

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Estudo da cadeia alimentar do cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus* em condições de cultivo utilizando isótopos estáveis

Tânia Catarina Gomes Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Miquel Planas, e co-orientação do Doutor Raul José Silvério Bernardino

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar



Estudo da cadeia alimentar do cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus* em condições de cultivo utilizando isótopos estáveis

Tânia Catarina Gomes Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Miquel Planas, e co-orientação do Doutor Raul José Silvério Bernardino

Título: Estudo da cadeia alimentar do cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus* em condições de cultivo utilizando isótopos estáveis

Copyright © Tânia Catarina Gomes Ferreira

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos em papel ou em forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este trabalho foi elaborado no laboratório do *Proyecto Hippocampus* do Grupo de Biologia e Fisiologia Larvar de Peixes (BFLP), no Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (IIM) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Espanhol, com financiamento dos projectos CGL2009-08386 (Governo espanhol) e 09MDS022402PR (Governo Regional da Galiza).

Dedicatória e Agradecimentos

Dedico todo este trabalho ao meu pequeno irmão Jacinto; por ser a minha vida, a minha inspiração e a minha eterna fonte de energia.

Quero agradecer o orientador desta tese Doutor Miquel Planas, por me receber no seu *Proyecto Hippocampus* e me permitir trabalhar com este animal que me fascina, o cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus*. Também à Sonia Valladares que me permitiu elaborar a minha dissertação em conjunto com a sua, partilhando dados, ideias, trabalho e tornando a tarefa bem mais fácil.

Deixo um agradecimento ao co-ordenador da tese Doutor Raul Bernardino que tornou possível a minha estadia fora do país me ajudou a acalmar a ansiedade nos últimos momentos de entrega.

Um grande obrigado também à minha grande “amiga portuguesa” Diana Vasconcelos, por estar sempre disposta a ouvir-me nas nossas longas horas de conversação em Português e por me ajudar a manter a sanidade linguística.

A todos os verdadeiros amigos que me ajudaram a não me sentir tão longe de casa e que sempre me acolheram da melhor maneira ao regressar: Luís, Alcina, Janica, Miguel, Sérgio, Mafalda, Daniel, Diogo, Saul e Susana.

Obrigada Andreu Blanco pelas dicas e pelo mergulho mais “emocionante” da minha vida; e obrigada aos técnicos do grupo de Biologia e Fisiologia Larvar de Peixes (BFLP) do IIM-CSIC Alexandre Chamorro, Patricia Ruiz, e Tomás Hermelo que me ajudaram a integrar, tornaram toda a estadia bem mais animada. Não posso deixar de agradecer à Eva Seoane que me acolheu em sua casa e partilhou momentos de vida, e ao Leo que me acompanhou todos os dias.

Nunca esquecendo o apoio incondicional da minha tia Clara Gil que me acompanhou nesta jornada e tomou conta “dos meus” em casa.

E, Obrigada Mãe! Muito obrigada mãe. Pela preocupação constante.

Resumo

Este trabalho visa o desenvolvimento de um conhecimento sobre a cadeia alimentar do cavalo-marinho *Hippocampus guttulatus* em condições de cultivo. Esta análise foi efectuada utilizando isótopos estáveis, de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de Azoto ($\delta^{15}\text{N}$). O trabalho desenvolvido tem como finalidade um estudo e acompanhamento das alterações isotópicas nos tecidos dos indivíduos utilizados nas experiências. Foram efectuadas duas experiências: alimentação de adultos e de crias. Analisando amostras de barbatana dorsal de adultos (recorrendo a técnica de fin-clipping) a diferentes tempos de cultivo podemos determinar a assimilação de alimento, e assim efectuar uma comparação entre estes indivíduos e os selvagens. É possível também, acompanhar a temporalidade e alterações isotópicas nos tecidos (a nível de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Já com as crias (sacrificando o indivíduo e analisando a totalidade da massa corporal) efectuou-se uma experiência de comparação isotópica dos diferentes tipos de alimento disponibilizados desde o primeiro dia, artémia e copépodes (calanóides e harpacticóides).

No estudo levado a cabo com os adultos foi visível uma assimilação adequada do alimento oferecido o que remete a uma assinatura isotópica semelhante à encontrada nos indivíduos no meio natural. A técnica de fin-clipping possibilitou a toma de amostras sem ter de sacrificar o animal e mostrou ser um método de amostragem eficaz para utilizar com espécies ameaçadas.

No caso das crias é perceptível uma melhor condição em cultivo das mesmas quando alimentadas inicialmente com copépodes calanóides (entre 4 a 5 dias) e posteriormente adicionando artémia á sua dieta. Existe também uma melhor assimilação inicial do alimento e uma maior taxa de sobrevivência quando comparado com indivíduos alimentados tanto com artémia ou harpacticóides.

Palavras-chave: *Hippocampus guttulatus*, cavalo-marinho, cultivo, isótopos estáveis, fin-clipping, alimentação.

Abstract

This work aims to develop an understanding of the food chain of the seahorse *Hippocampus guttulatus* in cultivation conditions. This analysis was performed using stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$). The work aims to study and monitoring of isotopic changes in the tissues of individuals used in the experiments. It was carried out two experiments: adult feeding and offspring. Analyzing samples of adult dorsal (using the technique of fin-clipping) at different culture times we can determine the assimilation of food, and thus make a comparison between these individuals and the wild. It is also possible to follow the temporal and isotopic changes in the tissues (at $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). Yet, with the young (and sacrificing the individual analyzing the totality of body weight) was carried out an experiment isotopic comparison of the different types of food available from day one, brine shrimp and copepods (calanoid and harpacticoid).

In the study conducted with adults was visible a proper assimilation of food offered which leads to an isotopic signature similar to that found in individuals in the wild. The technique of fin-clipping allowed the taking of samples without sacrificing the animal and proved to be an effective sampling method for use with endangered species.

In the case of the offspring is noticeable better cultivation when fed initially with calanoid copepods (4 to 5 days) and then adding shrimp to your diet, there is also a better assimilation of food and a higher survival rate when compared with individuals fed with brine shrimp or harpacticoid copepod.

Key-words: *Hippocampus guttulatus*, seahorse, cultivation, stable isotopes, fin-clipping, feed.

Índice de Matérias

1. Introdução.....	1
A – Biologia.....	1
A1 – Taxonomia.....	1
A2 – Distribuição e Habitat.....	3
A3 – Descrição e Caracterização.....	3
A4 – Estrutura interna.....	5
A5 – Alimentação.....	6
A6 – Reprodução.....	6
B – Ameaças à espécie.....	9
B1 – Acções de conservação.....	10
C – Aquacultura.....	10
C1 – Instalações.....	12
C2 – Reprodutores.....	12
C3 – Crias.....	16
C4 – Alimento.....	17
D – Isótopos Estáveis.....	19
D1 – Razão de isótopos estáveis na dieta.....	21
D2 – Espectroscopia de Massa de Razão Isotópica.....	22
D4 – Padrões utilizados no IRMS.....	25
2. Revisão de Literatura.....	27
A - Kelly M.H. e Hagar W.G. 2006. Nonlethal sampling of sunfish sculpin for stable isotope analysis: how scale and fin tissue compare with muscle tissue. North American Journal of Fisheries Management 26: 921-925.....	27
B – Valladares S. e Planas M. 2010. Assessment of fin tissue use for stable isotopes analyses in seahorses. Apresentado em Aquaculture Europe 2010 Porto (Portugal). 28	
3. Material e Métodos.....	31
A – Desenho de experiências no laboratório.....	31
A1 - Crias.....	31
B – Mergulho.....	32
B1 – VIFE – Implante Fluorescente Visível.....	33

C – Produção/mantimento do Alimento nas instalações	35
C1 – Artémia salina	36
C2 – Copépodes – Harpacticóides (<i>Tisbe</i> spp). e Calanóides (<i>A. Tonsa</i>)	38
C3 – Camarões – <i>Palaemonetes varians</i>	39
D – Métodos de Amostragem para Isótopos Estáveis	39
D1 – Amostra de Barbatana Dorsal	39
D2 – Amostra de Crias	40
D3 – Amostra de Fezes.....	40
D4 – Amostra de Alimento.....	41
D5 – Enriquecimento do alimento.....	41
E – Método de preparação de amostras para análise de Isótopos Estáveis	42
F – Análise estatística	44
F1 - Adultos	44
F2 – Crias.....	44
4. Resultados.....	45
A – Adultos.....	45
A1 – Análise ANOVA com 1 factor	48
A2 – Teste Kruskal-Wallis	48
A3 – Teste <i>t-Student</i>	48
A4 – Adultos vs Alimento.....	49
B - Crias.....	51
B1 – Análise ANOVA com 1 factor.....	55
B2 – Teste Post Hoc	56
5. Discussão e Conclusão	57
A – Adultos.....	57
B – Crias	58
6. Referências Bibliográficas.....	61
Sites Consultados.....	64
7. Anexos.....	65
A – Análise Isótopos Estáveis	65

Índice de Figuras

Figura 1-1: Exemplos de outras espécies de cavalo-marinho.	2
Figura 1-2: <i>Hippocampus guttulatus</i> , Cuvier 1829	2
Figura 1-3: Mapa da distribuição de <i>Hippocampus guttulatus</i> . (IUCN 2010)	3
Figura 1-4: <i>Hippocampus guttulatus</i>	4
Figura 1-5: Representação esquemática de indivíduos da espécie <i>Hippocampus guttulatus</i>	5
Figura 1-6: Esquema da estrutura interna de cavalo-marinho	6
Figura 1-7: Representação de Ciclo de vida do cavalo-marinho.....	7
Figura 1-8: Cavalos marinhos para venda	9
Figura 1-9: Imagem das zonas de amostragem do Proyecto <i>Hippocampus</i>	11
Figura 1-10: Planta simplificada das instalações do laboratório do IIM.....	12
Figura 1-11: Unidade de reprodutores de cavalo-marinho, <i>Hippocampus guttulatus</i>	14
Figura 1-12: Detalhes da unidade de reprodutores	15
Figura 1-13: Colar identificativo de cavalos-marinhos	16
Figura 1-14: Apresentação e caracterização dos sistemas de aquários utilizados para crias.....	17
Figura 1-15: Imagens de estruturas cruciais ao cultivo de cavalos marinhos	18
Figura 1-16: Misidáceos	19
Figura 1-17: Tabela periódica parcial dos isótopos estáveis e instáveis.	20
Figura 1-18: Esquema simplificado do Espectrómetro de Massa de Razão Isotópica... 23	
Figura 1-19: Fragmentação de iões.	24
Figura 1-20: Representação da deflexão da trajectória dos iões	24
Figura 1-21: Trajecto do feixe de iões num sistema de IRMS.	25
Figura 2-1: Dimensão de corte da barbatana dorsal	28
Figura 2-2: Relação entre peso de barbatana e valores $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em <i>H. Guttulatus</i> . . 29	
Figura 3-1: Apresentação esquemática da preparação de indivíduos num mergulho. ... 33	
Figura 3-2: Material e procedimentos para uso do Kit VIFE.	35
Figura 3-3: Etapas do ciclo de vida de <i>Artemia salina</i>	36
Figura 3-4: 1 – Prisma de eclosão de Artémia.....	38
Figura 3-5: Corte em barbatana dorsal com técnica Fin-Clipping.	40
Figura 3-6: Processamento de amostras para análise de isótopos estáveis.....	43

Figura 4-1: Representação gráfica dos valores isotópicos obtidos por IRMS em relação ao tempo de recolha de amostra.	47
Figura 4-2: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{N}$ (‰)(‰) médios ao longo do tempo de amostragem.....	47
Figura 4-3: Percentagens anuais de cada alimento dado diariamente aos adultos	49
Figura 4-4: Representação gráfica de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{N}$ (‰) dos adultos e dos três tipos de alimento oferecidos.	50
Figura 4-5: Representação gráfica dos valores isotópicos obtidos (tanto de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) como de $\delta^{13}\text{C}$ (‰)) por IRMS em relação ao tempo de recolha de amostra.	52
Figura 4-6: Representação gráfica de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{N}$ (‰) das crias e dos três tipos de alimento oferecidos.	53
Figura 4-7: Representação gráfica da taxa de sobrevivência das crias.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1-1: Classificação taxonómica do cavalo-marinho <i>H. guttulatus</i>	2
Tabela 1-2: Parâmetros gerais de água e aquários do laboratório do Projecto Hippocampus.....	15
Tabela 1-3: Abundância Relativa e padrão aceite internacionalmente para os principais isótopos usados em estudo. PDB – <i>Pee Dee Belemnite</i> , um fóssil de <i>Belemnitella americana</i> da formação Peedee, da Carolina do Sul, EUA, S.C.; N ₂ atm – azoto atmosférico) (Dawson e Brooks. 2001).....	21
Tabela 3-1: Parâmetros dos aquários da experiência.....	31
Tabela 3-2: Procedimento de cultivo de <i>Artemia salina</i>	37
Tabela 3-3: Descrição do cultivo de copépodes no laboratório.....	38
Tabela 3-4: Descrição do cultivo de camarões no laboratório.	39
Tabela 4-1: Valores dos indivíduos em estudo. ID – identificação do indivíduo, Dias – número de dias em cultivo que os indivíduos levam no laboratório (valor 0 corresponde ao dia que foram capturados do selvagem e colocados nas instalações), $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) – correspondem aos valores Azoto e Carbono, respectivamente, da análise por IRMS.	46
Tabela 4-2: Tabela descritiva.	48
Tabela 4-3: Teste de homogeneidade de variâncias.	48
Tabela 4-4: Teste de comparação de três independentes.....	48
Tabela 4-5: Análise estatística por grupos.....	49
Tabela 4-6: Teste de amostras independentes.	49
Tabela 4-7: Valores correspondentes de Azoto e Carbono ($\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, respectivamente) da análise por IRMS ao alimento dado aos adultos em cultivo.	50
Tabela 4-8: Valores dos indivíduos em estudo. ID Amostra – identificação do tipo de alimento a que os indivíduos estavam sujeitos, Dias – número de dias da experiência, $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) – correspondem aos valores Azoto e Carbono, respectivamente, da análise por IRMS.....	51
Tabela 4-9: Informação dos valores de isótopos estáveis dos diferentes tipos de alimento fornecido à experiência de alimentação com crias	53
Tabela 4-10: Tabela descritiva.	55

Tabela 4-11: Teste de homogeneidade de variâncias.	55
Tabela 4-12: Análise de ANOVA com 1 factor.	55
Tabela 4-13: Comparações por Tukey HSD, para $\delta^{15}\text{N}$ (‰).	56
Tabela 7-1: Custos da Análise de Isótopos no CACTI – Universidade de Vigo.....	65

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ANOVA – Análise de variância

BFLP – Grupo de Biologia e Fisiologia Larvar de Peixes,

CACTI – Centro de Apoio Científico e Tecnológico á Investigación

CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna,

CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Científicas Espanhol

GPS – Sistema de Posicionamento Global

ID – Identificação

IIM – Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo

IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry

IUCN – Red List of Threatened Species,

LED – Diodo emissor de luz

MS – Mass Spectroscopy

SIA – Análise de isótopos estáveis

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences),

VIFE – Implante Fluorescente Visível

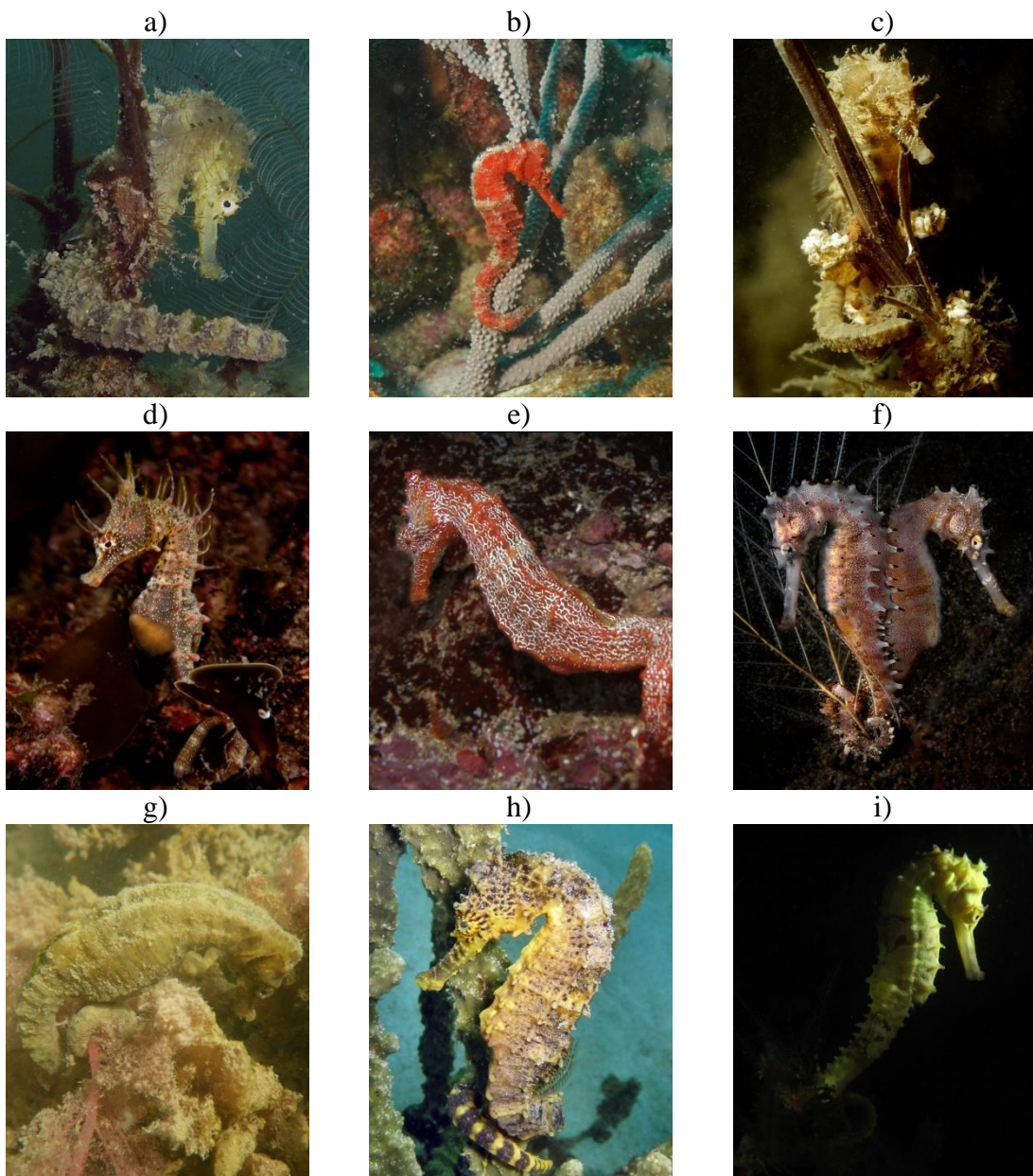
UV – Ultravioleta

1. Introdução

A – Biologia

A1 – Taxonomia

Os cavalos-marinhos são peixes ósseos (Teleostei), classificados na família Syngnathidae, que inclui também os dragões marinhos (seadragons) e as marinhas (pipefishes). Pensa-se, actualmente, que o género *Hippocampus* possui 32 diferentes espécies de cavalos-marinhos.



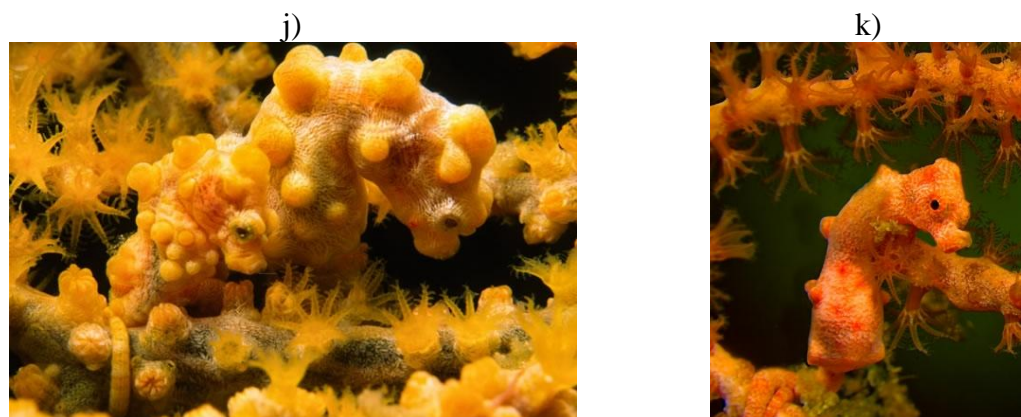


Figura 1-1: Exemplos de outras espécies de cavalo-marinho. a) *H. kuda*, b) *H. reidi*, c) *H. hippocampus*, d) *H. breviceps*, e) *H. ingens*, f) *H. hystrix*, g) *H. capensis*, h) *H. comes*, i) *H. spinosissimus*, j) *H. bargibanti* e k) *H. denise*. (onte: [http://seahorse.fisheries.ubc.ca/ Project Seahorse](http://seahorse.fisheries.ubc.ca/ProjectSeahorse))

Hippocampus guttulatus é uma espécie residente na costa portuguesa e espanhola e é a espécie objecto de estudo neste trabalho.



Figura 1-2: *Hippocampus guttulatus*, Cuvier 1829

Tabela 1-1: Classificação taxonómica do cavalo-marinho *H. guttulatus*. (Fonte: <http://www.fishbase.org/>)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Syngnathiformes
Família	Syngnathidae
Género	<i>Hippocampus</i>
Espécie	<i>Hippocampus guttulatus</i> , Cuvier 1829

Nome comum: Português – Cavalo-marinho de focinho longo; Inglês – Long-snouted Seahorse; Espanhol – Caballito de mar narizón.

Sinónimos: *Hippocampus longirostris* Schinz, 1822 e *Hippocampus ramulosus* Leach in Shaw & Nodder, 1814.

A2 – Distribuição e Habitat

Hippocampus guttulatus é uma espécie que ocorre essencialmente em águas europeias, no Oceano Atlântico, desde a Holanda ao sul de Portugal, e no Mar Mediterrâneo. Também pode ocorrer no canal de Suez e Canárias. (Fonte: <http://www.fishbase.org/>)

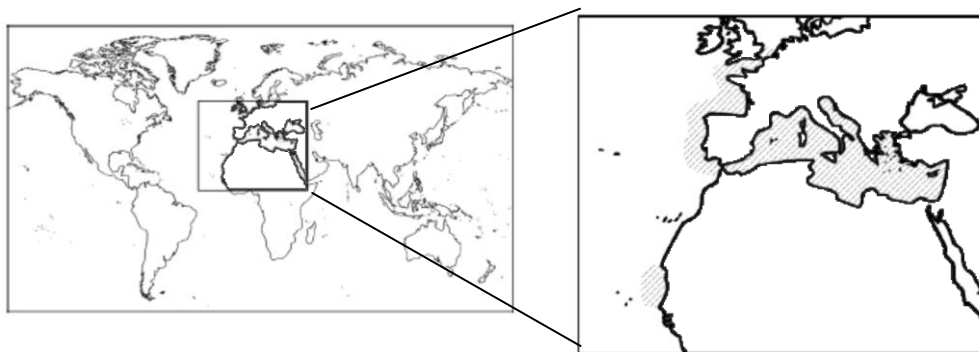


Figura 1-3: Mapa da distribuição de *Hippocampus guttulatus*. (IUCN 2010)

Esta espécie é mais frequentemente encontrada em águas rasas marinhas, com um máximo de 12 m de profundidade. (CITES, 2010) Em zonas de algas marinhas (macroalgas e *Zoostera*), estuários ou zonas rochosas. (Curtis e Vincent. 2005; Wood, 2007)

A3 – Descrição e Caracterização

O *Hippocampus guttulatus* é um indivíduo que, em adulto, pode alcançar um tamanho máximo de 21,5 cm (macho). São indivíduos com uma cor verde-acastanhada variável onde predominam manchas brancas (muitas vezes com anéis pretos). Possui exosqueleto ósseo que é formado por placas ósseas fundidas logo por baixo de uma fina camada de pele. (CITES, 2010)



Figura 1-4: *Hippocampus guttulatus*, exemplar macho no aquário do laboratório do Proyecto Hippocampus. (Foto de Tânia Ferreira)

Tem como características que os distinguem:

Caudal preênsil;

Ausência de barbatana caudal, possuindo uma cauda preênsil que lhe permite ficar fixo ao substrato;

A base da barbatana dorsal levantada movendo-se, portanto, na vertical;

A posição da cabeça em ângulo recto com o tronco;

Uma bolsa incubadora (nos machos apenas);

Ausência de escamas, o seu corpo é formado por placas ósseas em forma de anéis. (Foster e Vicent.2004; Teske et al. 2004)

É um animal caricato com aparência bizarra e características de diferentes animais:

Cabeça de cavalo;

Armadura de tatu;

Cauda de macaco;

Bolsa incubadora de marsupiais;

Movimento independente dos olhos e mudança de cor de pele/ camuflagem de camaleão;

Barbatanas peitorais como asas.

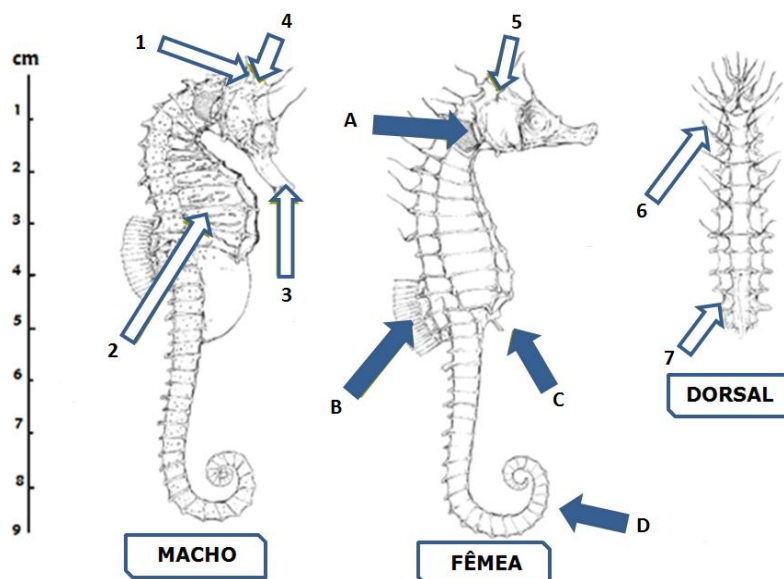


Figura 1-5: Representação esquemática de indivíduos da espécie *Hippocampus guttulatus*, um macho e uma fêmea e a vista dorsal. 1 – Coroa não ligada á nuca, 2 – Manchas brancas rodeadas por linhas pretas, que se aglomeram em linhas onduladas, 3 – Focinho longo, 4 – Pequena coroa, mas distinta, com 5 pontos arredondadas ou botões, 5 – placa alta e plana na frente da crina, 6 – Cirros, Filamentos grossos (pode ser perdida em amostras secas) e 7 - Espinhos bem desenvolvidos, com pontas arredondadas. A – Barbatana peitoral (16-18 raios), B – Barbatana dorsal (17-20 raios), C – Barbatana Anal, D – Cauda preênsil. (CITES 2010)

A4 – Estrutura interna

O cavalo-marinho tem os seus órgãos dispostos de maneira semelhante aos restantes peixes mas na vertical, para se adaptar ao seu formato de corpo que é bastante distinto dos restantes peixes (Figura 1-6).

Estes animais não possuem dentes nem estômago, isso deve-se ao facto de se alimentarem de presas de pequenas dimensões que são ingeridas sem mastigação. Possui os órgãos vitais como coração, brânquias, fígado, rins, intestino, bexiga gasosa e bexiga urinária. (Foster e Vicent.2004)

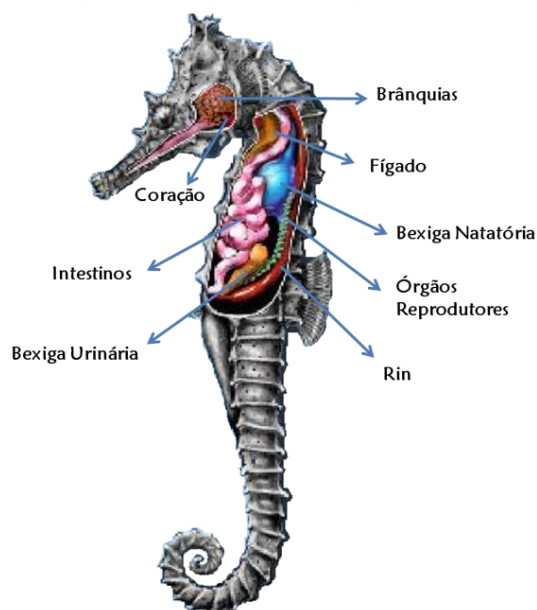


Figura 1-6: Esquema da estrutura interna de cavalo-marinho. (Fonte: <http://aquarium.ucsd.edu>)

A5 – Alimentação

Uma vez que estes indivíduos imitam a vegetação em cor, forma e comportamento reduzem a sua visibilidade tanto a predadores como às suas presas, são, então, predadores visuais de emboscada, mais activos durante o dia e entardecer, que se alimentam de presas vivas e com movimento. (Kitsos et al. 2007; Foster e Vicent.2004) Alimentam-se tanto de anfípodes, isópodes, decápodes, copépodes, misidáceos ou até algas; qualquer organismo pequeno suficiente para caber na sua boca.

Estes animais esperam até a presa se aproximar da boca (Curtis e Vincent. 2005) e dispõem de um focinho comprido que lhes permite um movimento rápido com expansão da cavidade bucal criando uma forte corrente inalante que efectua a sucção da presa em milésimos de segundo. (Fonte: [http:// theseahorsetrust.org/](http://theseahorsetrust.org/)) Eles são incapazes de mastigar o alimento, este é ingerido inteiro e tem de se ir desintegrando ao longo do tracto digestivo. (Wood, 2007)

A6 – Reprodução

A maioria das espécies de cavalo-marinho aparenta ser monogâmica. No caso de *H. guttulatus* a monogamia não é exclusiva (Vincent e Sadler, 1995), e pode ocorrer

poligamia devido a efeitos combinados de grandes densidades populacionais e alta taxa de deslocação. (Foster e Vicent.2004)

A reprodução desta espécie é muito peculiar e única no reino animal, é um método de extremo cuidado parental pelo macho. Entre Março e Outubro, a fêmea procura um macho de tamanho similar (CITES 2010; Foster e Vicent.2004) que já possua a sua bolsa incubadora preparada, uma vez que os machos não acasalados possuem a sua bolsa incubadora preparada mais rapidamente e por mais tempo do que as fêmeas têm os seus ovos preparados para a transferência. Esta deposita os ovos de uma só vez (numa dança de corte entre os dois) na bolsa incubadora do macho e termina a sua participação na reprodução.

Ciclo de Vida de *H. guttulatus* (Curtis e Vincent. 2006)

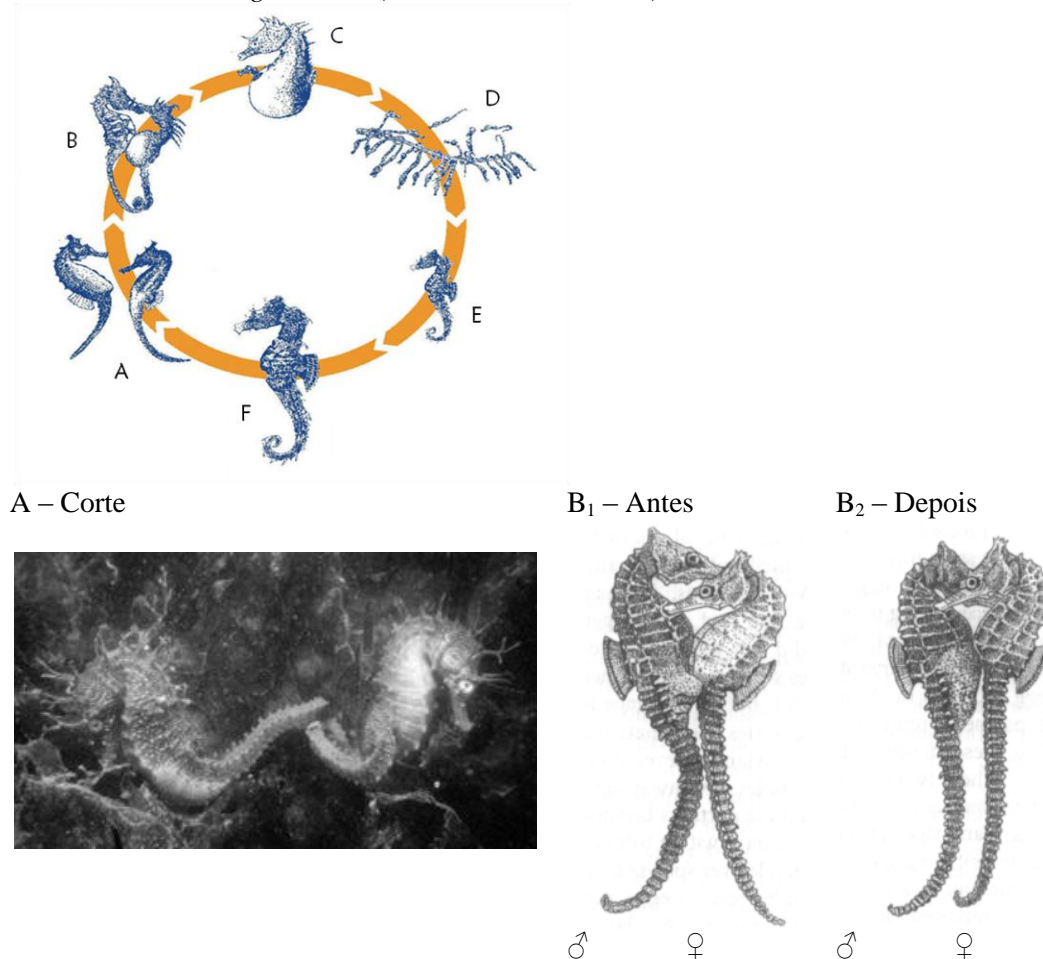


Figura 1-7: Representação de Ciclo de vida do cavalo-marinho. A – Adultos com as caudas entrelaçadas na corte, B – Macho e fêmea antes e depois da transferência dos ovos. Ambos mostram evidências visuais de ter acasalado. Antes, o torso da fêmea está distendido com os

ovos, mas côncavo após a transferência de ovos. A bolsa vazia do macho é achatada, mas incha como ele recebeu ovos da fêmea. C – Parto. D – Crias. E – Juvenil. F – Adulto

Inicia-se, assim, um cuidado uni-parental das crias, em que é o macho que carrega todos os ovos na sua bolsa incubadora que fertiliza assim que os recebe, garantindo a paternidade. Esta bolsa funciona como um útero de um mamífero (Foster e Vicent. 2004), onde os ovos são envolvidos por uma extensa rede capilar que constitui uma membrana. (Ripley e Foran. 2009) Neste meio envolvente ocorre uma eficaz oxigenação e fornecimento de nutrientes e até compostos anti-bacterianos para o desenvolvimento dos embriões. Os embriões começam por consumir todas as suas reservas vitelinas e só posteriormente consomem os recursos fornecidos pelo progenitor, assim têm um desenvolvimento e crescimento mais rápido.

Os ovos podem ter forma oval ou tipo-pêra e uma cor semi-transparente ou alaranjada; possuem um diâmetro de 0,9 a 2mm e eclodem após 9 a 45 dias na bolsa incubadora. As crias têm um tamanho médio de 12mm e a ninhada pode alcançar as 800 crias; do parto resultam crias já completamente formadas e com forma de adulto. Também pode ocorrer expulsão de ovos não fecundados ou embriões mal formados. (Planas et al. 2010)

O macho, após o parto, tem a capacidade de preparar a sua bolsa incubadora para uma próxima transferência de ovos, podendo ter repetidas gravidezes no mesmo período de reprodução. Os intervalos de gestação para os machos variam de 21 a 28 dias e de 24 a 44 dias para maturação dos ovos no caso das fêmeas. (Planas et al. 2010)

Na bolsa incubadora, as crias passam por período em que o macho tem a capacidade de alterar a osmolaridade (Wood, 2007), gradualmente, para que estas estejam adaptadas a água do mar quando nascem. Todo este cuidado pré-nascimento são como que preparativos para um início de vida independente, uma vez que após o parto não existe qualquer cuidado parental. Nesta espécie as crias não desenvolvem logo uma cauda com capacidade de se agarrar e passam por uma fase planctónica durante umas 6 a 8 semanas, antes de se poderem segurar ao substrato. Menos de um em mil sobrevive o tempo suficiente para se tornar um adulto. (Fonte: [http:// theseahorsetrust.org/](http://theseahorsetrust.org/))

B – Ameaças à espécie

Cavalos-marinhos são alvo de sobrepesca em toda a sua área de distribuição e devido à utilização para diferentes destinos/usos. Tanto são pescados acidentalmente ou com intenção, esta espécie é retirada do seu meio para utilizar seja em medicina tradicional, ou para comércio de espécies para aquarioria ou simplesmente para usar como “curios” (lembranças/curiosidades, sob a forma de jóias ou porta-chaves, sendo secos para guardar como recordação). (Fonte: <http://seahorse.fisheries.ubc.ca/>) Nenhuma destas formas de exploração de populações é quantificável o que se torna um problema para a identificação desta espécie como estando em risco de extinção, uma vez que não é conhecido o estado da população. (OSPAR 2009) Cavalos-marinhos são um caso clássico de conservação uma vez que pouco se conhece da sua biologia e população no seu habitat selvagem e porque são bastante explorados para comércio, particularmente na Ásia. A maioria da pesca acessória destes animais é utilizada para medicina chinesa e seus derivados, tais como medicina tradicional japonesa e coreana. Neste tipo de medicina (que é reconhecida pela Organização de Saúde Mundial como uma opção viável de cuidados de saúde/assistência médica) cavalos-marinhos são utilizados para tratar diferentes condições, tais como problemas respiratórios (ex. asma), disfunções sexuais e letargia e dores em geral. (IUCN 2010)



Figura 1-8: Cavalos-marinhos para venda, para uso em medicina tradicional ou como ‘lembrança’. (Fonte: <http://www.fishbase.org/>)

Estes têm poucos predadores naturais, tais como caranguejos, aves e peixes piscívoros; mas são as tempestades quem mais afecta as populações de cavalos-marinhos, uma vez

que os deixam à deriva, dispersos ou em habitats desfavoráveis; levando à morte tanto de juvenis como de adultos. (Scollick A)

H. guttulatus está muito vulnerável no seu próprio ambiente uma vez que devido á sua biologia está deveras condicionado na sua locomoção, alimentação, e como tal, na sua protecção contra predadores. Também o facto de se encontrar em zonas de menor profundidade deixa-os mais a mercê dos humanos e vítima das suas técnicas de pesca. (Vincent, 1996)

B1 – Acções de conservação

Todo o género *Hippocampus spp.* está listado no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna), de Maio 2004. Todas as espécies estão também representadas na IUCN Red List of Threatened Species, *H. guttulatus* tem o critério de Dados Insuficientes.

Hippocampus guttulatus está também presente nas Listas Vermelhas de Portugal e França, e é uma espécie protegida na Eslovénia pela Lei das Espécies Animais Ameaçadas no âmbito de Protecção de 1993. O Boletim Oficial de Estado de Espanha, de Fevereiro 2011, lista esta espécie como espécie selvagem em regime de protecção.

C – Aquacultura

A aquacultura tem sido usada com variados graus de sucesso para conservar as populações de peixes ameaçadas de extinção, e o seu uso continua a ser uma questão controversa no sector das pescas.

O cultivo de organismos ornamentais é visto como uma possível alternativa à captura de espécimes selvagens, o que minimizaria os impactos sobre suas populações naturais. (<http://fao.org/>) Além disso, ajudaria a sustentar a indústria de peixes ornamentais, já que alguns países, a exemplo das Bahamas, do Brasil e de alguns estados dos EUA, estabeleceram cotas de importação para estes organismos colhidos na natureza. (Tlusty. 2002)

O cultivo pode ajudar a sustentabilidade da indústria de peixes ornamentais, a restaurar o impacto em populações selvagens exploradas, e minimizar os conflitos de aplicação futura (HBOI, 2000; Scollick A.). Além disso, a crescente pressão de grupos ambientalistas e dos governos vão restringir o número de organismos selvagens, o que deixa a aquacultura como o único meio para satisfazer a demanda do mercado por estes produtos. (Anders. 1998)

Os indivíduos utilizados para este projecto – *Proyecto Hippocampus* – foram sendo recolhidos em amostragens desde 2006 nas rias baixas da Galiza, em diferentes pontos de amostragem. Os indivíduos que se encontram no laboratório (à data da realização deste trabalho) foram todos recolhidos no ano 2010, nas mesmas zonas de amostragem.

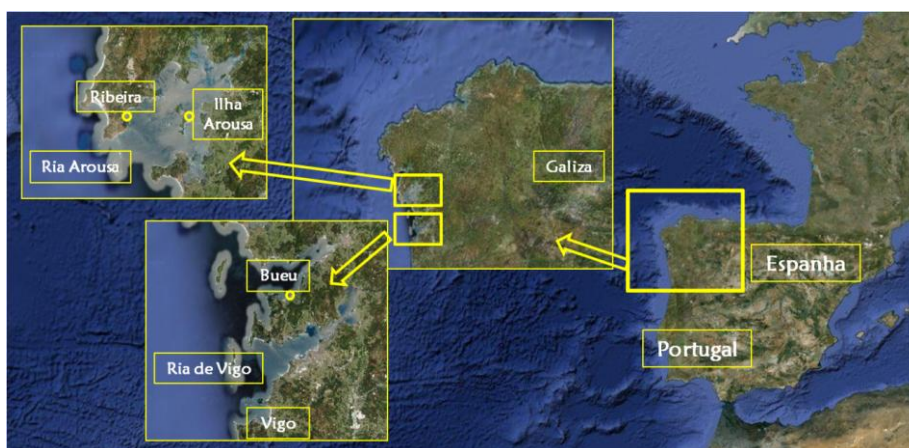


Figura 1-9: Imagem Google Maps das zonas de amostragem do Proyecto Hippocampus nas Rias Baixas da Galiza. Ilha Toralla – Vigo (N42°12'10,4'' W8°47'53,9''), Bueu (N42°19'54,0'' W8°46'38,7''), Ilha de Arousa (N42°34'20,0'' W8°53'04,3'') e Ribeira (N42°33'46,7'' W8°59'16,4'').

Em 2006 Planas, M., et al, (Planas et al. 2008) deram início a um processo de aperfeiçoamento da técnica de cultivo desta espécie, testando diferentes formas de circulação de água e de aquários, diferentes condições biológicas necessárias (temperatura, salinidade, etc.) e controlando as condições microbiológicas envolventes. O desenho de aquários foi objectivado ao fornecimento das melhores condições de acasalamento e reprodução da espécie em estudo, *H. guttulatus*.

C1 – Instalações

O laboratório do *Proyecto Hippocampus* está implementado no Grupo de Biologia e Fisiologia Larvar de Peixes (BFLP), no Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (IIM) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Espanhol, no departamento de Ecologia e Recursos Marinhos. O laboratório consiste num espaço com diferentes áreas: uma zona de reprodutores, uma zonas de cultivo de *Artémia*, *Palaemonetes varians* e copépodos, e uma área com aquários para uso separação de machos grávidos, e para experiências com crias.

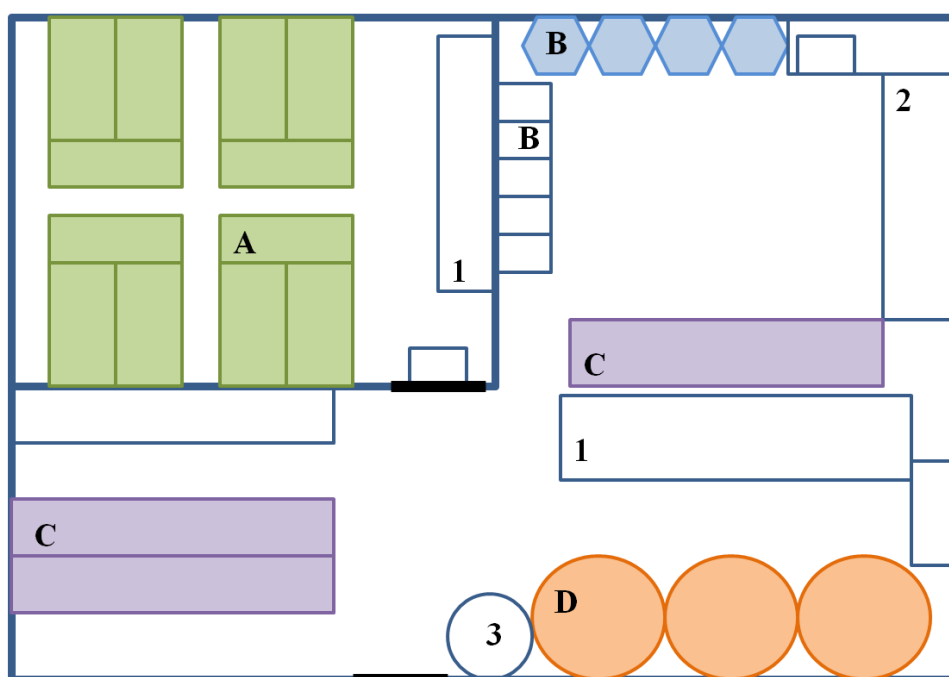


Figura 1-10: Planta simplificada das instalações do laboratório do IIM. A – Reprodutores, B – *Artemia sp.*, C – *Palaemonetes varians* e D – Copépodos. 1 – Zonas reservadas à preparação dos machos para efectuarem os partos e a experiências com as crias, 2 – Balcões de apoio e 3 – Depósito de amónio (NH_4^+).

C2 – Reprodutores

As instalações dos reprodutores consistem em 4 unidades com um sistema de funcionamento fechado e autónomo; numa base de aço inoxidável (Figura 1-11). Cada uma destas unidades com capacidade de 630L tem incorporado um sistema de filtração, uma unidade de arrefecimento com controlo electrónico de temperatura, bombas e os aquários na parte superior.

Em cada parte superior de cada unidade há 2 aquários, um de 160L (85 x 75 x 25) e outro de 312L (sendo este possível de transformar em 2 por meio de placas de acrílico, de 160L cada; e cada um destes em 3 sub-aquários de 53L) (Figura 1-12). A 25 cm acima dos aquários encontram-se a iluminação que consiste numa lâmpada Aquamedic com dois tubos T5 de 54W (10 000K), um do tipo Reef blue e outra Reef white.

Por cada aquário existe um sistema de segurança contra transbordo, que consiste em janelas de saída de água 2 cm acima da altura da água (estas mesmas são usadas diariamente para escoamento de água com gordura de superfície e como forma de rejeitar a artemia que tenha ficado da alimentação do dia anterior ao se fazer subir o nível da água).

As partes inferiores de cada unidade possuem o tratamento mecânico, químico e biológico da água que entra para os aquários; este consiste em bomba Venturi, um skimmer, um filtro mecânico (100µm) e, por fim, um biofiltro (biobolas). Há duas distintas bombas, PASQ B-30 e PASQ B-A26, que distribuem a água para os aquários de 315L e 160L respectivamente.

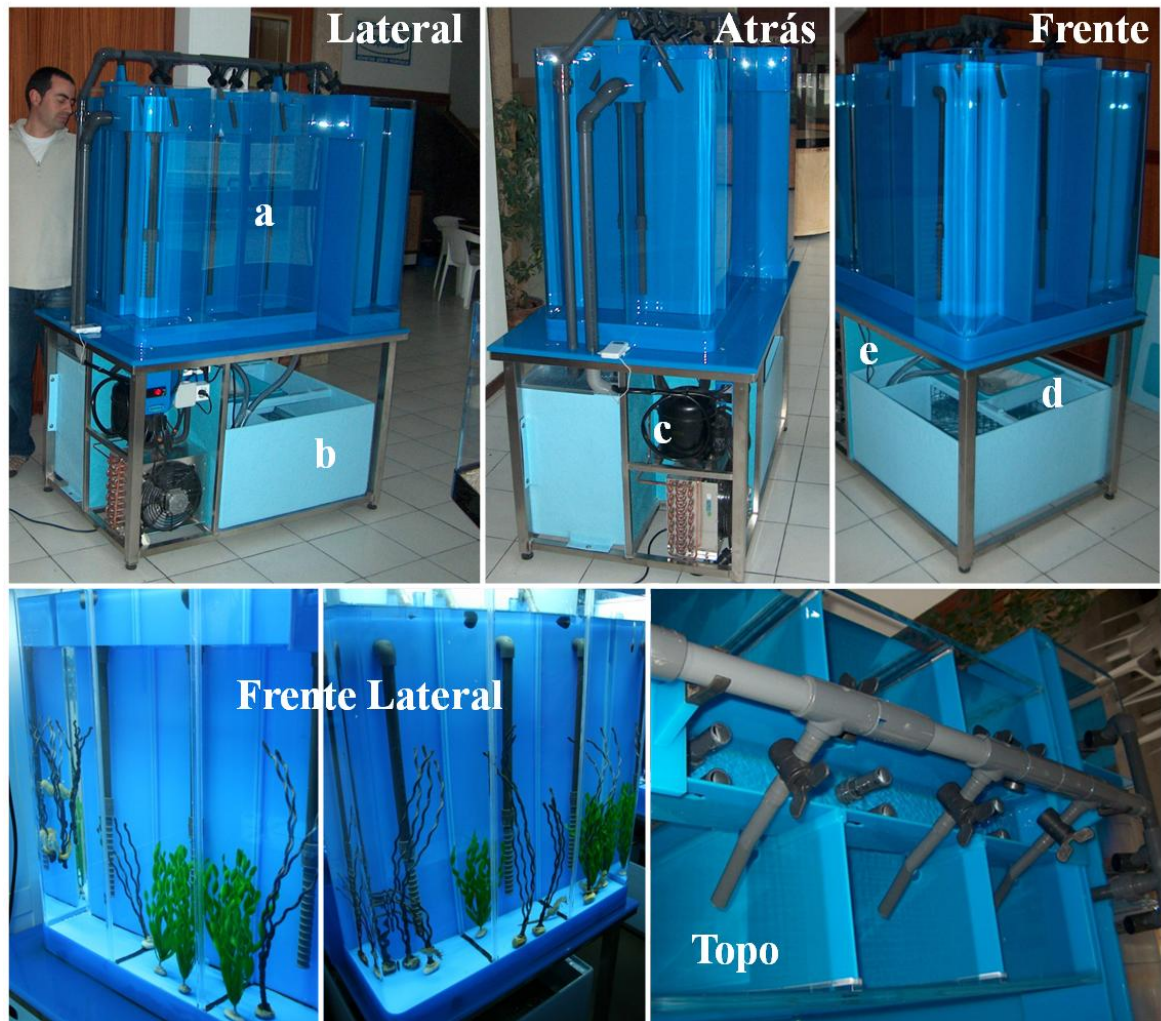


Figura 1-11: Unidade de reprodutores de cavalo-marinho, *Hippocampus guttulatus*. a) aquários, b) sistema de tratamento de água, c) unidade de arrefecimento, d) sistema de filtração, e e) bombas. (Fotos de: Miquel Planas)

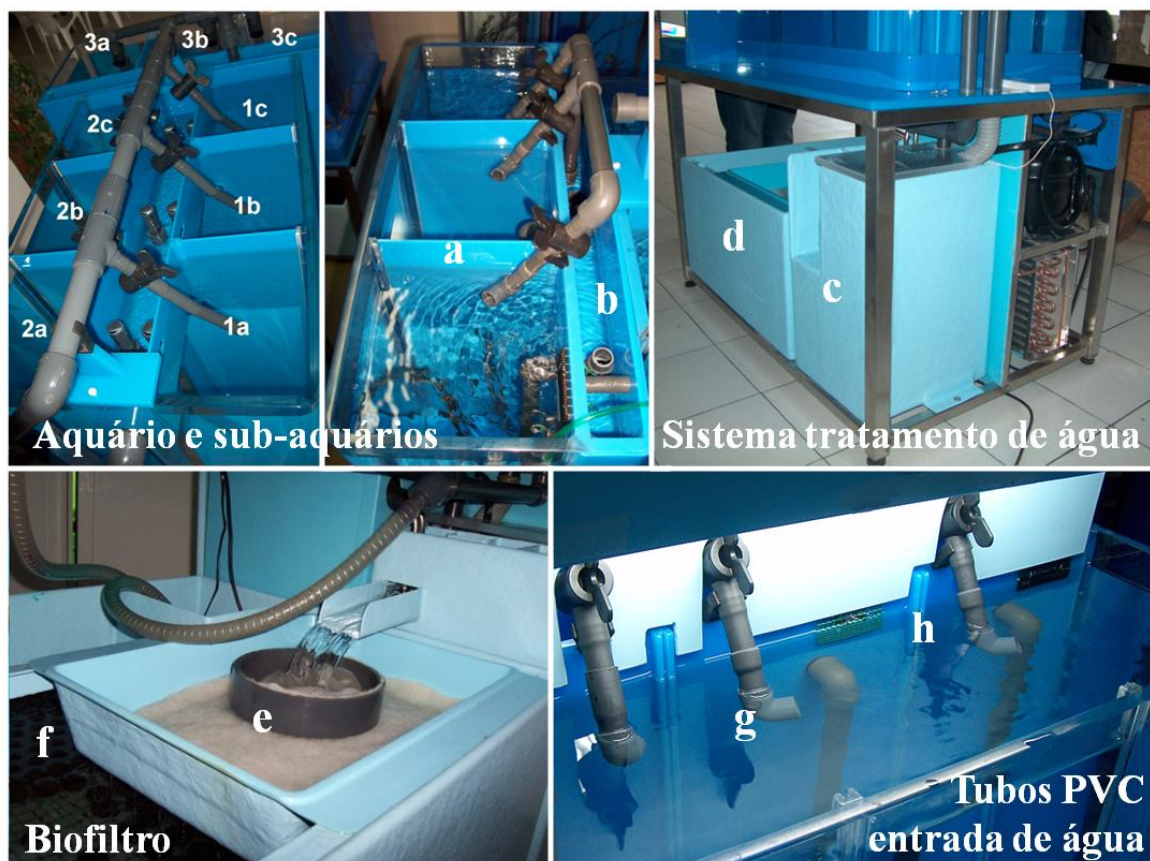


Figura 1-12: Detalhes da unidade de reprodutores, aquários e sub-aquários numerados. a) placas removíveis, b) sistema de recolha/saída de água, c) caixa com sistema Venturi, bombas, skimmer, controlador temperatura e arrefecimento, d) unidade de filtração, e) filtros mecânicos, f) biofiltro, g) sistema de entrada de água, e h) janelas de segurança. (Fotos de: Miquel Planas)

Tabela 1-2: Parâmetros gerais de água e aquários do laboratório do Proyecto Hippocampus.

Temperatura	15-16°C Inverno 18-19°C Verão
Fotoperíodo	Acompanhando fotoperíodo natural, com variação de: 15:30 Luz e 8:30 Noite em Junho – Julho 10h Luz e 14h Noite em Dezembro – Janeiro
Salinidade	37±2 ppt
pH	8.0±0,2
NO ₂ , NO ₃ e NH ₄ /NH ₃	0mg/L com o uso de Testes Kit Sera
Entrada água	3 x 5-6 L/min

Como meio de identificar cada indivíduo nos aquários usam-se marcas únicas em forma de colares que possuem um número de identificação que lhes foi conferido após captura.

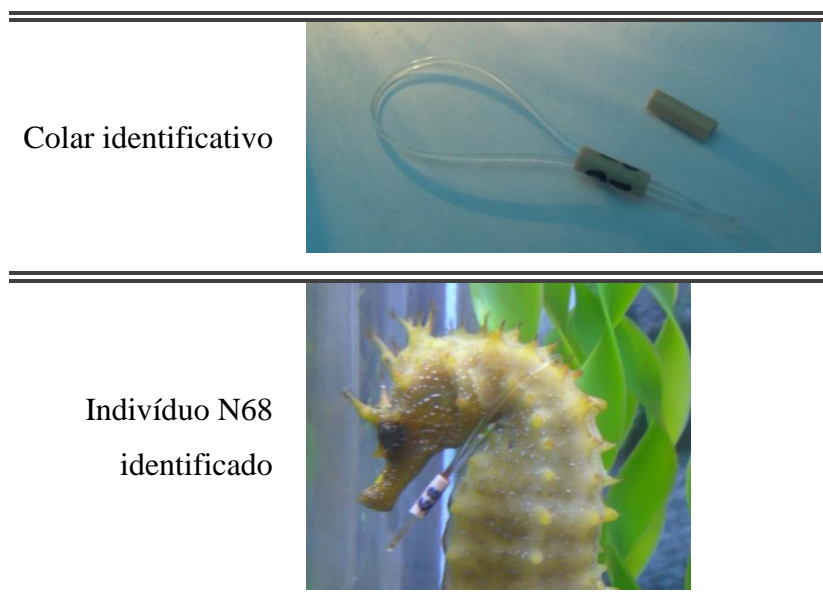


Figura 1-13: Colar identificativo de cavalos-marinhos. (Fotos de Tânia Ferreira)

C3 – Crias

As instalações destinadas a crias suportam um diverso conjunto de aquários. Existem aquários de 30L onde os machos são colocados em isolamento quando apresentam uma bolsa incubadora que aparente um estado de gravidez do animal e onde as crias são mantidas após o parto, e também aquários em forma rectangulares (10L) ou esféricos (7L) para se proceder a diferentes experiências.

Quando nasce uma nova ninhada, estas são contadas e recolhidas amostras para Genética, Bioquímica, Microbiologia e Isótopos Estáveis. As restantes crias têm diferentes fins: podem ser mantidas nos aquários ou ser usadas para diferentes experiências (seja de condições alimentares, ou fotoperíodo, ou de temperatura, ou formas e ainda de circulação de água dentro dos aquários). Se ocorre uma solta prematura de crias mal-formadas ou ovos não fecundados, estes são recolhidos e armazenados separadamente, para análises de Genética e Bioquímica.

Aquários de manutenção de crias

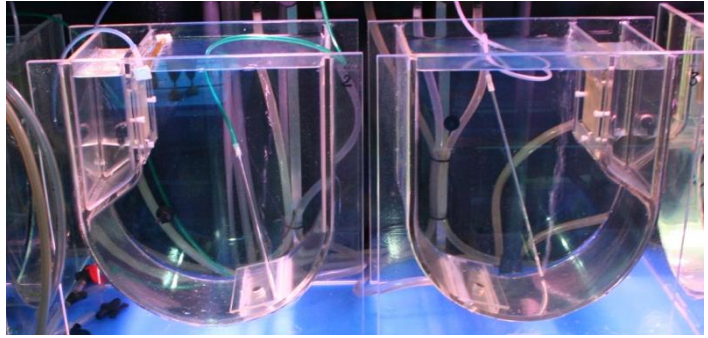
30L

Temperatura: 15-21°C

Fotoperíodo: 16L:8N

Arejamento

Caudal: 700mL/min



Aquários retangulares

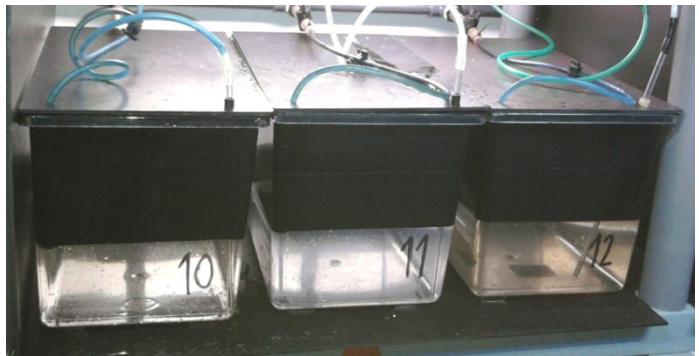
10L

Sistema montado para experiências de alimentação e fotoperíodo.

Temperatura: 17-18°C

Arejamento

Caudal: 300mL/min



Aquários esféricos

7L

Sistema montados para experiências de temperatura.

Fotoperíodo: 16L:8N

Arejamento

Caudal: 300mL/min



Figura 1-14: Apresentação e caracterização dos sistemas de aquários utilizados para crias. (Fotos de Tânia Ferreira)

C4 – Alimento

Tanto em um laboratório de investigação como numa fábrica de produção de peixe, para se poder manter animais vivos, é sempre necessário ter ao dispor e em abundância alimento vivo, sendo para isso necessário ter um cultivo auxiliar do alimento.

Para este trabalho foi necessário cultivar o alimento que é dado aos cavalos-marinhos, sejam *Artemia*, *Palaemonetes sp.* ou Copépodes.

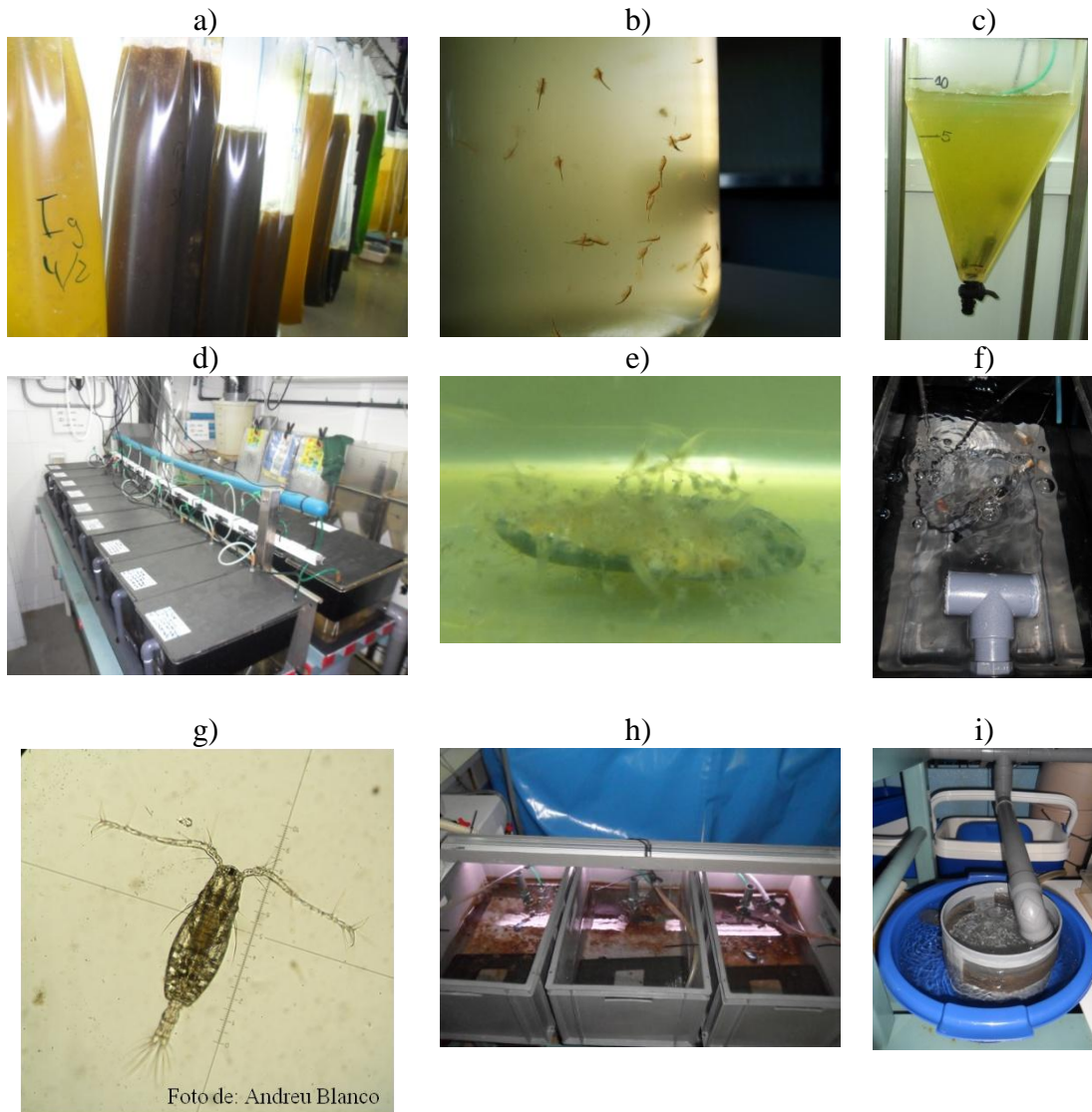


Figura 1-15: Seleção de imagens de estruturas cruciais ao cultivo de cavalos marinhos. a) Mangas de microalgas; b) *Artemia* adulta; c) Prisma de enriquecimento de *Artemia*; d) Aquário de crias de *Palaemonetes*; e) Disposição dos aquários de Larvas de *Palaemonetes*; f) Larvas de palaemonetes a alimentar-se de mexilhão; g) nauplio de Copépode Calanóide (vista á lupa); h) Aquários de adultos de *Palaemonetes*; i) Sistema de recolha de larvas *Palaemonetes* no desagúe dos aquários de adultos. (Fotos de Tânia Ferreira)

Outro tipo de alimento introduzido na dieta dos cavalos-marinhos são os misidáceos, para os quais não se efectua o cultivo, apenas se capturam os indivíduos no meio natural e são então mantidos nas instalações, com arejamento e trocas de água frequentes.

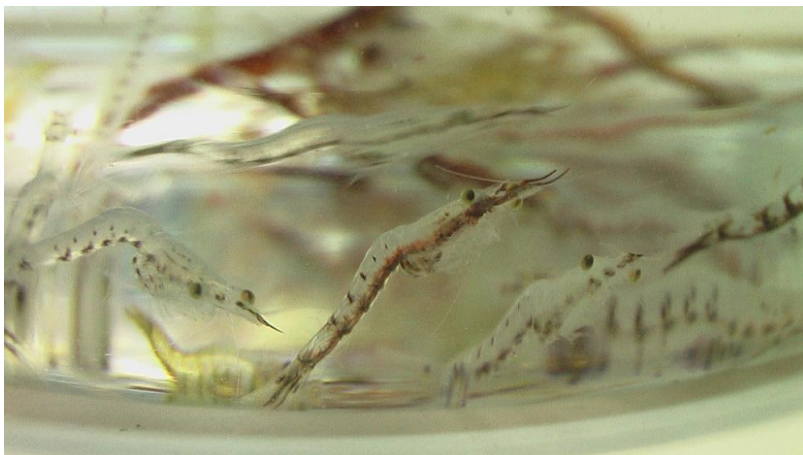


Figura 1-16: Misidáceos. (Foto de: Alex Chamorro)

Plano de alimentação de Adultos:

Alimentados duas vezes ao dia, de manhã (9:30-10:30) e á tarde (16h-18h), com um de três tipos de dietas implementadas:

- 50-75 Artemia (de 15 a 21 dias, comprimento > 5,5 mm) p/ indivíduo, ou;
- Palaemonetes *ad libitum* (6-10 Palaem/Indivíduo) ou;
- Misidáceos *ad libitum* (10-20 Misidáceos/Indivíduo).

Plano de alimentação de Crias:

Dia 0: não se fornece qualquer tipo de alimento (jejum)

Dia 1 a 5: 1 copépode/mL

Dia 6 a 7: 0,5 copépodes/mL + 0,5 metanuplios de 24h/mL

Dia 8 a 15: 1 metanúplio 24h/mL enriquecido com Algamac

A partir de dia 16: 1 metanúplio 48h/mL enriquecido com Algamac

(este plano alimentar varia consoante as experiências a que as crias eram sujeitas)

D – Isótopos Estáveis

Isótopos estáveis fornecem alguns dos poucos registos sobre a vida na Terra e da ecologia no início do nosso planeta. Estes isótopos não e deterioram e, ao contrário dos isótopos radioactivos, não são prejudiciais à saúde humana. (Fry. 2006)

A palavra ‘isótopo’ vem do Grego *isos* = igual e *topos* = lugar, o que se refere a uma posição comum na Tabela Periódica de um elemento específico; onde um isótopo

possui o mesmo número de prótons (Z) e número diferente de neutrões (N). ex: ^1_1H ^2_1H ^3_1H ; $^{12}_6\text{C}$ $^{13}_6\text{C}$ $^{14}_6\text{C}$; $^{13}_7\text{N}$ $^{14}_7\text{N}$ $^{15}_7\text{N}$ (Figura 1-17). (Dawson e Brooks. 2001; Pereira. 2007; Fonte: <http://serc.carleton.edu/>)

Se um átomo é constituído por um núcleo de Z e N rodeado por electrões (e^-), e se o núcleo constitui a massa do átomo; então a massa atómica do átomo será a soma de Z + N no núcleo.

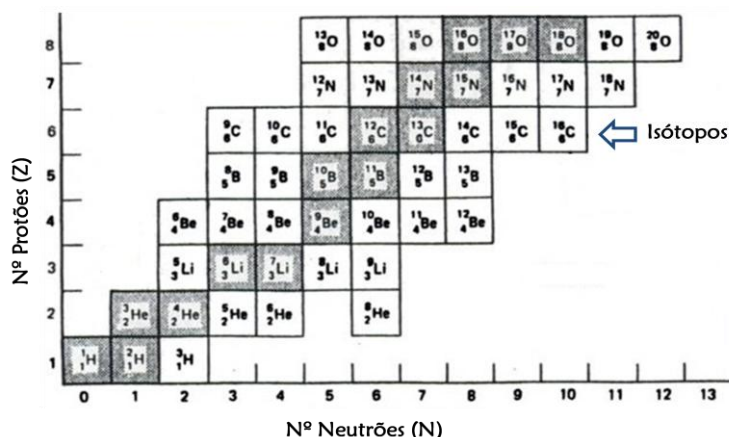


Figura 1-17: Tabela periódica parcial dos isótopos estáveis e instáveis. (Dawson e Brooks. 2001)

Os isótopos estáveis de variados elementos são formados por um isótopo dominante (ex: ^{12}C - Carbono, ^{14}N - Azoto, ^{16}O - Oxigénio, ^{32}S - Enxofre, e ^1H - Hidrogénio), e um ou dois isótopos mais pesados (ex: ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S e ^2H) com uma abundância natural menor. São estes isótopos de baixa abundância que incitam a novas oportunidades para o uso de isótopos como traçadores em estudos bioquímicos, biológicos e ambientais. Os átomos instáveis, radioactivos, possuem um núcleo que decai emitindo radiação sob a forma de partículas ou ondas electromagnéticas; estes têm um tempo de vida bastante inferior aos átomos estáveis. (Pereira. 2007)

Isótopos são medidos utilizando a escala delta δ , esta exprime-se em ‰, *per mil*, do latim *per mille*, que é o desvio das razões isotópicas relativas a uma substância de referência ou a um padrão. Correspondente a uma equação:

$$\delta X = [R_s/R_r - 1] \times 10000$$

Na qual: R – razão isotópica entre isótopo estável mais pesado e mais leve; s – razão isotópica da amostra e r – razão isotópica da referência ou padrão. (Ferreira. 2008)

Para obter um valor de δ (‰) das amostras é necessário utilizar padrões para se poder comparar os resultados, esses padrões têm por definição um valor de δ 0‰. Valores negativos de δ indicam que a amostra tem uma razão isotópica menor que a do padrão.

Tabela 1-3: Abundância Relativa e padrão aceite internacionalmente para os principais isótopos usados em estudo. PDB – *Pee Dee Belemnite*, um fóssil de *Belemnitella americana* da formação Peedee, da Carolina do Sul, EUA, S.C.; N₂atm – azoto atmosférico) (Dawson e Brooks, 2001)

Elemento	Isótopo	Notação	Abundância Relativa (‰)	Padrão
Carbono (C)	¹² C	$\delta^{13}\text{C}$	98,892	PDB
	¹³ C		1,108	
Azoto (N)	¹⁴ N	$\delta^{15}\text{N}$	99,635	N ₂ atm
	¹⁵ N		0,365	

D1 – Razão de isótopos estáveis na dieta

Em estudos ecológicos, o uso de isótopos estáveis de Carbono e Azoto é comum para delinear cadeias alimentares. De facto, a dieta é a principal determinante da composição isotópica nos animais. A relação predador/presa é bastante estudada em laboratório para efectuar testes de preferência de alimentação, mas conseguir uma amostra de presa pode ser difícil e estudos em laboratório produzem mais erros na relação das espécies, assim sendo os isótopos são a alternativa e a melhor ferramenta para análise de teias alimentares em sistemas marinhos; mas a assinatura isotópica numa cadeia alimentar em ambiente marinho pode ser altamente variável. (Manette e Benedito-Cecilio, 2003; Martinelli et al. 1992)

Jardine et al. (2003), efectuaram estudos em que usam $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ como marcadores naturais com o pressuposto de que os mesmos se distribuem de forma homogénea em todos os tecidos (devido ao *turnover* metabólico), proporcionando-se assim elaborar uma história de vida do indivíduo. Existe um processo de discriminação isotópica que é chamado de fraccionamento isotópico, o qual pode ser resumido como um enriquecimento ou empobrecimento do isótopo pesado da amostra em estudo em relação a sua fonte. (Pereira, 2007)

É aceite que conteúdo de $\delta^{13}\text{C}$ no organismo reflecte o conteúdo de $\delta^{13}\text{C}$ na sua dieta com pequenas (1‰) ou sem alterações. Este enriquecimento em ^{13}C no consumidor acontece devido á respiração por CO_2 ; os rácios de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de plantas terrestres tipo C4 e C3 são diferentes devidos aos diferentes caminhos usados para a fotossíntese e fontes de carbono utilizadas. ^{13}C é muito utilizado em estudos ambientais, ecológicos e de cadeias tróficas de humanos e animais, uma vez que reflecte a quantidade de hidratos de carbono e de lípidos. (Fry. 2006) Organismos com as mesmas fontes de alimento e mesmas proporções têm um valor isotópico mais idêntico.

O conteúdo de $\delta^{15}\text{N}$ de um organismo mostra um maior enriquecimento no consumidor relativamente à presa, numa média de 3-4‰; isto é devido a processos de excreção de ^{15}N ; sendo excelente indicador de posição trófica. (Jardine et al. 2003) Isótopos de azoto oferecem um forte sinal do nível trófico em que se encontra o indivíduo num certo período de tempo, porque é um valor influenciado pela fonte do alimento, da proteína ingerida.

São necessários cerca de três meses para que se detecte a composição isotópica da nova presa no tecido do consumidor. (Jardine et al. 2003) Os resultados baseiam-se na determinação da proporção $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ sendo detectado pelo espectrómetro de massa. Essas diferenças isotópicas ocorrem na natureza e são fruto de reacções físicas, químicas e/ou biológicas que promovem a discriminação de um dos isótopos (Martinelli et al., 1988). Ao processo de discriminação dá-se o nome de fraccionamento, que pode ser resumido como um enriquecimento ou depleccionamento do isótopo.

D2 – Espectroscopia de Massa de Razão Isotópica

Os isótopos estáveis medem-se consoante o uso de um espectrómetro de massa de razões isotópicas (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry) que foi inventado por J. J. Thompson em 1910. Medições de isótopos são medidas químicas que permitem visualização detalhadas do ciclo de um elemento em todos os sistemas de interesse ecológico. (Fry. 2006; Tood et al. 1997)

As variações de peso atômico de determinados elementos, não lhes afectam as propriedades físicas ou químicas, mas permite a sua identificação por IRMS, tal como todas as substâncias que têm uma assinatura única. (Rahn e Wahlen. 2002)

A espectroscopia de massa (MS – Mass Spectroscopy) é uma técnica bastante utilizada para análises de moléculas (pequenas ou de tamanho médio), é um método tão sensível que já é usado habitualmente em análises de substâncias com concentração baixa, como *doping*, contaminação ambiental, etc. (Conalco et al. 2002; Michener e Latha. 2007) Também já é possível aplicar esta técnica a macromoléculas assim que se conseguiu levar estas à forma de gás ionizado. Em muitas aplicações a preparação da amostra é um aspecto importante, e muitas vezes a espectrometria de massa é mais precisa do que a reprodutibilidade da preparação da amostra. Os espectrómetros de massas com fonte de gás são os instrumentos utilizados para medir razões como: H/D, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. (Conalco et al. 2002)

Após devido tratamento das amostras recolhidas (liofilização e pesagem) e até se encontrarem em cápsulas de estanho na caixa respectiva, estas amostras são então incorporadas no sistema que automaticamente dá início ao processo de análise.

O Espectrómetro de Massa de Razão Isotópica é dividido em cinco zonas de acção: Admissão da Amostra, Ionização, Acelerador de Iões, Campo Magnético (Deflexão) e Detector (Figura: 18). (Filho e Marchini. 2004; Souza. 2008)

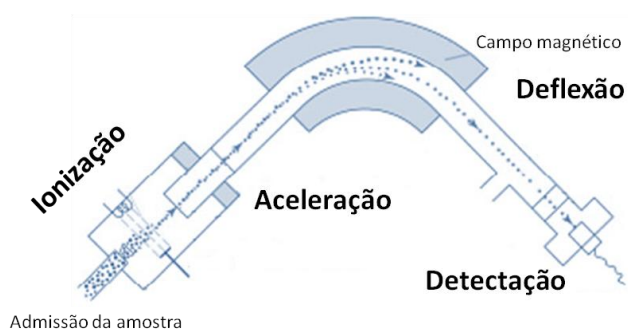


Figura 1-18: Esquema simplificado do Espectrómetro de Massa de Razão Isotópica.

As amostras são submetidas a altas temperaturas no tubo de combustão, e uma vez na presença de Oxigénio (O_2) e Óxido de Cobre (CuO) são transformadas em compostos de Carbono e Nitrogénio, como o CO_2 e NO_x . A amostra de gás é introduzida a baixa

pressão na 1ª parte do IRMS – Câmara de Ionização – onde as moléculas do gás são bombardeadas num feixe de electrões emitidos através de um filamento aquecido, produzindo iões gasosos positivos. A ionização (Figura 1-19) é a conversão de um átomo em ião, com adição ou remoção de partículas carregadas, tal como mostra a Figura 19; que consiste na produção de um ião com electrões desemparelhados, um ião radical, que após a fragmentação resulta em fragmentos iónicos formados da molécula original. (Ferreira. 2008)

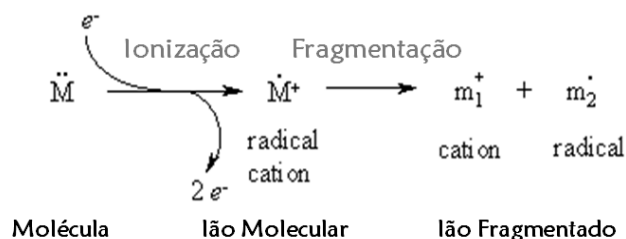


Figura 1-19: Fragmentação de iões.

Estes iões positivos são conduzidos ao campo electrostático formado por placas aceleradoras de carga negativa, e assim são repelidos da câmara de ionização pela placa positiva; este processo acelera os iões de diferentes massas às suas velocidades finais. O percurso destes iões atravessa um campo magnético, que sendo perpendicular à direcção do seu movimento, altera a mesma. A deflexão (Figura 1-20) desta trajectória depende do ratio massa/carga (m/z) do ião, da sua energia e da intensidade do campo magnético.

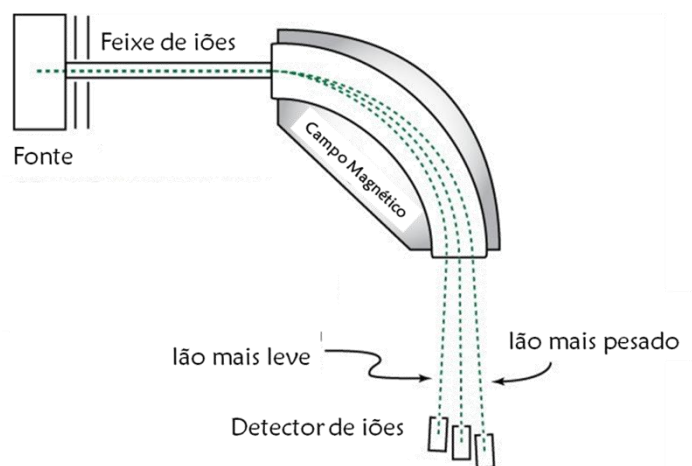


Figura 1-20: Representação da deflexão da trajectória dos iões

É possível, então, focalizar o feixe de iões num colector/detector, tanto pela variação da intensidade do campo magnético como pela variação da tensão de aceleração dos iões. (Figura 1-21) Este detector regista a abundância relativa de cada tipo de ião, e assim,

quando comparando como padrão, se determina a composição do elemento químico da amostra original e a composição isotópica dos constituintes.

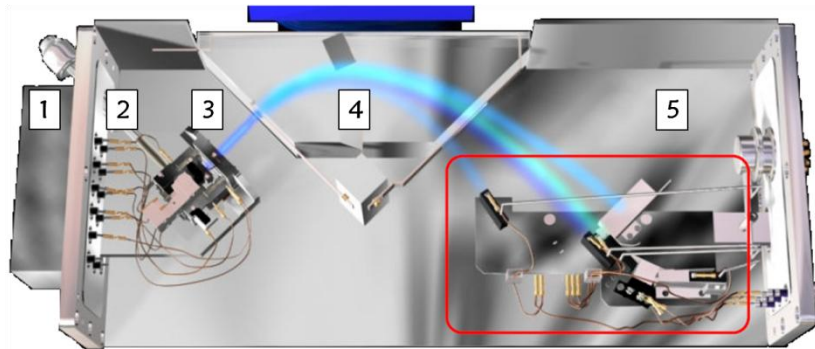


Figura 1-21: Trajecto do feixe de íons num sistema de IRMS. 1 – Admissão de amostras; 2 – Fonte de íons; 3 – Acelerador de íons; 4 – Campo magnético e 5 – Detector de íons. (Ferreira. 2008)

D4 – Padrões utilizados no IRMS

Dependendo dos resultados que se queiram obter e dos elementos que se estejam a analisar usamos diferentes padrões. Os materiais de referência utilizados para carbono e azoto são a *Belemnitella americana* da formação Peedee e o azoto atmosférico, respectivamente. Para calibrar o sistema foram utilizados como padrões a sacarose, o polietileno e o sulfato de amónio. (Bier. 1997; Ferreira. 2008)

2. Revisão de Literatura

A - Kelly M.H. e Hagar W.G. 2006. Nonlethal sampling of sunfish sculpin for stable isotope analysis: how scale and fin tissue compare with muscle tissue. North American Journal of Fisheries Management 26: 921-925.

Kelly et al. 2006, levaram a cabo uma experiência sobre amostragem não letal para comparação de dados obtidos a partir de músculo com tecido de barbatana e de escama.

Na maioria dos estudos de isótopos estáveis para conhecimento da sua dieta os tecidos utilizados mais comuns implicam o sacrifício do animal. Em estudos de conservação seria mais apropriado poder utilizar uma forma de amostragem não letal, especialmente quando se trata de espécies sob um estado de conservação como o caso dos cavalos-marinhos.

Normalmente os tecidos utilizados para análise de isótopos são músculo, fígado, coração ou gónadas, que pressupõem a morte do animal; ao se pretender uma amostra não letal utilizam-se amostras de escamas ou barbatana.

No caso de conservação animal é essencial adaptar uma forma de amostragem que evite sacrificar o animal e que este não fique lesado para que não interfira com a sua vida normal no seu *habitat*, uma vez que será uma técnica de amostragem que se aplicará tanto a indivíduos selvagens como aos indivíduos em cultivo.

A técnica de corte em barbatana (*fin-clipping*) tem sido bastante indicada para amostragem de peixes para uso em estudos de isótopos nos últimos anos.

Para o estudo com cavalos-marinhos, há a limitação da amostra, por disponibilidade de tecido para tal é necessário avaliar o método e garantir a sua viabilidade com diferentes tamanhos de barbatana dorsal.

B – Valladares S. e Planas M. 2010. Assessment of fin tissue use for stable isotopes analyses in seahorses. Apresentado em Aquaculture Europe 2010 Porto (Portugal).

Também Valladares, S. e Planas, M. (2010) levaram a cabo uma experiência sobre a percentagem de biomassa de barbatana dorsal, para determinar a mínima quantidade necessária para obter valores de isótopos estáveis ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$).

Utilizaram indivíduos que morreram nas instalações do Instituto de Investigações Marinhas de Vigo (IIM) após 20-46 meses em cativeiro. Removeram toda a barbatana dorsal dos animais (n=6) e cortaram-na em três secções com diferentes tamanhos (da menor para a maior: DF1, DF2 e DF3) (figura seguinte). Das diferentes secções foi medida a superfície a partir de fotografia digital, utilizando o software de processamento de imagem (NIS, Nikon).

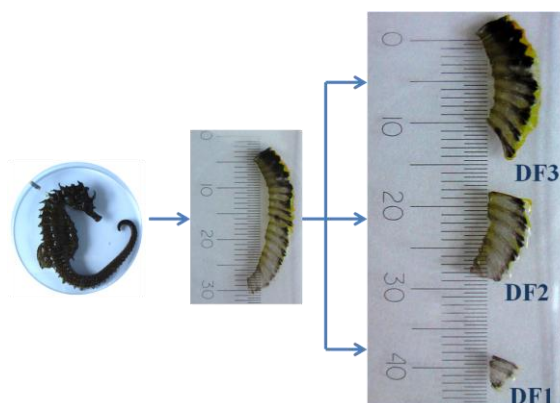


Figura 2-1: Dimensão de corte da barbatana dorsal para efeitos de comparação de biomassa utilizada para análise isotópica.

O tamanho médio das secções (mm^2) amostradas foi de $19,99 \pm 9,10$ (DF1), $64,63 \pm 16,15$ (DF2) e $94,50 \pm 20,73$ (DF3); com um tamanho mínimo de $12,74 \text{ mm}^2$ (DF1) e um máximo de $119,29 \text{ mm}^2$ (DF3). Estas secções correspondem a 0,21 mg e 2,15 mg de peso seco, respectivamente.

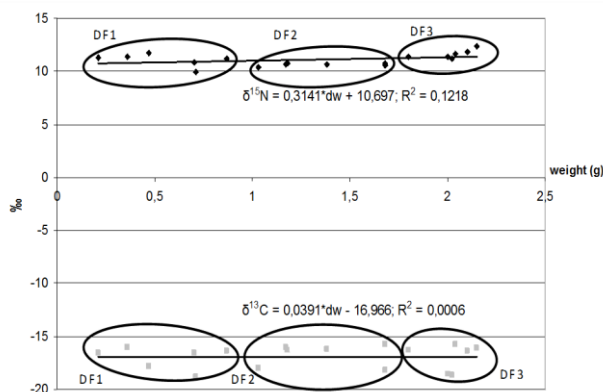


Figura 2-2: Relação entre peso de barbatana (g) e valores $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ em *H. Guttulatus*. DF1: porção pequena, DF2: porção média, DF3: porção grande.

Após feita a análise de isótopos estáveis foi demonstrado que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$ foram homogêneos em todas as secções; sendo portanto a assinatura de isótopos estáveis independente do tamanho da secção analisada.

Está comprovado que uma amostra única de barbatana dorsal para análise de isótopos estáveis de 0,21mg de peso seco requer apenas 12,74 mm² da barbatana dorsal da *H. guttulatus*, o que corresponde a 8,66% da superfície total.

Concluindo que este processo de amostragem é, então, aconselhável para a análise isotópica em cavalos-marinhos devido á sua capacidade de regeneração da barbatana dorsal (em apenas cerca de 2 meses); não sendo necessário utilizar um método letal para efectuar a mesma análise.

3. Material e Métodos

A – Desenho de experiências no laboratório

A1 - Crias

A experiência foi desenhada de modo a ter meios comparativos de alimento. Onde foram fornecidos três tipos de alimento: Artémia e Copepodes, sendo estes Calanóides (*A. tonsa*) e Harpacticóides (*Tisbe* spp).

O número inicial de indivíduos recém-nascidos, no laboratório de um macho mantido em cultivo, foi de 467 crias, ao dia 0 de cultivos foram retirados 15 indivíduos para amostragem de Bioquímica, Genética e Isótopos Estáveis. 300 crias foram divididas por 6 aquários de 10L (50 crias / aquário). Os tratamentos de alimentação foram efectuados em duplicado, tanto Artémia, como Calanóides e Harpacticóides. As restantes crias foram deixadas num 7º aquário para efectuar o jejum, sendo este o controlo negativo.

Amostragem para isótopos estáveis: 2 crias de cada aquário ao dia 0, 5, 15 e 30 (um total de 4 crias por alimento). Apenas até ao dia 5 foi possível recolher crias do aquário em jejum pois estas morreram após a data.

Plano de Alimentação:

Artémia – 10 000 nauplios/L.

Copépodes (Calanoides e Harpacticoides) – dia 1 a 5: 2 copépodes / mL; dia 6 a 7: 1 copépede / mL + 5 000 Artémia; após dia 8: 10 000 Artémia/L.

Tabela 3-1: Parâmetros dos aquários da experiência.

Caudal:	300mL/min
Fotoperíodo:	16h luz / 8h noite
Temperatura:	
Aquários de 10 L	
24h de jejum	
Primeiros 5 dias sem arejamento	

B – Mergulho

Um mergulho deve ser programado segundo as condições meteorológicas, no local pretendido seguindo todas as condições de segurança necessárias. Na procura de cavalos-marinhos em mergulho devemos efectuar um mergulho paciente, próximo do fundo e com muita concentração no que se pretende encontrar; deve explorar-se todas as formas existentes entre algas e rochas uma vez que estes indivíduos possuem um bom sistema de camuflagem e passam completamente despercebidos no fundo do mar.

Ao encontrar um indivíduo é necessário colocá-lo num saco de plástico com água e fecha-lo com um elástico. Coloca-se no local uma bóia numerada, com um longo cordão que alcance a superfície e que esteja fixo a algo no fundo (alga, rocha, etc.) e posteriormente, desde a superfície, marca-se a posição GPS.

Após esta captura há que determinar o destino do animal. Este pode ser devolvido ao meio selvagem ou ser levado para as instalações do laboratório.

- Se a decisão é deixá-lo no meio selvagem, este é apenas devolvido ao mar no local respectivo, identificado pela bóia deixada no local, depois de recolhidos os dados necessários;
- Se a decisão é levá-lo para o laboratório há que retirar a bóia da água, após recolha de posição GPS, e seguir-se com acondicionamento numa geleira. No laboratório, após amostragem e recolha de dados, este animal pode ter dois destinos: ficar nos aquários e fazer parte do stock de reprodutores, ou ficar pontualmente nas instalações para uma amostragem de fezes (que consiste em manter o animal 2 dias em jejum num aquário em separado e recolher todas as fezes de acordo com o protocolo de recolha de fezes. Ai então devolve-se o animal ao meio selvagem mediante uma aclimatização / adaptação progressiva á água do mar.

Em ambos os casos deve proceder-se á marcação do animal que passa por: reconhecer marca VIFE, se já a possui; efectuar marcação VIFE, se é um indivíduo novo; pesar; tirar foto; colher amostras de Barbatana dorsal para Isótopos (a seco a -20°C), cirro para genética (em álcool 95^a a -80°C) e fezes para identificação e isótopos (a seco a -20°C) e por fim preencher uma ficha detalhada correspondente ao mergulho e capturas.

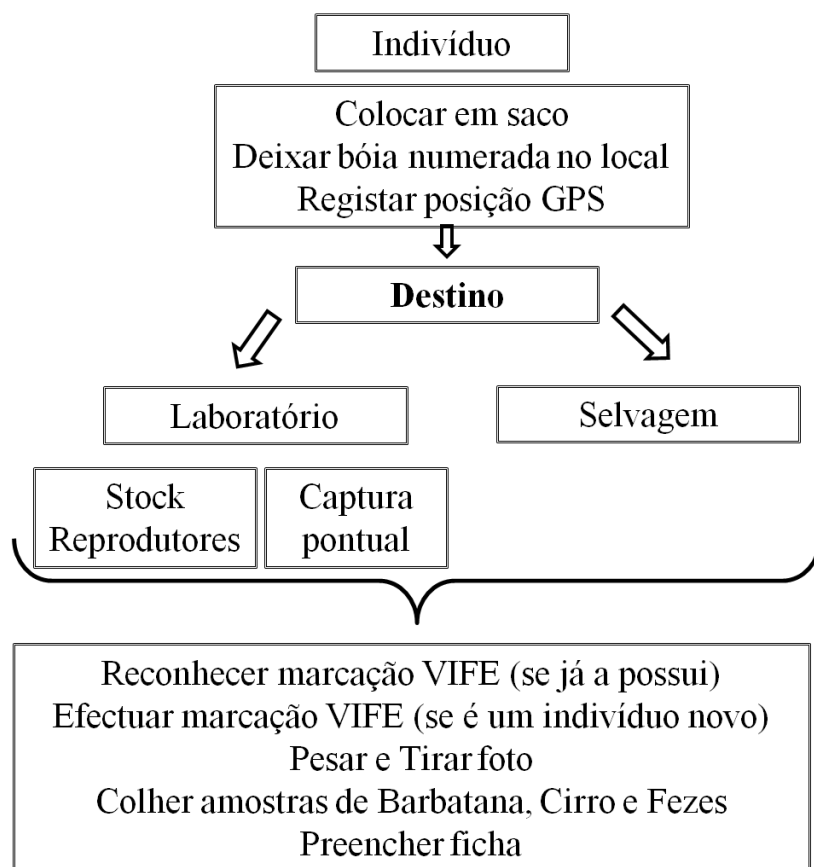


Figura 3-1: Apresentação esquemática da preparação de indivíduos num mergulho.

B1 – VIFE – Implante Fluorescente Visível

Para identificar os indivíduos no meio selvagem coloca-se-lhes um implante injectável de um polímero florescente. Este é um liquido injectável que quando misturado com um agente de tratamento endurece sob a pele deixando uma marca permanente e biocompatível. Está provada uma retenção/ permanência de 1 ano para esta espécie (Morgan e Bull. 2005), mas após o primeiro mês já se torna mais difícil distingui a cor da marcação efectuada. Este VIFE é visível com um LED de luz azul. (Woods e Martin.Smith. 2004)

A marcação deve ser efectuada num tecido claro ou translúcido (como por cima do olho, no caso dos salmonídeos). Nesta espécie colocamos a marca entre a pele e a placa óssea que lhe cobre o corpo, na cauda.

A marcação VIFE

Vantagens

- Elevadas taxas de retenção;
- Pode ser aplicado a peixes de pequenas dimensões e outros animais;
- Impacto mínimo na sobrevivência, crescimento e comportamento do peixe;
- Baixo custo de material torna possível a sua utilização em projectos em pequena escala;
- Rápida aplicação;
- Marcas são detectáveis visualmente e com luz ambiente;
- A sua detecção pode ser melhorada com uma iluminação adequada;
- Técnica bem estabelecida, com vasta literatura sobre aplicações de sucesso em centenas de espécies de peixes, anfíbios, crustáceos e outros animais.

Limitações

- Limitada capacidade de codificação (que pode ser aumentada com o uso de várias cores em diferentes partes do corpo e aumento do próprio número de marcas);
- A marca pode tornar-se difícil de detectar a luz ambiente se o crescimento for muito acentuado e a pigmentação dos tecidos ocorrer no local da marca, embora possa ser detectada com luz UV;
- As marcas podem não ser vistas e relatadas por observadores casuais.

(Morgan e Bull. 2005)

Materiais do KIT

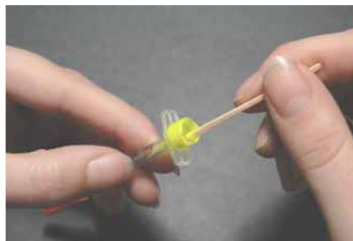
Diferentes cores
Fluorescentes e não fluorescentes



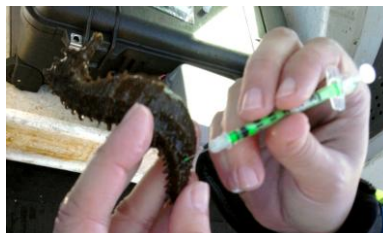
Material de mistura
Material de uso único e descartável
Seringa, Espátula e Doseador



A mistura *in situ* dos compostos
permite sarar em apenas algumas horas



Injecção do VIFE no indivíduo
(Fotos de Tânia Ferreira)



Marca VIFE em indivíduo a libertar
(Fotos de Tânia Ferreira)



Figura 3-2: Material e procedimentos para uso do Kit VIFE. (VIE Project Manual. 2008)

Para efectuar a marcação usamos uma combinação entre os raios corporais (a contar depois do último raio da barbatana dorsal) e os lados corporais (direita e esquerda). Usando os segmentos laterais da cauda, possuímos um maior número de combinações para marcar indivíduos sem repetir a identificação.

C – Produção/mantimento do Alimento nas instalações

Para manter um cultivo cavalos-marinhos é crucial manter, paralelamente, o cultivo de toda a base alimentar. Todo este processo é bastante exigente e requer um esforço de cultivo auxiliar de todo o tipo de alimento vivo oferecido e do enriquecimento necessário para melhorar as suas qualidades nutricionais.

C1 – *Artémia salina*

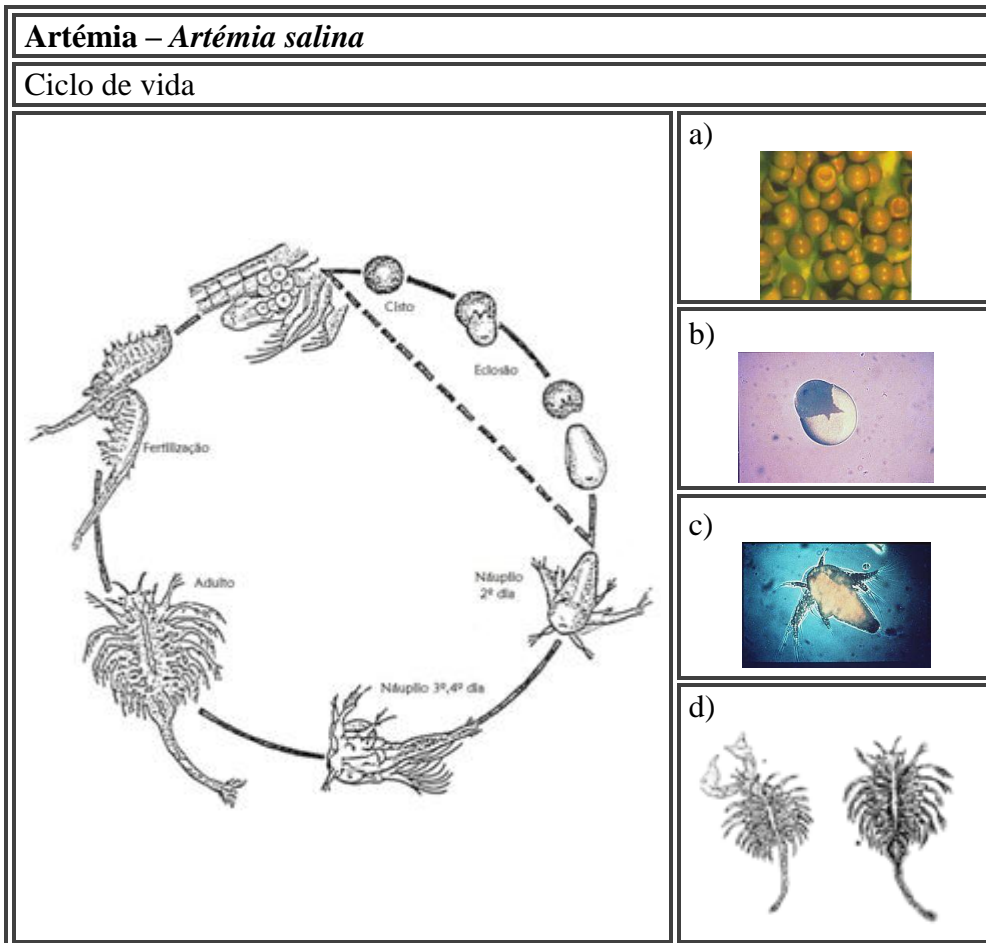


Figura 3-3: Etapas do ciclo de vida de *Artemia salina*. a) cistos; b) Eclosão; c) Náuplio e d) Adultos de *Artémia*: Macho e Fêmea

Há 3 fases distintas para o cultivo de *Artémia*: Descapsulação e Eclosão, Náuplios e Engorda.

Tabela 3-2: Procedimento de cultivo de *Artemia salina*

Procedimentos	Métodos
Hidratar	Colocar cistos de Artémia (máx. 25g/L) em água (doce ou salgada) com arejamento intenso.
Descapsular	Colocar cistos hidratados em solução descapsuladora (água doce, lixívia e Hidróxido de sódio (NaOH)) com forte arejamento. Com a perda do corion protector há uma mudança progressiva de cor, passam para alaranjado e seguidamente para uma tonalidade mais brilhante. Nesta fase os cistos descapsulados (separados dos restos de corion) podem ser guardados no frigorífico (4°C) ou prosseguirem para a eclosão.
Eclosão	Colocar os cistos no prisma em 20L de água salgada. Mantendo forte arejamento, 28°C e luz constante fornecida por um tubo fluorescente acima do prisma. Adicionar 0,25mL de lixívia por litro de água e depois de 30 minutos neutralizar com a mesma quantidade de Tiosulfato de Sódio 5%.
Náuplios	Para a recolha dos náuplios é necessário desligar a luz, retirar o arejador e a resistência e aguardar 15 minutos para que haja a separação da Artémia dos restos de corion (que flutuam) e cistos não descapsulados (que ficam no fundo). Recolher a Artémia do prisma (Figura 27) após 24h, filtrá-la (malha 250 µm) e passar para jarras de 5L com arejamento e a 26°C.
Adulta	Colocar em prismas de 90L, com arejamento forte a 26°C. Pela manhã filtrar todo o prisma com água corrente e malha apropriada a idade/tamanho.
Enriquecimento	Nauplios: 2L de <i>Phaeodactylum tricornutu</i> Artémia 24h: 1L <i>Isocrysis galbana</i> de manhã e 1L <i>Phaeodactylum tricornutu</i> as 18h. Artémia 48h: 1L <i>Isocrysis galbana</i> de manhã e 1L <i>Phaeodactylum tricornutu</i> as 18h e Algamac 10h antes de dar como alimento. Adultas: 10g Rep Pepper (diariamente) e mix de enriquecimento 1 hora antes de dar como alimentação (Prolon, Spirulina, Red Pepper e ACE)

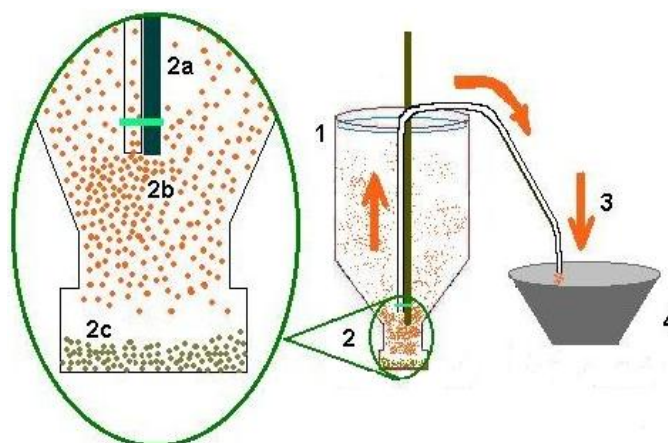


Figura 3-4: 1 – Prisma de eclosão de Artémia, com sifão posicionado a uns 5 cm do fundo. 2 – Zona de maior concentração de náuplios. a – detalhe do extremo do sifão, b – sucção de náuplios, c – restos de corion e cistos não eclodidos sedimentados. 3 – Transferência dos náuplios para a malha. 4 – Malha com uma base que está sempre com água corrente, de modo a impedir que náuplios fiquem em seco.

C2 – Copépodes – Harpacticóides (*Tisbe* spp). e Calanóides (*A. Tonsa*)

Tabela 3-3: Descrição do cultivo de copépodes no laboratório.

Origem	Itália
Cultivo	De difícil manutenção em cultivo Não é possível garantir uma alimentação diária á base de copépodes
Manutenção	<p>Sucessivas filtrações do total do tanque por malha de 50 µm lavando com água do mar corrente</p> <p>Colocar Conteúdo da malha num recipiente de precipitação e adicionar água até perfazer 5L. Deixar repousar até que sedimente todo o conteúdo em suspensão</p> <p>Sifonar o fundo do recipiente e voltar a perfazer os 5L e deixar 24h para eclosão dos ovos</p> <p>Passadas as 24h colocar todo o conteúdo do recipiente de novo no tanque (previamente lavado e desinfectado), evitando novo sedimento</p> <p>No tanque existe água esterilizada, arejamento e uma temperatura de água de 26°C</p>

C3 – Camarões – *Palaemonetes varians*

Tabela 3-4: Descrição do cultivo de camarões no laboratório.

Origem	Indivíduos capturados nas Salinas de Aveiro. Selvagens mantidos em cultivo.
Adultos	Mantidos em aquários rectangulares, de 30L. Fotoperíodo: 16L:8N Entrada de água em fluxo contínuo e circuito aberto Alimento: mexilhão, Artémia, macroalgas e microalgas.
Crias	Recolhidas dos aquários dos adultos por malhas de 300µm na saída de água. Mantidos em aquários de 10L Fotoperíodo: 16L:8N Entrada de água em fluxo contínuo e circuito aberto Temperatura: 23°C noite e 26°C dia Alimento: Até estado de pós-larva – Artémia A partir do estado de pós-larva – Artémia e mexilhão

D – Métodos de Amostragem para Isótopos Estáveis

Dois tipos de amostras: adultos e crias

D1 – Amostra de Barbatana Dorsal

- ✓ Escolher indivíduo adulto;
- ✓ Pesar;
- ✓ Medir e tirar foto (para biometria);
- ✓ Segurar o animal na mão esquerda, com o ventre para a palma da mão;
- ✓ Abrir a barbatana dorsal com a ponta dos dedos, uma vez que eles a contraem;
- ✓ Com a mão direita cortar, de um só corte, um pedaço da base da barbatana, com auxílio de tesoura afiada e desinfectada – técnica Fin-Clipping (figura 28);
- ✓ Lavar com água destilada e colocar em tubo devidamente etiquetado (ID indivíduo, indicação de amostra de barbatana dorsal e data);
- ✓ Guardar a -20°C.

Nota: Técnica mais facilmente efectuada com a ajuda de uma 2ª pessoa.

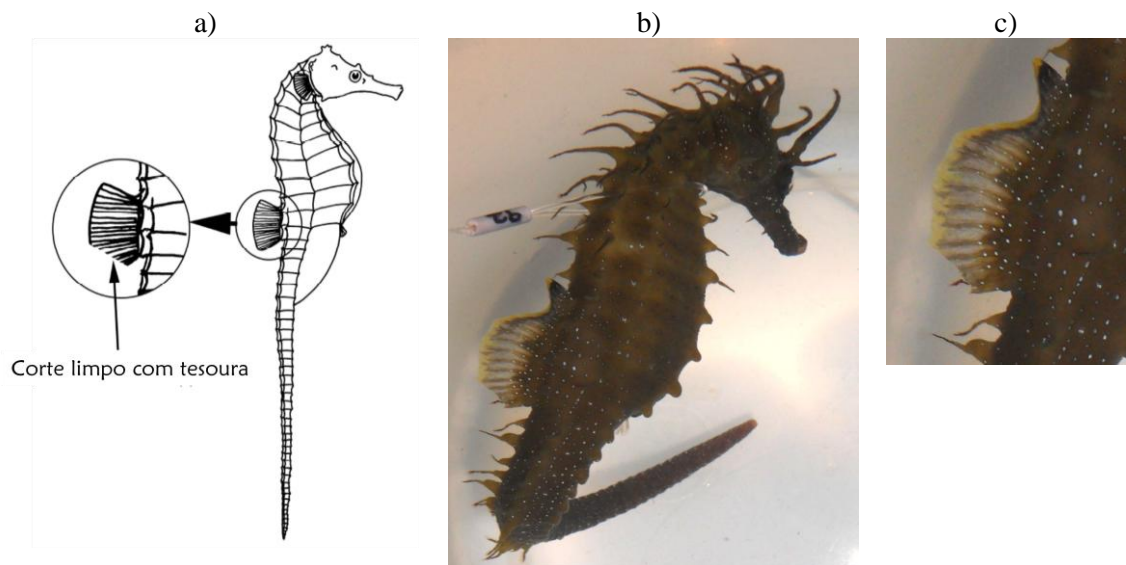


Figura 3-5: Corte em barbatana dorsal com técnica Fin-Clipping. a) imagem esquemática do corte, b) imagem de corte efectuado em indivíduo, c) detalhe do corte. (Fotos de Tânia Ferreira)

D2 – Amostra de Crias

- ✓ Escolher indivíduos;
- ✓ Anestésiar (anestésico: MS-22);
- ✓ Retirar da água e secar;
- ✓ Tirar foto (para biometria), indivíduo sobre lado esquerdo;
- ✓ Pesar;
- ✓ Lavar com água destilada;
- ✓ Colocar em tubo devidamente etiquetado (ID indivíduo, quantidade e data);
- ✓ Guardar a -20°C .

D3 – Amostra de Fezes

- ✓ Colocar, apenas, um indivíduo por aquário;
- ✓ Deixar 24h sem alimento;
- ✓ Após as 24h recolhem-se as fezes sifonando, apenas com a ponta do tubo e logo passar para recipiente (para evitar a divisão da massa fecal);
- ✓ Retirar o máximo de água com a ajuda de pipetas de Pasteur e conta-gotas com ponta de vidro;
- ✓ Colocar em tubo devidamente etiquetado (ID indivíduo, indicação de amostra de fezes e data);
- ✓ Guardar a seco a -20°C .

D4 – Amostra de Alimento

Artémia

- ✓ Recolher o número de Artémia equivalente à utilizada para um aquário de 30L (10 000 para 10L);
- ✓ Filtrar em malha de 50µm;
- ✓ Lavar com água destilada;
- ✓ Pesar;
- ✓ Colocar em tubo devidamente etiquetado (tipo de Artémia (nauplios, metanauplios ou adultos), amostra correspondente a que batch e data);
- ✓ Guardar a seco a -20°C.

Copépodes e Misisdáceos

- ✓ Procedimento idêntico à amostragem de Artémia.

Palaemonetes varians

- ✓ Procedimento idêntico à amostragem de Artémia.
 - Alteração: Cortar a cabeça e tirar exosqueleto para usar apenas o músculo do indivíduo.

D5 – Enriquecimento do alimento

Algamac para Artémia 24h

- ✓ Pesar a quantidade que se administra para enriquecimento de Artémia;
- ✓ Colocar em tubo devidamente etiquetado;
- ✓ Guardar a seco a -20°C.

Microalgas

- ✓ Recolher 1,5L da manga (*Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*);
- ✓ Colocar em 6 frascos de centrifugação de 250mL;
- ✓ Pesar os frascos para os igualar e deixar a centrifuga equilibrada;
- ✓ Centrifugar durante 20min, a 3 000 rpm e a 20°C;
- ✓ Retirar o sobrenadante;
- ✓ Ressuspender o conteúdo dos frascos com 5mL de formato de amónia, 0,5M;

- ✓ Repartir o volume obtido, por 3 tubos de 20mL e equilibrar os pesos (com adição de um outro tubo que contenha água);
- ✓ Centrifugar durante 20min, a 3 000 rpm e a 20°C;
- ✓ Retirar o sobrenadante;
- ✓ Ressuspender o conteúdo dos frascos com 5mL de formato de amónia, 0,5M;
- ✓ Centrifugar durante 20min, a 3 000 rpm e a 20°C;
- ✓ Retirar o sobrenadante;
- ✓ Juntar o precipitado todo num tubo devidamente etiquetado (espécie de alga, amostra correspondente a que batch e data);
- ✓ Guardar a seco a -20°C.

E – Método de preparação de amostras para análise de Isótopos Estáveis

A quando da utilização das amostras, estas devem ser devidamente rotuladas e guardadas a -20°C em seco.

No início é necessário fazer a lista das amostras que se pretende analisar e preparar os tubos para tal.

- ✓ Retiram-se as tampas dos tubos e cobre-se a entrada com um pedaço de *parafilm*, fazendo uns buracos suficientemente pequenos para não haja perda de amostra.
- ✓ Colocam-se em recipiente próprio e coloca-se no liofilizador durante 3 a 4 dias (dependendo o tipo de amostra).
- ✓ Retiram-se os recipientes e colocam-se num exsiccador, para evitar que as amostras liofilizadas voltem a ter humidade.

Após este processo efectuado podemos seguir com duas opções:

- Voltar a congelar a amostra, agora liofilizada, para futura análise;
- Tratar a amostra liofilizada.

O tratamento da amostra após a liofilização consiste em prepará-la para análise posterior em espectrometria de massa.

- ✓ As amostras são reduzidas a pó com o auxílio de um almofariz (salvo excepção de amostras de barbatana dorsal, em que a amostra é usada na integra);

- ✓ São pesadas para as cápsulas de estanho, com um peso máximo de amostra de 2mg e fechadas sob a forma de uma pequena bola;
- ✓ Guardadas na caixa de análise SIA.

Nota: Todos os passos entre a liofilização e a compilação da bola de estanho são cuidadosamente efectuados resguardando a amostra no exsiccador, para evitar a humidade.

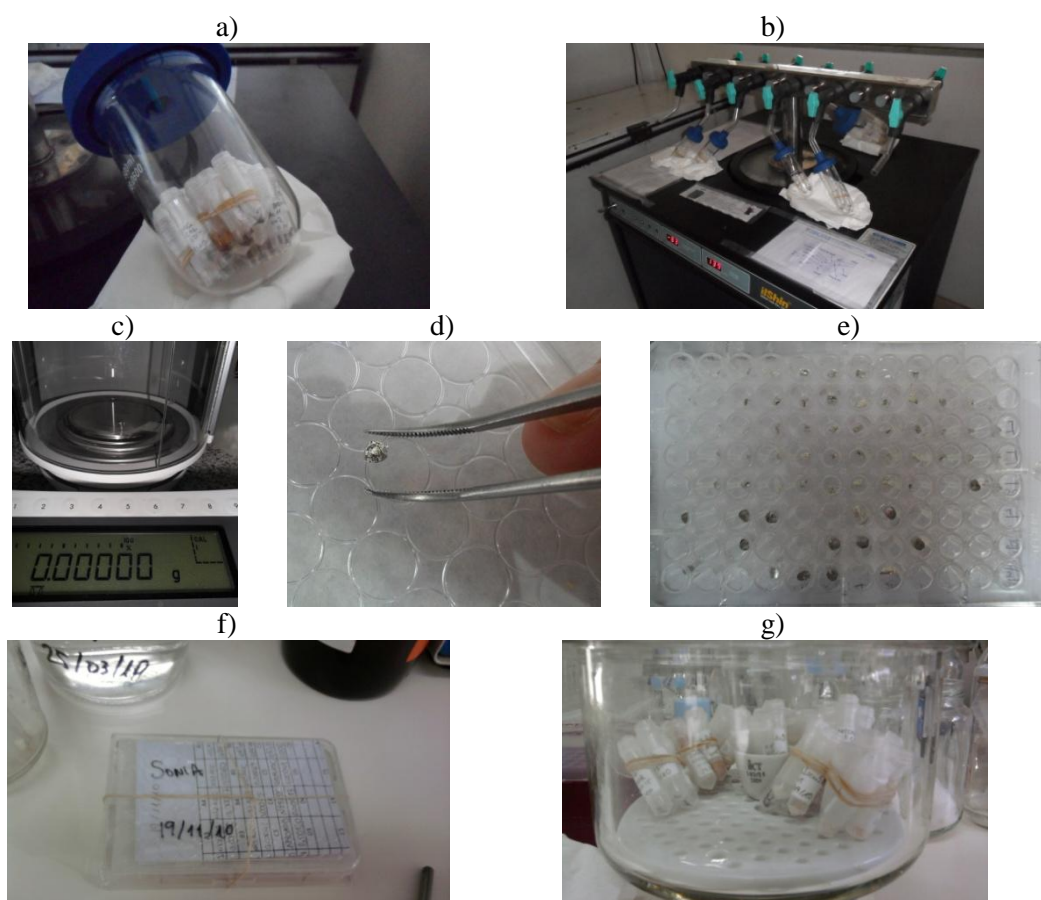


Figura 3-6: Processamento de amostras para análise de isótopos estáveis. a) Frasco a utilizar, b) formação de uma pequena bola de estanho com a cápsula que contém a amostra, c) Pesagem da amostra, d) Caixa de análise de SIA (Fotos de Tânia Ferreira)

Amostras analisadas num analisador elementar FlashEA 1112 ligado a um espectrómetro de massa Thermo-Finnigan MAT 253.

F – Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada através do software PASW Statistics 18.0. Ao longo deste trabalho, as diferenças serão consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

F1 - Adultos

Para o grupo dos Adultos as diferenças entre os quatro grupos em estudo (Selvagens, 3-4 meses, 5-6 meses e 7-8 meses) foram examinadas mediante a Análise de Variância (ANOVA) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (dependendo da violação ou não dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias) (Zar, 2010).

Sempre que a ANOVA foi estatisticamente significativa, as respectivas análises *post hoc* foram realizadas (também conhecido por método das comparações múltiplas, e que proporciona a comparação, em média, de cada grupo contra todos os outros) (Zar, 2010). Concretamente, e de forma a identificar onde se detectam as diferenças estatisticamente significativas, aplicou-se o teste de *Tuckey* (Tukey, 1962).

F2 – Crias

As diferenças entre os valores isotópicos dos diferentes tipos de alimentação (artémia, calanóides e harpacticóides) foram examinadas mediante a Análise de Variância (ANOVA) (Zar, 2010). Se ANOVA foi estatisticamente significativa, a análise *post hoc* respectiva foi realizada (também conhecida por método das comparações múltiplas, e que proporciona a comparação, em média, de cada grupo contra todos os outros) (Zar, 2010). Concretamente, e de forma a identificar onde se detectam as diferenças estatisticamente significativas, aplicou-se o teste de *Tuckey* (Tukey, 1962).

4. Resultados

As amostras de adultos e de crias foram devidamente enviadas para a Universidade de Vigo, para o Centro de Apoio Científico e Tecnológico á Investigación (CACTI), a fim de se efectuar a análise de isótopos estáveis nas suas instalações, utilizando o espectrómetro de massa de razões isotópicas (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry).

A – Adultos

Animais adultos de *H. guttulatus* mantidos nas instalações do laboratório do Proyecto Hippocampus foram sujeitos a um período de amostragem de barbatana dorsal com intervalos de amostragem que permitissem a sua regeneração completa.

Dos dados recolhidos das amostragens foi possível agrupar dados em amostras selvagens (de animais amostrados no seu meio natural, ou as primeiras amostras tiradas dos indivíduos que ficarão em cultivo), e de nº de meses consoante a data de recolha da amostra (3-4 meses, 5-6 meses e 7-8 meses). Existem dados de 2 em 2 meses, não sendo dos mesmos indivíduos, uma vez que a barbatana de um indivíduo não regenera em tão curto intervalo de tempo.

Tabela 4-1: Valores dos indivíduos em estudo. ID – identificação do indivíduo, Dias – número de dias em cultivo que os indivíduos levam no laboratório (valor 0 corresponde ao dia que foram capturados do selvagem e colocados nas instalações), $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) – correspondem aos valores Azoto e Carbono, respectivamente, da análise por IRMS.

ID	Dias	$\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$						
N72ADI	0	11,97	-15,74	0 meses	N105 ADC	82	10,14	-15,58	3-4 meses
N73ADI	0	11,94	-15,3		N71 ADC	99	10,77	-17,09	
N74ADI	0	11,28	-15,63		N70 ADC	115	9,56	-17,37	
N76 ADBU	0	11,63	-15,72		N68 ADC	124	13,3	-15,47	
N78 ADBU	0	11,73	-16,37		N82 ADC	133	12,89	-15,14	
N79 ADBU	0	11,18	-16,42		N74 ADC	143	9,27	-17,7	
N80 ADA	0	11,82	-15,61		N72 ADC	175	11,28	-16,36	5-6 meses
N81 ADA	0	11,37	-15,79		N81 ADC	179	11,47	-16,3	
N82 ADA	0	11,69	-15,55		N87 ADC	188	12,25	-15,7	
N83 ADA	0	11,54	-15,38		N89 ADC	188	13,92	-15,27	
N88 ADB	0	11,43	-15,49		N90 ADC	188	10,94	-15,41	
N105 ADI	0	9,49	-17,79		N73 ADC	217	10,92	-16,15	7-8 meses
N87 ADB	1	10,94	-16,49		N80 ADC1	234	11,19	-15,77	
N89 ADB	1	11,76	-15,72		N82 ADC1	234	13,06	-15,03	
N90 ADB	1	11,39	-16,03		N78 ADC1	240	11,39	-15,62	
N68 ADT	2	12,33	-15,55		N79 ADC1	240	11,58	-15,76	
N70ADT	2	11,92	-16,01	N83 ADC	241	12,01	-15,45		
N71ADT	2	11,95	-16,26	N76 ADC1	247	12,58	-15,74		

Abaixo estão representados os valores isotópicos de Azoto (^{15}N) e Carbono (^{13}C) das amostras de barbatana dorsal dos adultos. Valor de 0 dias corresponde aos dados obtidos a partir de amostras recolhidas dos indivíduos recém-chegados, do meio natural, às instalações do laboratório do IIM. Os restantes valores estão agrupados por meses, onde se manifesta uma escala de temporalidade dos indivíduos mantidos em cultivo, apresentada em meses.

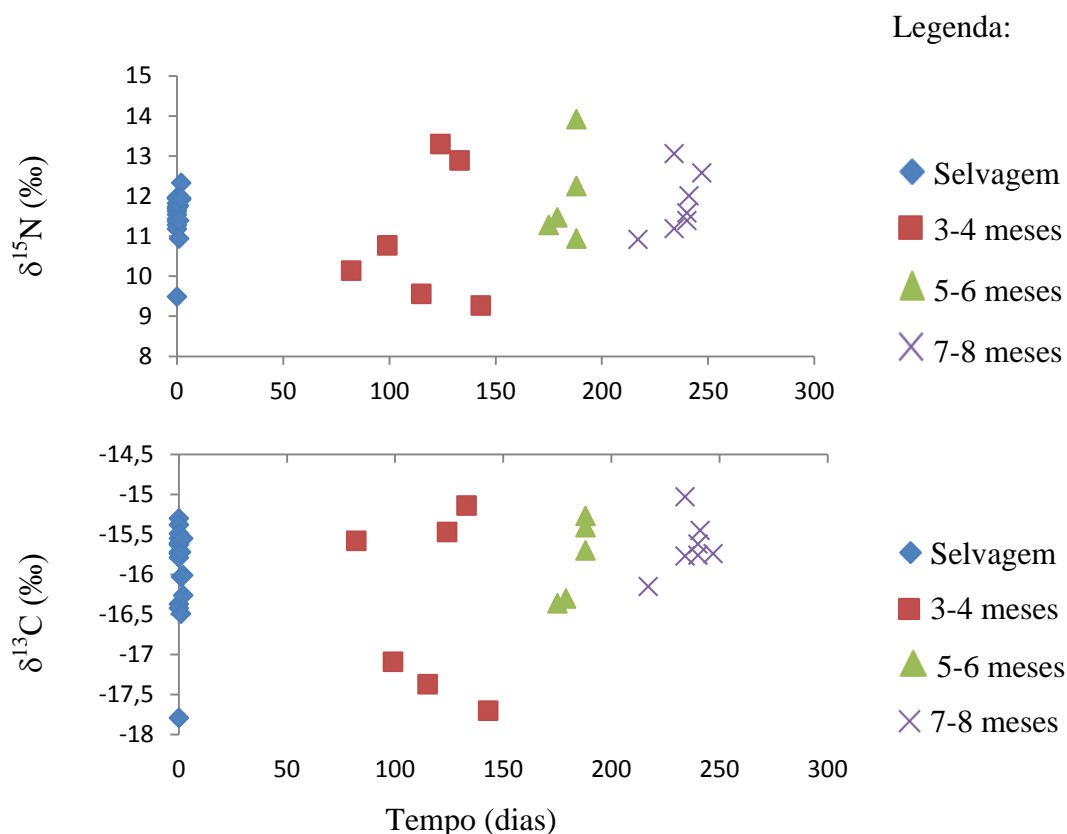


Figura 4-1: Representação gráfica dos valores isotópicos obtidos (tanto de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) como de $\delta^{13}\text{C}$ (‰)) por IRMS em relação ao tempo de recolha de amostra. São apresentados quatro grupos distintos: Selvagem, 3-4 meses, 5-6 meses e 7-8 meses.

Análise Estatística

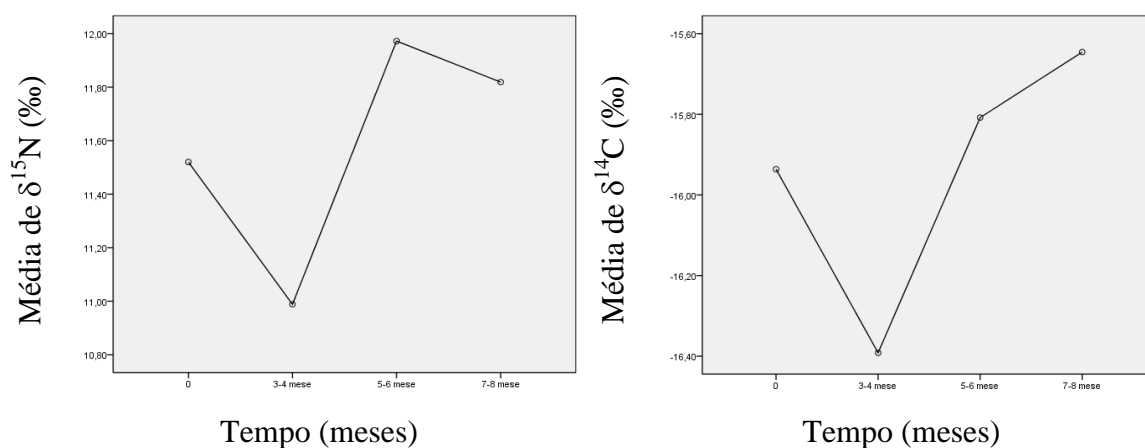


Figura 4-2: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) médios ao longo do tempo de amostragem.

Na apresentação de valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) (Figura 4-2) é evidente o valor inferior em ambas variáveis aos 3-4 meses, é então, necessário averiguar se existe entre este grupo de valores e os restantes (Selvagem, 5-6 meses e 7-8 meses).

A1 – Análise ANOVA com 1 factor

Tabela 4-2: Tabela descritiva.

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite Inferior	Limite Superior		
$d^{15}\text{N}$ (‰)	0 meses	18	11,52	0,608	0,143	11,22	11,82	9,49	12,33
	3-4 meses	6	10,99	1,716	0,700	9,19	12,79	9,27	13,30
	5-6 meses	5	11,97	1,190	0,532	10,50	13,45	10,94	13,92
	7-8 meses	7	11,82	0,775	0,293	11,10	12,54	10,92	13,06
	Total	36	11,5522	0,980	0,163	11,22	11,88	9,27	13,92
$d^{13}\text{C}$ (‰)	0 meses	18	-15,94	0,587	0,138	-16,23	-15,64	-17,79	-15,30
	3-4 meses	6	-16,39	1,116	0,456	-17,56	-15,22	-17,70	-15,14
	5-6 meses	5	-15,81	0,501	0,224	-16,43	-15,19	-16,36	-15,27
	7-8 meses	7	-15,65	0,344	0,130	-15,96	-15,33	-16,15	-15,03
	Total	36	-15,94	0,670	0,112	-16,16	-15,71	-17,79	-15,03

Tabela 4-3: Teste de homogeneidade de variâncias.

	Estatística Leneve	gl 1	gl 2	Sig.
$d^{15}\text{N}$ (‰)	5,799	3	32	0,003
$d^{13}\text{C}$ (‰)	6,607	3	32	0,001

A2 – Teste Kruskal-Wallis

Tabela 4-4: Teste de comparação de três independentes.

	$d^{15}\text{N}$ (‰)	$d^{13}\text{C}$ (‰)
Qui-quadrado	1,819	1,054
Graus de liberdade	3	3
Sig. Assimp.	0,611	0,788

Não existem diferenças estatisticamente significativas para ^{15}N e ^{13}C quando comparando os 4 grupos existentes (Selvagem, 3-4 meses, 5-6 meses e 7-8 meses). Em particular, o grupo 3-4 meses não apresenta diferenças estatisticamente significativas relativamente aos restantes grupos.

A3 – Teste *t*-Student

Para assumir uma alimentação com uma assimilação adequada em cultivo é necessário certificar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de dados obtidos por amostras de indivíduos selvagens e o grupo de dados em que os indivíduos já se encontram á 7-8 meses em cultivo.

As diferenças entre os indivíduos selvagens e os que se encontram em cultivo foram averiguadas através do teste *t-Student* (Zar, 2010).

Tabela 4-5: Análise estatística por grupos.

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	0 meses	18	11,52	0,608	0,143
	7-8 meses	7	11,82	0,775	0,293
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	0 meses	18	-15,94	0,587	0,138
	7-8 meses	7	-15,65	0,344	0,130

Tabela 4-6: Teste de amostras independentes.

		Teste de Levene		Teste <i>t-Student</i>						
		F	Sig.	t	gl	Sig.	Diferenças		Intervalo Confiança 95% das Diferenças	
							Média	Erro Padrão	Máx.	Mín.
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Variâncias iguais	1,44	0,243	-1,02	23	0,317	-0,30	0,29	-0,90	0,31
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Variâncias iguais	1,36	0,256	-1,22	23	0,235	-0,29	0,24	-0,78	0,20

Os valores obtidos por este teste só vêm confirmar o resultado do teste anterior em que é evidente que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Selvagem e 7-8 meses. Sendo que os valores isotópicos após 8 meses em cultivo podem sofrer uma alteração mas alcançam um valor que se assemelha ao selvagem.

A4 – Adultos vs Alimento

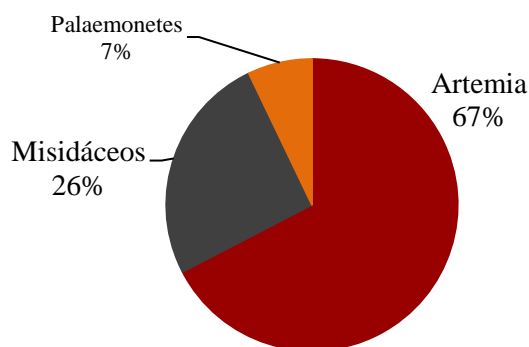


Figura 4-3: Gráfico circular correspondente às percentagens anuais de cada alimento dado diariamente aos adultos em cultivo (Artémia, Palaemonetes e Misidáceos).

Adicionando á Tabela 4-1 os valores isotópicos das amostras de alimento (Artémia, *Palaemonetes varians* e Misidáceos) podemos ver uma aproximação das assinaturas isotópicas do consumidor ao do alimento.

Tabela 4-7: Valores correspondentes de Azoto e Carbono ($\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, respectivamente) da análise por IRMS ao alimento dado aos adultos em cultivo.

Alimento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Desvio Padrão	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Desvio Padrão
Artémia	4,8	1,23	-19,01	0,19
<i>Palaemonetes</i>	8,76	1,96	-13,54	2,43
Misidáceos	9,78	1,98	-17,3	0,12

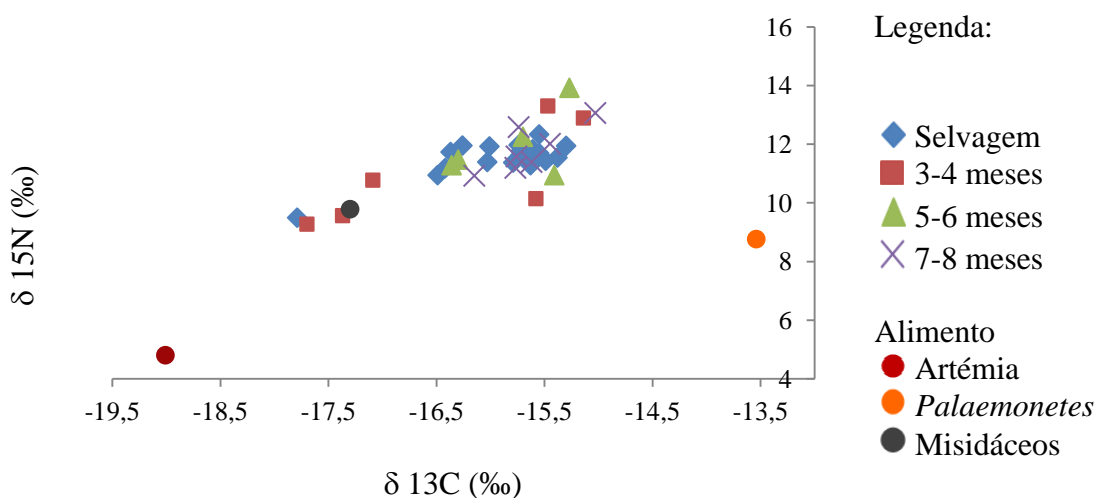


Figura 4-4: Representação gráfica de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) dos adultos e dos três tipos de alimento oferecidos.

No gráfico acima apresentado (Figura 4-4) encontram-se assinalados os valores isotópicos dos dados obtidos das análises por IRMS das amostras de adultos; estão também apresentados os valores isotópicos dos três tipos de alimento disponíveis: Artémia, *Palaemonetes* e Misidáceos. Os misidáceos fornecem níveis isotópicos muito semelhantes aos adultos, artémia e *Palaemonetes* possuem valores extremos de azoto em relação aos adultos.

Como já provado acima não existem diferenças significativas na dispersão de valores ao longo dos meses e após os 7-8 meses as assinaturas isotópicas são semelhantes às encontradas no meio selvagem.

B - Crias

Após análise isotópica das crias recolhidas segundo o desenho experimental, os dados obtidos:

Tabela 4-8: Valores dos indivíduos em estudo. ID Amostra – identificação do tipo de alimento a que os indivíduos estavam sujeitos, Dias – número de dias da experiência, $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) – correspondem aos valores Azoto e Carbono, respectivamente, da análise por IRMS.

ID Amostra	Dias	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	SD	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	SD
Jejum	0	12,56		-15,87	
Artémia	5	12,965	0,078	-15,51	0,028
Calanóides	5	9,125	0,134	-16,495	0,091
Harpacticóides	5	12,25	0,424	-15,65	0,085
Jejum	5	12,84		-15,42	
Artémia	15	12,895	0,261	-15,985	0,417
Calanóides	15	8,85	0,156	-16,745	0,092
Harpacticóides	15	11,485	1,011	-16,005	0,205
Artémia	30	13,28		-15,49	
Calanóides	30	9,95		-15,85	
Harpacticóides	30	12,05		-15,65	

Os gráficos seguintes apresentam a relação isotópica das crias da experiência. As amostragens foram efectuadas a dia 0, 5, 15 e 30.

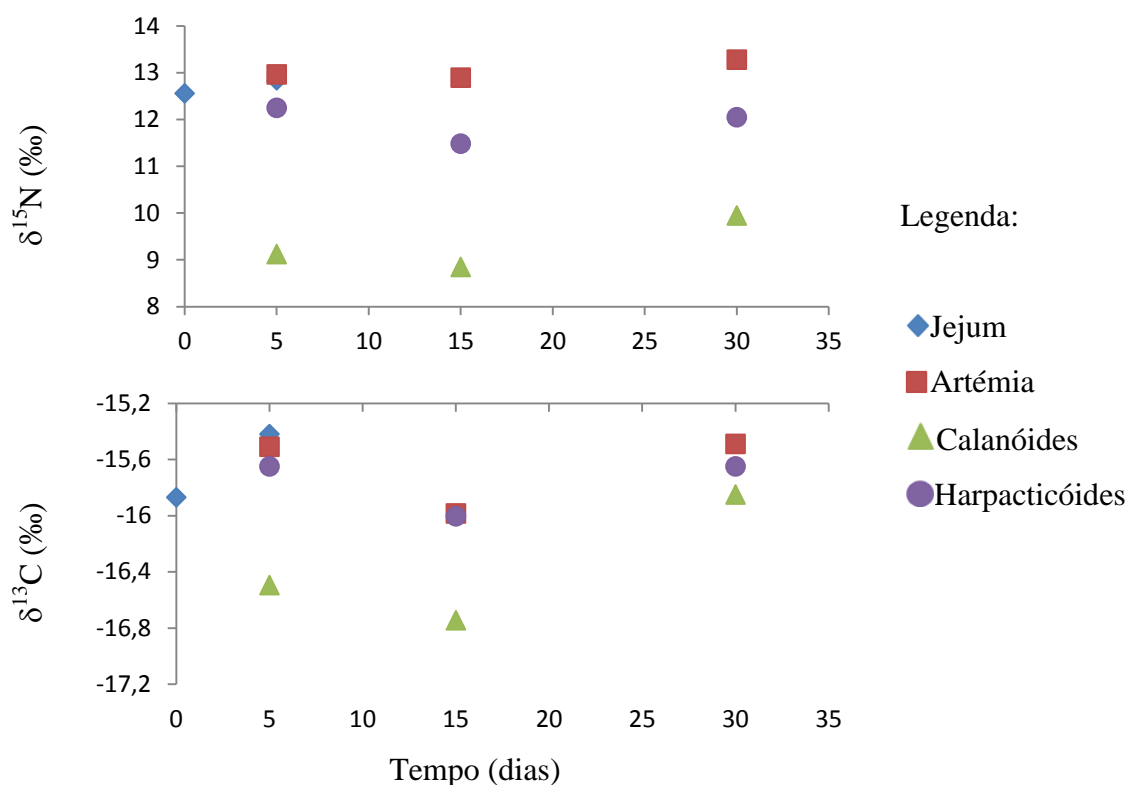


Figura 4-5: Representação gráfica dos valores isotópicos obtidos (tanto de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) como de $\delta^{13}\text{C}$ (‰)) por IRMS em relação ao tempo de recolha de amostra. São apresentados quatro grupos distintos: Jejum, e alimentados com Artémia, Calanóides ou Harpacticóides.

Com a relação de $\delta^{15}\text{N}$ podemos asseverar sobre o nível trófico. O efeito da alimentação com calanóides é bastante visível logo de início e afecta o crescimento nos dias seguintes. Já entre artémia e harpacticóides até ao dia 5 as diferenças são muito pequenas, relativamente ao jejum; o que indica que ou não estão a comer bem ou não estão a digerir o alimento. A partir desse dia já alteram o seu valor isotópico e ao fim de 1 mês voltam a valores semelhantes aos iniciais. Os indivíduos que foram mantidos sem alimento apresentam um ligeiro enriquecimento em carbono, que pode ser devido ao consumo das suas reservas iniciais.

Em $\delta^{13}\text{C}$ (‰), a informação que o carbono fornece é o tipo de alimento. Nos primeiros 5 dias é possível demonstrar que os indivíduos a quem foi dado calanóides realmente ingeriram o alimento que lhes foi dado, uma vez que o valor isotópico é bastante diferente dos dois outros grupos. Após o dia 15 já ocorre uma evolução no valor isotópico, uma vez que após dia 8 estes possuem uma dieta apenas de artémia o que proporciona que a dia 30 o seu valor esteja mais semelhante ao dos restantes

tratamentos. Já nos aquários, a dia 5, aos quais foi dado tanto artémia como harpacticóides não existe como provar que estes indivíduos se alimentaram realmente do alimento disponível, uma vez que a assinatura isotópica se assemelha á dos indivíduos que foram mantidos em jejum no decorrer da experiência. Ao dia 5 estes indivíduos apresentam um enriquecimento em carbono, isso é devido ao consumo das suas reservas iniciais. Em ambos os gráficos é visível uma diminuição ao dia 15 em todos os tipos de alimento fornecidos, seguidos de subida ao dia 30.

Tabela 4-9: Informação dos valores de isótopos estáveis dos diferentes tipos de alimento fornecido à experiência de alimentação com crias

Alimento	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Artémia	9,62	-17,12
Copépodes Calanóides	3,28	-19,88
Copépodes Harpacticóides	2,49	-19,34

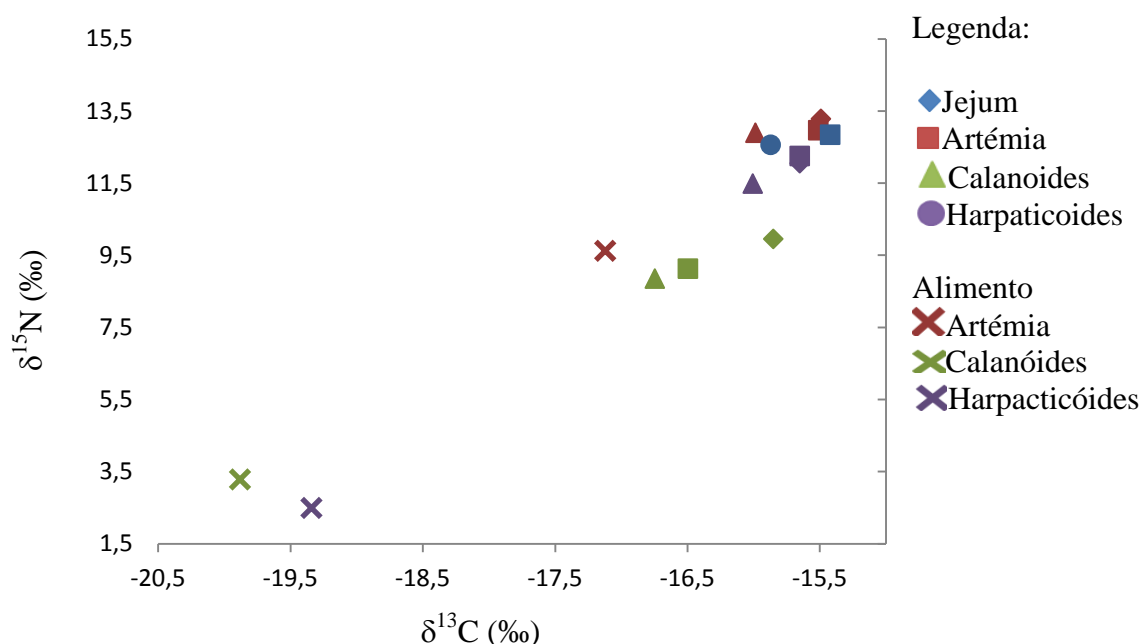


Figura 4-6: Representação gráfica de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) e $\delta^{13}\text{C}$ (‰) das crias e dos três tipos de alimento oferecidos. As formas geométricas representam os dias de amostragem: ● - valores a dia 0, ■ - valores a dia5, ▲ - valores a dia 15, ◆ - valores a dia 30 e × - valores do próprio alimento.

Com a figura 35 é possível verificar a relação $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$ existente tanto entre os diferentes tratamentos de alimentação, como desses mesmos tratamentos e o próprio alimento fornecido na experiência. É evidente uma aproximação de valores de isótopos

estáveis mais acentuada dos indivíduos alimentados com copépodes calanóides ao valor isotópico do próprio alimento, do que no caso tanto de artémia como de copépodes harpacticóides em que os valores se encontram mais próximos a valores de indivíduos em jejum do que ao próprio alimento fornecido.

Após tratamento de dados é possível elaborar um gráfico que represente a sobrevivência das crias nesta experiência.

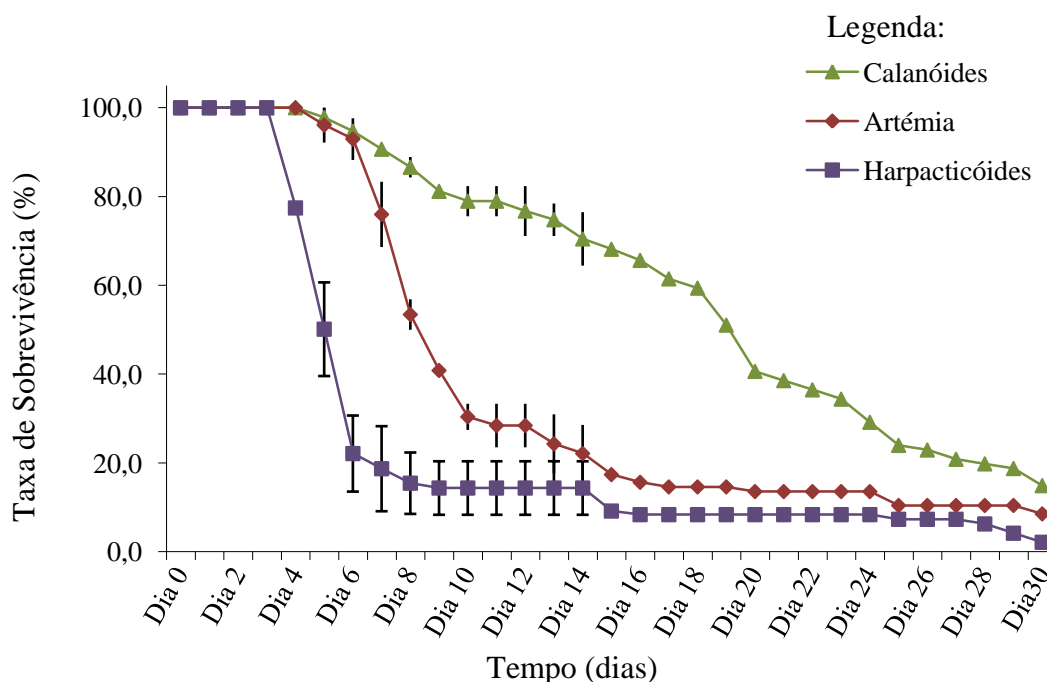


Figura 4-7: Representação gráfica da taxa de sobrevivência das crias nesta experiência

Na Figura 36 é visível que ao dia 4 da experiência as taxas são afectadas nos três tipos de alimento oferecidos. É de notar que a partir de dia 6 os aquários alimentados apenas com copépodes passaram a ser alimentados também com artémia, e que a dia 8 a dieta de todos os aquários era apenas artémia. Os indivíduos alimentados inicialmente com copépodes calanóides foram os que possuíram uma maior taxa de sobrevivência com o decorrer do tempo.

Análise Estatística

Com a finalidade de compreender a equidade dos valores isotópicos apresentados recorreu-se ao estudo estatístico dos mesmos.

B1 – Análise ANOVA com 1 factor

Tabela 4-10: Tabela descritiva.

	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Artémia	3	13,05	0,21	0,12
	Calanóide	3	9,31	0,57	0,33
	Harpacticóide	3	11,93	0,40	0,23
	Total	9	11,43	1,70	0,57
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Artémia	3	-15,66	0,28	0,16
	Calanóide	3	-16,36	0,46	0,27
	Harpacticóide	3	-15,77	0,20	0,12
	Total	9	-15,93	0,44	0,15

Tabela 4-11: Teste de homogeneidade de variâncias.

	Estatística Levene	gl 1	gl 2	Sig.
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	1,954	2	6	0,222
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	1,569	2	6	0,283

Tabela 4-12: Análise de ANOVA com 1 factor.

	Grupo	Soma dos quadrados	gl	Média dos quadrados	F	Sig.
$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	Entre grupo	22,090	2	11,045	62,854	0,000
	Dentro grupos	1,054	6	0,176		
	Total	23,145	8			
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Entre grupo	0,858	2	0,429	3,855	0,084
	Dentro grupos	0,668	6	0,111		
	Total	1,525	8			

Os resultados obtidos por este teste demonstram que não ocorrem diferenças estatisticamente significativas quando comparados valores médios de carbono (^{13}C). Já quando se comparam valores de azoto (^{15}N) são encontradas diferenças que estatisticamente se apresentam significativas, como tal sucedeu é necessário identificar onde se detectam essas diferenças aplicando-se o teste de *Tuckey* (Tukey, 1962).

B2 – Teste Post Hoc

Tabela 4-13: Comparações por Tukey HSD, para $\delta^{15}\text{N}$ (‰).

Alimento (A)	Alimento (B)	Média de Diferença (A-B)	Erro Padrão	Sig.	Limite máximo	Limite mínimo
Artémia	Cal	3,74	0,34	0,000	2,69	4,79
	Har	1,12	0,34	0,039	0,07	2,17
Calanóide	Art	-3,72	0,34	0,000	-4,79	-2,69
	Har	-2,62	0,34	0,001	-3,67	-1,57
Harpacticóide	Art	-1,12	0,34	0,039	-2,17	-0,07
	Cal	2,62	0,34	0,001	1,57	3,67

Todos os grupos se apresentam diferentes entre si.

5. Discussão e Conclusão

A – Adultos

Os indivíduos adultos recolhidos das águas de diferentes locais de amostragem ao longo das Rias Baixas da Galiza foram mantidos em cativeiro, participando em experiências de reprodução e outros factores essenciais ao seu cultivo. As amostras da barbatana dorsal de adultos analisadas por IRMS apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ que são cruciais para analisar do que é composto o alimento ingerido e absorvido pelos indivíduos e poder acerbar sobre a propriedade do alimento que lhe é dado. Podemos então dizer que ao fim dos 7-8 meses em cultivo estes animais apresentam uma dieta em cultivo adequada que lhe fornece os requerimentos alimentares que obtém no meio selvagem (Valladares e Planas. 2010 (b)). Conseguiu mostrar-se, por estudo estatístico, que a visível dispersão de valores ao mês 3-4 não corresponde a diferenças significativas ($P>0,05$) nos isótopos estáveis analisados, e que pode tratar-se de um prazo de ambientação aos aquários e ao método de alimentação, uma vez que apenas se encontram disponíveis três tipos de alimento (artémia, *Palaemonetes* e misidáceos) e que são alimentações condicionadas. Comparando os níveis isotópicos, a artémia será o alimento menos apropriado em termos de Carbono e Azoto, mas é o mais fácil de fornecer em condições de cultivo. Durante a estadia no laboratório foi identificado um comportamento de alimentação selectiva que pode ser determinante para a discrepância de valores isotópicos apresentados inicialmente, em que certos indivíduos apenas se alimentavam de um tipo de alimento (*Palaemonetes* ou misidáceos) mesmo quando com outro disponível para alimentação (artemia).

Pode afirmar-se com clareza que *fin-clipping* demonstrou ser um método eficaz para utilização nesta experiência o que possibilita a continuidade dos estudos com cavalos-marinhos, prevenindo qualquer possibilidade remota de necessidade de sacrifício do indivíduo para retirar as amostras. É uma técnica que não diminui as suas capacidades de locomoção ou alimentação uma vez que se pode recolher uma parte limitada da barbatana dorsal com 0,21mg de peso seco que requer apenas 12,74 mm² da barbatana dorsal da *H. guttulatus*, o que corresponde a 8,66% da superfície total. (Valladares e Planas. 2010 (a))

B – Crias

Uma vez que tanto azoto como carbono funcionam como indicador de estado nutricional, quando ocorre um decréscimo do valor isotópico respectivo deve-se a uma utilização dos componentes alimentares para o crescimento. Ao revés, o uso de recursos endógenos leva a um enriquecimento nos valores de isótopos estáveis nos tecidos. (Valladares et al. 2010)) Neste trabalho, em ambos valores de azoto como de carbono, ao dia 15 decréscimo do valor isotópico seguido de um aumento ao dia 30, sugerindo que ocorre um crescente esforço para o crescimento o que indica uma possível diminuição de ingestão de alimento ou mesmo a sua menor assimilação.

Correspondendo aos diferentes tipos de alimento, tanto em valores de $\delta^{15}\text{N}$ como de $\delta^{13}\text{C}$ (Figura 4-5) quando se trata dos indivíduos alimentados com copépodes calanóides existem valores inferiores do que quando se trata de artémia ou copépodes harpacticóides como alimento oferecido. Relativamente ao dia 5, em ambos os casos N e C, os valores tanto de artémia como de harpacticóides se assemelham bastante aos valores dos indivíduos que foram deixados sem qualquer tipo de alimento, podemos então partir do princípio que nestes dois tratamentos os indivíduos poderão não assimilar o alimento ingerido ou mesmo não estar a ingerir qualquer tipo de alimento; enquanto que no caso dos indivíduos alimentados com copépodes calanóides existe uma assinatura isotópica diferente dos restantes, o que leva a uma noção de alimentação.

É também possível verificar uma assimilação eficaz de copépodes calanóides (Figura 4-6) que leva a uma aproximação de assinatura isotópica do próprio alimento com o enriquecimento, aproximado, de 3-4‰ para isótopos de azoto e cerca de 1‰ para carbono. A análise estatística conclui que existem diferenças significativas entre todos os tratamentos alimentares quando se trata da análise de isótopos azoto ($P < 0,05$), enquanto que para isótopos de carbono os valores não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ($P > 0,05$).

Quando incorporando a sobrevivência dos indivíduos é facilmente observável que nos aquários que inicialmente possuíam uma dieta á base de copépodes calanóides foi possível a sua manutenção por maior período de tempo. A mortalidade tem início a cerca de dia 4 e pode ser devida a vários factores, no caso dos que possuem dieta de

artémia ou harpacticóides, e tal como se pode observar pela Figura 4-7 pode ser devido a uma não assimilação ou mesmo a não ingestão de alimento uma vez que os valores de azoto são tão semelhantes aos dos indivíduos que foram submetidos ao jejum. A maior perda de crias deu-se nos primeiros 6 dias, dia ao qual se começou a alimentar todos os aquários com artémia, a partir desse dia não se observa uma mortalidade tão acentuada, mas sim uma estabilização das crias que se encontram nos aquários.

A composição isotópica dos indivíduos em estudo *H. guttulatus* foi comprovante de que se conseguiu adequar a alimentação fornecida aos requisitos nutricionais que estes possuem no meio selvagem. A aquacultura é um processo que está sempre em inovação e melhoramento para fornecer as condições necessárias ao bem-estar animal e facultar a sua reprodução. Enquanto houver essa preocupação com as populações selvagens e a sua conservação as metodologias serão melhoradas e reforçados os esforços.

6. Referências Bibliográficas

Anders P.J. 1998. Conservation Aquaculture and Engangered Species: Can Objective Science Prevail over Risk Anxiety? Fisheries Management 23, no. 11, 28-31.

Background document for the short-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. OSPAR Commision. 2009. Biodiversity Series.

Benson S., Lennard C., Maynard P. e Roux C. 2005. Forensic application of isotope ratio mass apectrometry – A review. Forensic Science International 157: 1-22.

Bier D.M. 1997. Stable isotopes in biosciences, their measurement and models for amino acid metabolism. Eur J Pedistr 156: S2-S8.

Cabo, F. L. 1979. Ictiología del Mar Menor (Murcia): los fisóstomos. Murcia, Argentina: Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia.

Conalgo L.A., Almeida F.C.L. e Valente A.P.2002. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: Revolução no estudo de macromoléculas biológicas. Química Nova na Escola 16: 9-14.

Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. CITES Appendix II, Order Gasterosteiformes / Family Syngnathidae. Pág. 7-19.

Curtis M.R.C. e Vincent A.C.J. 2005. Distribution of sympatic seahorse species along a gradient of habitat complexity in a seagrass- dominated community. Marine Ecology Progress Series (Mar Ecol Prog Ser) 291: 81-91.

Curtis J.M.R. e Vincent A.C.J. 2005. Life history of na unusual marine fish: survival, growth and movement patterns of *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829. Journal of Fish Biology 68: 707-733.

Dawson T.E. e Brooks P.D. 2001. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: Inkovich M. et al (Ed.). Stable isotope techniques in the study of biology processes and functioning of ecosystems. Dordrecht: Klumer Academic Publisher 1: 1-18.

Ferreira A.I.A.J.V. 2008. Espectrometria de massa de razões isitópicas. Doutoramento em Química apresentado à Universidade de Lisboa.

Filho A.B. e Marchini J.S. 2004. O uso de isótopos estáveis no estudo da cinética proteica em medicina intensiva. Revista Brasileira Terapia Intensiva 16, no. 3, 192-19.

Foster S.J. e Vincent A.C.J. 2004. Review Paper. Life history and ecology of seahores: implication for conservation and management. Journal of Fish Biology 65: 1-61.

Fry B. 2006. Stable Isotope Ecology; Springer

HBOI, 2000. Marine ornamental production. <http://www.fau.edu/hboi/>. 1 October 2010.

Hora M.S.C., Joyeux JC. 2009. Closing the reproductive cycle: growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions, *Aquaculture* 292: 37-41.

Indiviglio F. 2001. Seahorses: everything about history, care, nutrition, handling, and behavior. Barron's Educational Series.

Jardine T.D., McGarchy S.A., Paton C.M., Savoie M. e Cunjak R.A. 2003. Stable isotopes in aquatic systems: sample, preparation, analysis, and interpretation. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2656: 39p.

Kelly M.H. e Hagar W.G. 2006. Nonlethal sampling of sunfish sculpin for stable isotope analysis: how scale and fin tissue compare with muscle tissue. *North American Journal of Fisheries Management* 26: 921-925.

Kitsos M.S., Tzomos Th., Anagnostopoulou T.L. e Koukouras A. 2007. Diet composition of the seahorses, *Hippocampus guttulatus* Cuvier, 1928 and *Hippocampus hippocampus* (L., 1758) (Teleostei, Syngnathidae) in the Aegean Sea. *Journal of Fish Biology* 72: 1259-1267.

Krebs C. 2008. The ecological world view. CSICO Publishing.

Pereira A.L. 2007. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. *Biociências* 13: 16-27.
(Pereira. 2007)

Manetta G.I. e Benedito-Cecilio E. 2003. Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de *turnover* em estudos ecológicos: uma síntese. *Maringá* 25, No.1, 121-129.

Martinelli L.A., Vistoria R.L., Trivelin P.C.O., Devol A.H. e Richey J.E. 1992. ¹⁵N Natural abundance in plants of the Amazon River floodplain and potencial atmospheric N₂ fixation. *Oecologia* 90: 591-596.

Michener R. e Latha K. 2007. *Stable Isotopes in Ecology and Environment Science*. 2ª Edição. Blackwell Publishing.

Morgan S. e Bull C. 2005. Potential techniques for marking and tagging seahorses. Technical report series. Project Seahorse. N°7 Versão 1.0.

OSPAR Commission 2009. Background Document for the Short-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*, Biodiversity Series.

Planas, M., A. Chamorro, P. Quintas, and A. Vilar. 2008. Establishment and maintenance of threatened long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*, broodstock in captivity. *Aquaculture* 283:19-28.

Planas M., Quintas P., Chamorro A. E Silva C. 2010. Female maturation, egg characteristics and fatty acids profile in the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Animal Reproduction Science* 22: 66-73

Rahn T. e Wahlen M. 2002. Mass spectrometric method for the determination of the stable isotopic content of nitrous oxide by the technique of direct injection, International Atomic Energy Agency TECHDOC-1268: Stable isotope measurement techniques for atmospheric greenhouse gases, 47-57. Refereed Research Article.

Ripley J.L. e Foran C.M. 2009. Direct evidence for embryonic uptake of paternally-derived nutrients in two pipefishes (Syngnathidae: *Syngnathus* spp.). *L Comp Physiol B* 179: 325-333.

Scollick A. Red Alert ! Seahorse farming: commerce or conservation? Friends of Irish Seahorses (FISH)

Souza, L.M. 2008. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Tese de Pós-Graduação apresentada à Universidade Federal do Pará. Para obtenção de grau de doutor em Ciências.

Valladares S. e Planas M. 2010 (a). Assessment of fin tissue use for stable isotopes analyses in seahorses. Apresentado em Aquaculture Europe 2010, 5-8 Outubro, Porto (Portugal).

Valladares S. e Planas M. 2010 (b). Study of growth in newborn seahorses (*Hippocampua guttulatus*) by stable isotopes analyses. Apresentado em Aquaculture Europe 2010, 5-8 Outubro, Porto (Portugal).

Valladares S. Blanco A. e Planas M. 2010. Stable isotope in *Palaemonetes varians* grown in mesocosm. Apresentado em Aquaculture Europe 2010, 5-8 Outubro, Porto (Portugal).

VIE Project Manual 2008. Visible implant elastomer tag project Manual. Guidelines on planning and conducting projects using VIE and associated equipment. Northwest Marine Technology, Inc, V 2.0 US DJS.

Vincent A.C.J. e Sadler L.M. 1995. Faithful pair bonds in wild seahorses, *Hippocampus whitei*, *Animal Behavior* 50, edição 6, 1557-1569.

Vincent A.C.J. 1996. The international trade in seahorses, *Species in Danger*, TRAFFIC International.

Teske P.R., Cherry M.I. e Matthee C.A. 2004. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 273-286.

Thlusty M. 2002. The benefits and risks of aquaculture production for the aquarium trade. *Aquaculture* 205: 203-219.

Todd S., Ostrom P., Lien J. e Abrajano J. 1997. Use of biopsy samples of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) skin for stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$) determination. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* 22:71-76.

Tukey JW: The future of data analysis. *Annals of Mathematical Statistics* 1962, 33:22:1-67

Wilson M.J. e Vincent A.C.J. 1999. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquarium Science and Conservation* 2:179-196.

Woods C.M.C. 2007. Aquaculture of the big-bellied seahorse hippocampus, Tese Doutorado apresentada à Universidade de Victoria em Wellington.

Woods, C.M.C. and Martin-Smith, K.M. 2004. Visible implant fluorescent elastomer tagging of the big-bellied seahorse, *Hippocampus abdominalis*. *Fisheries Research* 66: 363-371.

Zar JH, vol. 5th Edition. NJ: Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River; 2010

Sites Consultados

- ✓ <http://www.atomicarchive.com/> (Última consulta a 14 de Novembro de 2010)
- ✓ <http://www.fishbase.org/> (Última consulta a 24 de Janeiro de 2011)
- ✓ <http://www.fao.org/> (Última consulta a 8 de Novembro de 2010)
- ✓ http://aquarium.ucsd.edu/Education/Learning_Resources/Secrets_of_the_Seahorse/biology.html (Última consulta a 3 de Março de 2011)
- ✓ <http://aquarium.ucsd.edu>
- ✓ <http://www.theseahorsetrust.org/> (Última consulta a 20 de Março de 2011)
- ✓ <http://seahorse.fisheries.ubc.ca/> Project Seahorse (Última consulta a 15 de Novembro de 2011)
- ✓ <http://www.iucnredlist.org/>, IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2010.4. (Última consulta a 8 de Novembro de 2010)
- ✓ <http://serc.carleton.edu/> Última consulta a 14 de Novembro de 2010)

7. Anexos

A – Análise Isótopos Estáveis

Tabela 7-1: Custos da Análise de Isótopos no CACTI – Universidade de Vigo

	Valor em Euros (€)	Notas
Cápsula Estanho	2€ cada	
Análise - % Semi-quantitativa		
Lotes de 25 amostras	300€	150€ são da calibração
1-10 amostras	10€ por amostra	
11-20 amostras	8€ por amostra	
21-30 amostras	6-7€ por amostra	