares dos Açores não foi suficiente para tirar conclusões.
	Doutoramento, colaboração IPMA- IMEDEA	<ul style="list-style-type: none"> - Composição microquímica permitiu identificar 2 áreas de reprodução; - Composição microquímica permitiu diferenciar <i>Aphanopus carbo</i> e <i>A. intermedius</i>. 	Trabalhos em preparação para publicação.
	WKAMDEEP (ICES, 2013)	Promover mais intercâmbios e comparações entre leitores.	
<i>Centrophorus squamosus</i> (Bonnaterre, 1788) (lixa) e <i>Deania calcea</i> (Lowe, 1839) (sapata)	Estudo de precisão na leitura de idades coordenado pelo National Institute of Water and Atmospheric Research (Nova Zelândia) (2012)	<p><i>Lixa:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Baixa concordância entre leitores (CV elevado sobretudo nos indivíduos mais velhos); - Os resultados das leituras indicam que há um sinal nas estruturas (i.e., indivíduos mais pequenos têm menos bandas e indivíduos maiores têm mais bandas) mas a interpretação difere de leitor para leitor. <p><i>Sapata:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - As estruturas foram interpretadas de forma consistente pelos diferentes leitores; - A curva de crescimento apresentou uma grande variação nas idades atribuídas por classe de comprimento, o que poderá dever-se a uma má visibilidade das bandas de crescimento e a variabilidade biológica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Objetivo: examinar a precisão de diferentes leitores de idades destas espécies; - Participaram 6 leitores; - Não foi indicado um protocolo de leitura – cada leitor adotou o protocolo existente no seu laboratório; - Os protocolos de leitura são semelhantes entre as duas espécies.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<i>Engraulis encrasicolus</i> (Linnaeus, 1758) (biqueirão)	Intercâmbio de leitura WKARA2 (ICES, 2016b)	<ul style="list-style-type: none"> - Baixos níveis de concordância e precisão no intercâmbio de 2014; - São sugeridos valores limite de concordância na ordem dos 80% e CVs máximos na ordem dos 20% em todas as idades; - Há evidências para se adotar um único modelo de crescimento em todas as áreas; - Diferenças marcadas na intensidade das bandas translúcidas de inverno – quanto mais para norte, maior a intensidade das bandas; - Dificuldades na atribuição de idades: e.g. diferenciação entre anéis verdadeiros e falsos; contabilização de anéis fracamente marcados; fraco reconhecimento do padrão anual de crescimento; classificação do tipo de bordo. - Inconsistências detetadas na atribuição da data de nascimento a meio do ano. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de validar métodos de determinação de idade; - Revisão da interpretação dos otólitos e atribuição de idades; - Foram estabelecidas como metas 90% de concordância e 10% de CV; - Criação de uma coleção de referência de otólitos por área (% concordância superior a 80% na Intercalibração de 2014); <p>Este documento (e outros de anos anteriores) tem servido de suporte às leituras de idade de biqueirão realizadas recentemente no IPMA.</p>
	PNAB	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de capturas e continuidade ao longo do ano em 2017; - Rotina de leitura de idades nos otólitos; - Chaves de comprimento/idade para utilização no grupo de trabalho de avaliação do ICES WGHANSA (ICES, 2017b). 	<ul style="list-style-type: none"> - Espécie não-prioritária; - Captura ocasional (principalmente Norte e Algarve); - Otólitos recolhidos nas campanhas (maioritariamente campanhas de acústica) e na amostragem biológica dos desembarques comerciais; - Aumento do esforço de amostragem em Matosinhos em 2017; - Sem trabalhos de investigação dirigidos nem documentos de trabalho redigidos.
<i>Gadus morhua</i> Linnaeus, 1758 (bacalhau)	<i>Area II Cod (Gadus morhua) Otolith International Exchange Scheme 2005/2006</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Atribuição de idade fácil se os otólitos forem bem preparados; - % concordância foi 61% (nenhum leitor alcançou 90% de concordância com a idade modal) e o CV 26%; - O principal problema foi a sobrestimação de idades; - Alguns otólitos não estavam partidos ao nível do núcleo e não estavam disponíveis nem a outra metade, nem o par para se poder corrigir. 	<ul style="list-style-type: none"> - Concordância entre leitores experientes deve ser $\geq 90\%$; - Recomendações: <ul style="list-style-type: none"> o Apresentar as duas metades do otólito escolhido para a intercalibração; o polir as duas metades do otólito; o serrar em vez de cortar; o apresentar amostras representativas da distribuição anual; o participantes contribuírem com leituras individuais; o Institutos contribuírem com amostras; o coordenador deve ser ajudado com a folha de cálculo <i>GuusEltink</i>; o Imagens com as leituras anotadas.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<p><i>Lophius piscatorius</i> Linnaeus, 1758 (tamboril)</p>	<p><i>Anglerfish (Lophius piscatorius) illicia and otoliths exchange 2011</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fortes discrepâncias entre leituras feitas no ilício e no otólito do mesmo peixe; - Concordância entre leitores mais elevada em ilícios (45%); - Leitura com base nos otólitos não foi validada; - Investigação mais avançada nos ilícios do que nos otólitos; - Em 2012, foram usados modelos de avaliação baseados na estrutura de comprimentos. 	<p>Recomendações: validação.</p>
<p><i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758) (pescada)</p>	<p>WKAEH 2009</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Interpretação de idades é mais fácil com informação de marcação; - Marcação só pode validar o período de crescimento do otólito entre a marcação e a recaptura; - Estabeleceu-se um conjunto de diretrizes para ajudar na interpretação dos otólitos, mas tem de ser calibrado com marcação-recaptura; - Pescada cresce duas vezes mais depressa do que se pensava anteriormente – evidências em estudos de marcação, crescimento diário, bioenergia e tipologia da macroestrutura do otólito. 	<ul style="list-style-type: none"> - São precisos espécimes com um intervalo de tempo maior entre marcação e recaptura (35-45 cm até agora); - Estudos de crescimento diário poderão obter uma melhor interpretação dos padrões de crescimento de peixes mais pequenos; - É necessário desenvolver uma nova interpretação para a estimação de idade da pescada; - Aconselha-se substituir os critérios até então usados pelas novas diretrizes estabelecidas neste workshop; - Desenvolver as diretrizes para aumentar exatidão e precisão das chaves comprimento-idade; - São necessários mais dados validados para entender o padrão de crescimento – experiências de marcação e dos efeitos de fatores ambientais sobre o crescimento dos otólitos; - Foi recomendado ler uma coleção comum de 250 otólitos; - Foi recomendado fazer uma intercalibração anual com 100 otólitos; - Realizar novo <i>workshop</i> 3 anos depois; - Continuar leituras e discussão de resultados, para estimar o modelo de crescimento e desenvolver uma matriz de transição entre leituras anteriores e atuais.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<p><i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758) (pescada)</p>	<p>Intercalibração 2011</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa precisão – elevada variabilidade devido à participação de leitores com diferentes graus de experiência; - Elevada variabilidade na interpretação das bandas de crescimento, em todos os tamanhos analisados e entre leitores com mais ou menos experiência; - WebGR não calculou APE (<i>Average percent error</i>) corretamente; - Com a aplicação das novas diretrizes, a precisão dos leitores experientes diminuiu; - Novas diretrizes não estão validadas; - Não será possível construir uma matriz de erro de transição para reconstruir chaves de idade-comprimento enquanto as idades não forem validadas. 	<p>- Objetivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Analisar precisão e enviesamento entre leitores com base nas diretrizes definidas no WKAEH de 2009; ○ Testar a aplicabilidade da plataforma WebGR como ferramenta para intercalibração de otólitos.
<p><i>Micromesistius poutassou</i> (Risso, 1827) (verdinho)</p>	<p>WKARBLUE2 (ICES, 2017c)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Criada uma coleção de referência de otólitos de verdinho por área (otólitos com $\approx 100\%$ de concordância); - 1º anel nos otólitos de verdinho capturado na costa portuguesa apresenta um tamanho superior (8.0-11.8 mm) ao descrito na bibliografia para esta espécie (8.33-9.33 mm) (Dores e Gonçalves, 2017); - Apresentação e aplicação de tabela com a distribuição do comprimento das bandas de crescimento ao longo das idades (idades entre os 0 e 10 anos) (objetivo: ajudar os leitores na classificação de idades através da aplicação de critérios mais objetivos, do que apenas a contagem de anéis; ferramenta útil para a deteção de bandas “falsas”) (Gonçalves e Dores, 2017); - Apresentação de aplicações digitais: <ul style="list-style-type: none"> ○ OtoRing (detalhado abaixo); ○ “3D profile” (ImageJ) – aplicado a otólitos de verdinho para identifica falsos e duplos anéis; - Foi analisado o incremento marginal por área, nos otólitos usados no exercício de intercalibração durante o <i>workshop</i>. 	

Espécie	Trabalho	- Resultados/Conclusões	Observações
<i>Micromesistius poutassou</i> (Risso, 1827) (verdinho)	Intercâmbio IPMA 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Grandes diferenças entre leitores: comparação das leituras com a idade modal (relativa a um leitor de referência), CV e percentagem de concordância entre leitores; - Principais motivos: falta de experiência do leitor e fraca objetividade dos critérios. 	
	OtoRing (Gonçalves e Vaz da Silva, 2017), colaboração IPMA, I.P. e Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL)	<ul style="list-style-type: none"> - Programa informático de acesso livre para leitura de idades em otólitos com base em análise de imagem, desenvolvido em linguagem JAVA e implementado no programa <i>ImageJ</i> (Schneider <i>et al.</i>, 2012); - Principais vantagens: <ul style="list-style-type: none"> o Permitir de forma fácil o armazenamento e a posterior revisão das idades atribuídas; o Fazer calibrações entre leitores; o Ajudar na formação de investigadores que se iniciam na leitura de otólitos. 	
	IPMA e IFREMER	<ul style="list-style-type: none"> - A análise da simetria em pares de otólitos de verdinho revelou que, para esta espécie, as imagens devem ser obtidas pelo lado côncavo do otólito (superfície distal) (Gonçalves <i>et al.</i>, 2017). - Está em fase de conclusão um estudo de morfologia dos otólitos de verdinho, análise e comparação em indivíduos capturados na costa portuguesa, costa da Irlanda e Mares Mediterrâneo e Adriático (Gonçalves <i>et al.</i>, em revisão). 	
	WKSDO (Azevedo <i>et al.</i> , 2014) e WKSEBP (Silva <i>et al.</i> , 2017)	<ul style="list-style-type: none"> - Modelo de otimização para identificação do número de otólitos que devem ser lidos por amostra, área, sexo e classe de comprimento (objetivos: construção da chave idade-comprimento a aplicar aos dados de capturas para posterior uso na avaliação do stock para esta espécie). 	<ul style="list-style-type: none"> - Desenvolvido, numa primeira fase, para a sardinha (WKSDO) e posteriormente melhorado e aplicado ao verdinho, no âmbito do WKBEP.
<i>Raja clavata</i> Linnaeus, 1758 (raia-lenga)	Doutoramento, colaboração com PNAB	<ul style="list-style-type: none"> - Espinhos caudais pequenos são melhores para leitura de idades do que outros espinhos caudais e vértebras; - Verificou-se a deposição anual de bandas com base na análise do bordo; - Estabeleceu-se data de nascimento a 1 de junho com base na prevalência de bordo translúcido em maio e junho; - A idade máxima estimada é 10 anos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Serra-Pereira <i>et al.</i>, 2008; - Não houve ainda nenhum workshop ou intercâmbio.
<i>Raja undulata</i> Lacepède, 1802 (raia-curva)	PNAB	<ul style="list-style-type: none"> - Não há diferenças significativas entre estimativas de idade atribuída a partir de espinhos caudais e vértebras; - Diferenças nas estimativas de idade de primeira maturação podem refletir a existência de diferentes populações na costa continental portuguesa. 	<ul style="list-style-type: none"> - Moura <i>et al.</i>, 2007.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<i>Reinhardtius hippoglossoides</i> (Walbaum, 1792) (palmeta)	WKARGH (ICES, 2011)	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados iguais com otólitos e escamas; - Estudos de marcação com oxitetraciclina (OTC) sugerem que a determinação de idade com exatidão é possível até um comprimento total de 48-66 cm; - Bomba de radiocarbono aponta para maior longevidade e cerca de metade da taxa de crescimento em relação ao método de estimação de idade tradicional; - Novos métodos resultaram numa estimação de idades superior às obtidas pelo método tradicional a partir de ca. da idade 5; - Evidência de diferenças nas taxas de crescimento entre <i>stocks</i>; - É necessário validar idade total por análise de bomba de radiocarbono para todas as unidades de <i>stock</i> com base em amostras arquivadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - As instituições envolvidas no <i>workshop</i> não usam todas o mesmo método; - O método tradicional de atribuição de idade de palmeta faz-se com base em otólitos inteiros não-corados e em escamas.
	WKARGH2 (ICES, 2017e)	<ul style="list-style-type: none"> - OTC e marcação permitiram validar resultados do método de otólito inteiro congelado; - Marcação química (SrCl) e bomba de radiocarbono permitiram validar resultados do método das secções transversais; - Possibilidade de combinar mais que um método se se verificar que os resultados são semelhantes; - Poderá haver diferenças nas taxas de crescimento intrínsecas aos <i>stocks</i>; - A exatidão dos métodos atualmente aplicados é suficiente para usar as idades estimadas na avaliação do <i>stock</i>; - O problema de enviesamento está ainda a ser resolvido; - Sugere-se o uso de uma matriz de erro na idade ou curva de crescimento com erros em futuras avaliações do <i>stock</i>. 	
<i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792) (sardinha)	WKARAS2 (ICES, 2017d)	<ul style="list-style-type: none"> - Percentagem média de concordância com idade modal: 77.0 % na Península Ibérica; 75.2 % na Baía da Biscaia; - Enviesamento médio: 0.03 anos; - Precisão (CV): 32.8 % na Península Ibérica (influenciado por elevado CV na idade 0 no Golfo de Cádiz); 14.7 % na Península Ibérica (sem idade 0); 14.1 % na Baía da Biscaia; - Principais discrepâncias na atribuição de idade são a identificação do bordo e da primeira banda de crescimento; - Propostas para melhorar atribuição de idade: - Diferenças na sazonalidade do bordo relacionadas com idade; - Usar uma bitola para auxiliar na identificação da primeira banda de crescimento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Intercalibração entre setembro e dezembro de 2010; - PGCCDBS <i>Guidelines for Workshops on Age Calibration</i> recomenda CV máximo de 5%; - Foi criada uma coleção de referência com imagens digitais de otólitos.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<i>Scomber colias</i> Gmelin, 1789 (cavala)	Colaboração IPMA e FCUL (trabalho de Mestrado)	Principal resultado foi a estimativa do diâmetro médio do primeiro incremento anual.	Objetivo: estimar parâmetros de crescimento da cavala.
<i>Sebastes</i> spp. (peixes vermelhos)	<i>NAFO Scientific Council Meeting</i>	As classes de idade de 2009-2011 em idade 5-6 são as mais abundantes entre 2014 e 2016.	<ul style="list-style-type: none"> - A composição em comprimentos da captura comercial foi relativamente estável entre 1989 e 2001, com comprimento médio anual na ordem dos 27-33 cm; - A conservação do comprimento médio abaixo da média desde 2007 reflete um declínio no <i>stock</i> explorável.
<i>Trachurus trachurus</i> (Linnaeus, 1758) (carapau)	PNAB	<ul style="list-style-type: none"> - Procedeu-se à revisão do plano de amostragem do carapau, insistindo na necessidade de fazer uma amostragem estratificada para garantir a cobertura equilibrada de todas as categorias de tamanho comercial (T1 a T6); - Estudos de morfometria do corpo permitiram diferenciar os três <i>stocks</i> descritos para o Atlântico; - Da análise da forma do contorno do otólito, resultou a separação do stock de Portugal dos stocks mais a norte (ICES, 2017a). 	<ul style="list-style-type: none"> - Detetadas diferenças nas taxas de crescimento entre carapau capturado na parte mais a sul da divisão 27.9a e as restantes áreas; - Distribuição de comprimentos amostrados diferente entre áreas.
	WKRHOM2 (ICES, 2015)	<p>Conclusões do intercâmbio de 2014:</p> <ul style="list-style-type: none"> - baixa precisão (47-56 % concordância, CV 29-69 %); - mesma precisão para otólitos seccionados ou otólitos inteiros. 	<ul style="list-style-type: none"> - Problemas detetados <p><i>Trachurus trachurus</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> o identificação da 1ª banda de crescimento de inverno devido à presença de anéis falsos; o sobreposição das 4ª e 5ª bandas; <p><i>T. mediterraneus</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> o identificação da 1ª banda de inverno; o 1ª banda mais ou menos a meia distância do núcleo à 2ª banda; o falsos anéis entre 1ª e 2ª bandas de inverno correspondendo à primeira maturação; o sobreposição de bandas a partir da 3ª banda de inverno porque o incremento começa a diminuir; <p><i>T. picturatus</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> o identificação da 1ª banda de inverno; o a deposição da 1ª banda de crescimento é contígua à da 1ª banda de inverno; o bandas de inverno pouco pronunciadas; o sobreposição de bandas a partir da 2ª.

Espécie	Trabalho	Resultados/Conclusões	Observações
<i>Trisopterus luscus</i> (Linnaeus, 1758) (faneca)	Primeira intercalibração de otólitos (2015)	<ul style="list-style-type: none"> - Índice de precisão não permitiu concluir qual o melhor critério; - Há diferenças na interpretação da idade conforme o critério aplicado; - A principal diferença é a localização da primeira banda de crescimento; - Recomendam-se estudos de crescimento diário para validação da primeira banda; - Precisão pode ter sido afetada por uso de diferentes ampliações das imagens. 	<ul style="list-style-type: none"> - Objetivos: <ul style="list-style-type: none"> o Comparar critérios entre IPMA e IEO; o Estimar precisão e enviesamento relativo das leituras de idade feitas com base nos métodos de ambos institutos; o Definir critério de atribuição de idade comum; o Criar uma coleção de referência de otólitos; - Foi proposto um novo exercício de intercalibração entre institutos (usando a mesma ampliação nas imagens).
<i>Loligo vulgaris</i> Lamarck, 1798 (lula)	Projectos Eurosquid II (AIR-CT92- 0573) e CEPHVAR (FAIR-CT96- 1520) Colaboração IPMA, I.P. e Universidade de Aberdeen	<ul style="list-style-type: none"> - Efeito positivo da temperatura superficial da água (SST) sobre o comprimento-na-idade; - Assumindo duas coortes de acordo com SST (frio, CC, e quente, WC), a longevidade foi superior para lulas da coorte “quente” que passam a vida adulta em águas mais frias – menor longevidade para populações em águas quentes; - Jovens crescem até 75 mm em comprimento do manto (ML) em 170 dias; - Diferenças não significativas no comprimento-na-idade de juvenis; - Diferenças entre sexos a partir dos 8 meses: taxa de crescimento de machos continua a aumentar e a das fêmeas sofre uma inflexão, relacionada com a maturação; - Condições ambientais do verão (temperatura elevada, disponibilidade de alimento e duração do dia; - Comprimento mínimo de maturação (15 cm (Moreno <i>et al.</i>, 2005)) é alcançado tardiamente na CC, aos 8 meses, nos meses de verão; - Fêmeas WC iniciam maturação mais novas, nos meses de inverno e início de primavera, com menor disponibilidade de recursos; - Fatores exógenos são os que mais afetam o crescimento de fêmeas juvenis (imaturas); - Crescimento das fêmeas maduras depende da combinação entre fatores exógenos e endógenos; - Crescimento somático de machos é pouco afetado pelo processo de maturação, permitindo-lhes ajustar a alocação dos recursos, logo o crescimento é mais dependente de fatores exógenos (ambientais); - Condições ambientais prestam um papel significativo na taxa e modo de crescimento de “segunda fase”. 	<ul style="list-style-type: none"> - Objetivo: analisar a variabilidade nos tipos de crescimento entre sexos e coortes sazonais; - Moreno <i>et al.</i>, 2007.

