
Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente
Mestrado em Biologia Marinha (2º ciclo)
BIOLOGIA PESQUEIRA
1º ano - 1º. Semestre 2007/2008

VERIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO

Qualquer que seja a estrutura calcificada que se usar na determinação da idade é fundamental que se complete o estudo com a avaliação da técnica que se está a utilizar. Esta avaliação compreende dois processos, um de verificação e outro de validação. O primeiro processo relaciona-se com a precisão das estimações de idade realizadas através da leitura de estruturas calcificadas e o segundo com a exactidão (*accuracy*) dessas estimações.

Figura 1 - Precisão *versus* Exactidão

A verificação consiste, normalmente, num estudo onde são envolvidos dois ou mais leitores que, independentemente, efectuam leituras de idade nas mesmas peças ou num estudo realizado por um mesmo leitor, através da realização de várias leituras independentes na mesma peça. Avalia-se desta forma a consistência do leitor na determinação da idade numa determinada estrutura calcificada, usando um determinado método de preparação e de leitura (critérios). A variação entre contagens é, normalmente, inferior no caso do leitor singular que no caso de vários leitores. Há vários métodos que se podem utilizar neste tipo de análise incluindo análises de regressão linear das leituras do leitor Y em função das leituras do leitor X, testes estatísticos de comparação entre valores médios de leituras de dois leitores sobre as mesmas peças e através da construção de vários índices (e.g., a percentagem de concordância, o erro médio percentual, APE e o coeficiente de variação)

Figuras 2 e 3 – Métodos de verificação

A validação é usada para estabelecer e manter um critério de determinação da idade a partir da leitura de estruturas calcificadas. Isto é, fazer corresponder uma escala temporal (e.g., anual) ao padrão de deposição observado na estrutura calcificada (os incrementos). **A validação deve ser uma parte integral de qualquer estudo de idade e crescimento.** Infelizmente, uma grande parte dos estudos de idade e crescimento que se realizam não contemplam esta componente.

Note que os estudos comparativos de determinação de idade através de diversas estruturas calcificadas (e.g., otólitos, escamas e vértebras) não são técnicas de validação pois apenas ajudam a aumentar a confiança na determinação da idade.

Tipicamente, a validação da leitura de idades (da contagem de zonas de crescimento anual) consiste em determinar a idade através da leitura de estruturas calcificadas de indivíduos cuja idade é conhecida e comparar a idade estimada com a idade conhecida (**Métodos de Validação Directa**). Este trabalho ajuda o leitor a interpretar correctamente as estruturas calcificadas que está a analisar (identificando as zonas de crescimento e reconhecendo aneis falsos). Isto é particularmente importante no estudo dos incrementos diários onde a formação de aneis sub-diários é normal. Nestes estudos, é exigida ao leitor uma grande experiência na identificação dos aneis diários.

Métodos de Validação Directa

Estes métodos são, essencialmente, de dois tipos: Marcação e recaptura (1) e Cultivo de indivíduos em cativeiro (2). São os métodos mais rigorosos. Devem ser aplicados a indivíduos de toda a gama de idades por forma a evitar extrapolações indevidas.

1. Marcação e recaptura

Consiste em capturar indivíduos da espécie em estudo, marcá-los, devolvê-los ao mar e recapturá-los tempos depois. Para além de se colocar uma marca física no corpo dos indivíduos (e registar-se o seu comprimento e, por vezes, o seu peso, no momento da marcação) pode-se, também, colocar uma marca de referência temporal nas próprias estruturas calcificadas (e.g., nos otólitos) que se estão a usar para a determinação da idade. Uma vez recapturado, e uma vez que se conhece o intervalo de tempo entre a

captura e a recaptura, pode-se calcular o crescimento em comprimento e em peso que esse indivíduo teve durante esse período e, caso tenham sido marcadas as estruturas calcificadas, pode-se também observar o crescimento registado na estrutura calcificada em apreço.

A marcação e recaptura é um método muito utilizado em estudos de dinâmica de populações pois permite não só conhecer se uma espécie migra ou não e quais as suas rotas de migração ficando-se a conhecer a sua verdadeira área de distribuição geográfica, como também estudar o seu crescimento e mortalidade.

O tipo de marca e o local onde se coloca dependem do tipo de animal. Utilizam-se diferentes lugares no corpo dos animais. Os implantes visíveis na cabeça ou debaixo da pele são desejáveis pois não afetam o desempenho hidrodinâmico do peixe. Nos crustáceos é preciso assegurar que a marca fica presa à musculatura para não haver o risco de a mesma ser perdida durante a muda.

Figuras 4 a 7 – Tipos de marcas e locais onde podem ser colocados

Acetato 1 – Tipos de marcas (crustáceos e moluscos)

Utilizam-se marcas externas e internas. Para a colocação das marcas utilizam-se aplicadores especiais (e.g., pistola). Há marcas acústicas, de rádio e, mais recentemente, electrónicas (DTS – “Data Storage Tags”) que, colocadas externamente ou internamente (através de uma pequena cirurgia), registam uma grande quantidade de informação sobre o indivíduo.

Pode haver problemas de mortalidade associados à colocação das marcas, que devem ser avaliados. Em muitos casos os peixes são ligeiramente anestesiados antes de serem marcados.

Figura 8 - Processos de anestesia e marcação > filmes

Os programas de marcação¹ exigem publicidade adequada (e.g., nos portos de desembarque, por intermédio de *posters*) e atractivos como a oferta de prémios (geralmente simbólicos) para motivar a entrega da marca e do comprimento do animal e, nos casos em que se precisa da estrutura calcificada, do próprio animal. Nestes casos, o prémio é pecuniário e, em certos casos, pode até ser bastante elevado (e.g. programas de marcação de atuns realizado pelo ICCAT²).

Figura 9 – Divulgação dos programas de Marcação e Recaptura

Marcação de estruturas calcificadas

A menos que o peixe tenha nascido em cativeiro é necessário, na altura da sua captura, colocar uma marca na estrutura calcificada que sirva de referência temporal.

Há vários métodos para marcar estruturas calcificadas mas os mais importantes são os corantes fluorescentes que são aplicáveis a todos os tipos de estruturas calcificadas. Este método baseia-se na incorporação de um composto químico específico na superfície mineralizada da estrutura calcificada. Estes compostos têm a capacidade de emitir uma cor específica, fluorescente sob luz ultravioleta, e são, assim, localizados posteriormente. A coloração das marcas depende do comprimento de onda da fonte luminosa e dos filtros ópticos utilizados.

A aplicação dos corantes pode ser feita por injeção intraperitoneal ou intramuscular (1), imersão do corpo do animal (útil, em particular, para espécies de pequenas dimensões) (2) e até incorporação na comida (quando em cativeiro) (3).

Figura 10 – Administração de tetraciclina > filme.

A longevidade de alguns corantes (tetraciclina e fluorceína) é boa em otólitos e vértebras mas é fraca nas escamas devido ao efeito de descoloração provocado pela luz

¹Consultar, por exemplo, a página da NOAA sobre o Projecto de marcação do Serrano-estriado (garoupa) “Black Sea Bass” - <http://www.nefsc.noaa.gov/read/popdy/blackseabass-tagging/tagReporting.htm>

² Ver por exemplo filme da agência Basca AZTI sobre a marcação de atum no Oceano Índico em: <http://www.azti.es/verpaginaCompleta.asp?nodo1=46&nodo2=0&content=13&pagina=326&anterior=308>

solar nestes corantes foto-sensitivos (e.g., há referência a longevidade superior a 20 anos).

Os corantes utilizados são a tetraciclina (fluorescência amarela), alizarina (fluorescência vermelha), fluorceína (fluorescência amarelo-verde) e xilenol laranja (fluorescência vermelha). A tetraciclina é utilizada desde a década de sessenta e é ainda a mais utilizada.

Figuras 11 a 13 – Marcas de tetraciclina

Há outros métodos, apenas aplicáveis a otólitos, como marcas induzidas por alterações na temperatura, marcas induzidas por alterações no ciclo diário de luz e marcação com radioisótopos (com estroncio radioactivo ^{85}Sr).

Para a validação de ciclos anuais de crescimento é preciso que o período entre a captura (marcação) e a recaptura seja superior a 12 meses.

2. Cultivo em cativeiro

A marcação e recaptura em ambiente natural é sempre preferível. No entanto, para se assegurar um número suficiente de recapturas é preciso proceder à marcação de um grande número de indivíduos o que, por vezes, não é possível (e.g. por razões financeiras). Por isso, recorre-se frequentemente ao cultivo e crescimento em cativeiro. Nestes casos, é preciso especificar e controlar muito bem as condições sob as quais se vai proceder ao estudo de validação pois a taxa de crescimento dos animais (e logo a periodicidade dos incrementos nas estruturas calcificadas) é afectada pela quantidade de alimento, periodicidade da alimentação, tamanho do tanque e temperatura.

Figura 14 – Tanques de cultivo

Estes métodos têm sido muito utilizados na validação de aneis diários. Por vezes, em laboratório, os animais ficam sujeitos a *stress* não naturais conduzindo à formação de incrementos sub-diários e interrupções nas marcas de crescimento.

Tratamento dos dados

Obtém-se a relação linear entre o número de incrementos observado na estrutura calcificada e o período de tempo entre a captura e a recaptura ou de cultivo. A relação é estimada por regressão linear

$$(n^{\circ} \text{ incrementos}) = a + b \times (\text{número de dias})$$

Tanto o declive como a ordenada na origem devem ser testados estatisticamente, usando testes t-Student considerando-se como hipóteses nulas $H_0: a = 0$ e $H_0: b = 1$.

Se $b = 1$ e $a = 0 \Rightarrow$ o número de incrementos contados está relacionado com o número de dias (houve validação!);

Se $b = 1$ e $a \neq 0 \Rightarrow$ a taxa de deposição corresponde ao número de dias mas não começou a processar-se no primeiro dia da experiência;

Se $b \neq 1$ e $a \neq 0 \Rightarrow$ não há relação directa entre o número de incrementos e o número de dias. A deposição não é diária.

Métodos de Validação Semi-directa

São os métodos mais utilizados. Consistem na observação da evolução das zonas marginais das estruturas calcificadas, ao longo do tempo. É preciso proceder a observações ao longo do período de tempo de acordo com o ciclo de incrementos de crescimento em causa (diários ou anuais).

O método consiste em observar a natureza do bordo das estruturas calcificadas, seleccionar uma determinada marca (e.g. zona opaca nos otólitos) e seguir a sua formação ao longo do tempo numa determinada população.

A validação semi-directa é normalmente utilizada para validar a deposição estacional. Há dois tipos de estudos possíveis, um que utiliza dados qualitativos e outro que utiliza dados quantitativos.

1. Dados qualitativos (evolução do bordo)

Presença ou ausência de um determinado tipo de bordo na estrutura calcificada (e.g. zona opaca nos otólitos) e expressar o resultado em termos percentuais. É esperado um ciclo anual nas regiões temperadas e dois ciclos por ano nas regiões tropicais, caso seja possível ler idades.

Figura 15 – Evolução do bordo

2. Dados quantitativos (crescimento marginal)

Este método consiste em medir a distância que separa as últimas marcas (e.g. zona opaca do otólito) do bordo da estrutura calcificada. O eixo de medição e a definição das marcas utilizadas têm que ser rigorosamente normalizados.

Acetato 2 – Medição de estruturas calcificadas (e.g., otólitos)

Consideram-se a Distância Marginal Absoluta (AMD), que é a distância que separa a última marca do bordo e a Distância Marginal Relativa (RMD) que é a razão entre a AMD e a distância entre as duas últimas marcas. RMD é, por vezes, expresso em percentagem.

$RMD = (R - r_i)/(r_i - r_{i-1})$ onde R é o raio da peça, r_i é o raio da última zona de crescimento e r_{i-1} é o raio da penúltima zona de crescimento.

Figuras 16 – Definições de AMD e RMD

RMD compensa o facto da redução do crescimento com a idade (a largura das zonas de crescimento vão diminuindo com a idade). É, portanto, menos sensível a variações na taxa de crescimento uma vez que as medições são relativas. É mais fácil seguir um determinado ciclo com o RMD que com o AMD.

Para os indivíduos com zero ano não se pode ter RMD.

A análise de incrementos marginais tem sido usada essencialmente para determinar a altura de formação do incremento anual em todos os tipos de estruturas calcificadas de peixes teleósteos temperados.

De notar que a altura de formação das zonas anuais de crescimento varia com a idade.

Figura 17 – Variação de AMD e RMD ao longo do ano

Acetato 3 – Diferenças na formação das zonas anuais de crescimento com a idade no bacalhau.

A interpretação do bordo apresenta, no entanto, uma série de dificuldades nos otólitos, quer devido à sua pouca espessura na periferia, quer à existência de taxas de crescimento do otólito nas suas diferentes faces.

Métodos de Validação Indirecta

Os métodos de validação indirecta são baseados em informação que apoia a interpretação da idade mas não valida a periodicidade dos padrões de crescimento da estrutura calcificada. Os métodos mais frequentemente utilizados são baseados na Análise de Frequências de Comprimentos.

Figuras 18 – Análise de frequências de comprimentos

No entanto, têm sido propostos muitos outros métodos para a validação indirecta da Idade.

O seguimento de classes anuais muito fortes através de séries temporais de composições de idade têm servido, igualmente, para ajudar a validar os métodos de determinação directa da idade.

Acetato 4 – Classe anuais - Arenque (Rosa Lea)

Literatura a consultar:

Panfili, J., H. de Pontual, H. Troadec & P.J.Wright, 2002 (eds.). Manual of fish sclerochronology. Brest, France. Ifremer-IRD coedition, 464 p.