

Carla Susana Ferreira Garrido Coelho

**ALIMENTAÇÃO DE *Sardina pilchardus*
(Walbaum, 1792) AO LARGO DA COSTA
CONTINENTAL PORTUGUESA E IMPLICAÇÕES
DA CONDIÇÃO NUTRICIONAL DAS FÊMEAS NA
QUALIDADE DOS OÓCITOS**

Mestrado de Ciências do Mar - Recursos Marinhos

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

2002

Carla Susana Ferreira Garrido Coelho

**ALIMENTAÇÃO DE *Sardina pilchardus*
(Walbaum, 1792) AO LARGO DA COSTA
CONTINENTAL PORTUGUESA E IMPLICAÇÕES
DA CONDIÇÃO NUTRICIONAL DAS FÊMEAS NA
QUALIDADE DOS OÓCITOS**

TESE DE MESTRADO

Mestrado de Ciências do Mar - Recursos Marinhos

**Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Instituto de Investigação das Pescas e do Mar**

2002

“O estudo do plankton tem hoje uma importancia capital, desde que se reconheceu a influencia que a proporção e natureza das especies que o compõem têm sobre a marcha das especies ichthyologicas emigrantes; parecendo depender a variação d’essas especies de certas condições chemicas e physicas do oceano, combinadas com factores meteorologicos” In Yacht Amelia, Campanha Oceanográfica de 1896”, Rei D. Carlos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Investigação das Pescas e do Mar onde desenvolvi a maior parte deste trabalho, em particular à Doutora Maria Emília Cunha que me sugeriu e ajudou a explorar este tema.

À Universidade do Algarve onde realizei as experiências de genética.

Aos meus orientadores, Doutora Maria Alexandra Chícharo e Doutor Yorgos Stratoudakis pelo apoio e incentivo prestados nas diversas fases de elaboração deste trabalho.

Ao projecto Pelágicos, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia que financiou grande parte do trabalho da tese de mestrado.

Ao Dr. Enric Saiz, sempre presente na minha vida científica com os seus conselhos amigos, responsável pela paixão no estudo do plâncton.

Aos colegas da Universidade do Algarve que me apoiaram o trabalho aí realizado, em particular à Ana Amaral pelo profissionalismo e amizade com que me ajudou do início ao final das experiências de genética.

Ao Laboratório de fitoplâncton, a Doutora Maria Teresa Moita, Dra. Ana Sofia Palma, Dra. Graça Vilarinho, Sr. Armindo Morais e Sr. Augusto Carreira por toda a ajuda imprescindível na identificação e caracterização dos itens fitoplanctónicos e fluorimetria.

Ao Laboratório de Zooplâncton, em particular à Sra. Fátima Quintela, por todo o apoio afectuoso e incansável e pela ajuda na identificação do zooplâncton.

À Doutora Antonina dos Santos, pela amizade com que acompanhou os meus primeiros passos no IPIMAR.

A todos os meus colegas que recolheram amostras a bordo do navio "Noruega" e aos que leram e criticaram esta tese, em especial à Cátia e ao Juan.

Ao António Tita, por ter posto em prática uma câmara de observação de plâncton.

À minha família e amigos, pelo entusiasmo e paciência com que acompanharam de perto o desenvolvimento do trabalho e me pouparam algumas responsabilidades durante este ano.

Ao Alexandre, principal responsável por todos os passos e energia, pelo carinho e permanente incentivo que sempre fazem parecer tudo fácil.

RESUMO

Este trabalho pretendeu descrever a dieta alimentar da sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) em duas zonas da costa continental portuguesa (Peniche e Portimão) na época de alimentação e no final da época de desova e relacionar a condição nutricional das fêmeas adultas com os oócitos por si produzidos. A contribuição das presas para a alimentação foi calculada por observação dos conteúdos estomacais através dos métodos numérico e volumétrico e foi utilizada a fluorimetria como método adicional para calcular a contribuição dos itens alimentares fitoautotróficos. A condição nutricional das fêmeas e qualidade dos oócitos foi estimada através do índice RNA/DNA.

Houve uma grande variabilidade nos parâmetros alimentares entre indivíduos da mesma amostra, nomeadamente no peso de conteúdo, número de itens alimentares e quantidade de pigmentos fotossintéticos por estômago. Não foi encontrado nenhum estômago vazio. Os conteúdos estomacais variaram entre 0.04 e 1.22 g, representando entre 0.1 e 2.1% do peso total dos indivíduos. O número de itens por estômago variou entre 42 e 67822, tendo o seu comprimento médio variado entre cerca de 100 μm no Verão e 60 μm na Primavera. O fitoplâncton foi o grupo numericamente mais abundante nos estômagos, dominado por espécies de *Dinophysis*, *Protoperidinium* e várias espécies de diatomáceas em cadeia, enquanto em termos de biovolume o zooplâncton foi o grupo dominante, principalmente representado por copépodes (dominando os Harpacticoida e *Oncaea* spp.) e estádios do seu desenvolvimento. O número de itens por estômago foi superior em Peniche, bem como a proporção de itens fitoplanctónicos e o número de pigmentos fotossintéticos enquanto a proporção de itens zooplanctónicos foi superior em Portimão, bem como o biovolume médio de itens por estômago. Todos os parâmetros alimentares analisados foram superiores na Primavera do que no Verão. Os itens alimentares da Primavera foram comparados com amostras de plâncton da superfície, verificando-se que a alimentação da sardinha se baseou essencialmente em espécies de natureza bentónica. A quantidade de pigmentos fotossintéticos (Clorofila *a* e feopigmentos *a*) esteve correlacionada com o número de itens fitoplanctónicos no mesmo estômago. Não existiram diferenças claras na quantidade de pigmentos fotossintéticos entre indivíduos de diferentes classes de comprimento.

A condição nutricional das fêmeas em pré-desova, medida pela razão RNA/DNA no músculo, não apresentou uma relação directa com a razão RNA/DNA dos oócitos, provavelmente devido a uma mobilização numa fase anterior das proteínas do músculo para a gónada.

Estes resultados evidenciam a necessidade de realizar um ciclo anual de alimentação da sardinha para definir a época principalmente responsável pela recuperação energética do recurso após a longa época de desova. Permitem também considerar a fluorimetria como uma alternativa ao método numérico para estimar a contribuição do fitoplâncton na dieta de peixes planctívoros e sugerem a utilização de um método adicional para determinar a importância de cada grupo de presas que quantifique o valor calórico ou energético dos itens alimentares.

ABSTRACT

Sardine (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) diet was analysed by the observation of stomach contents of individuals collected in two areas of the Portuguese continental coast (Peniche and Portimão) in the summer and at the end of the spawning period (spring). The prey's significance in feeding was determined through numeric and volumetric methods. Fluorometry was used as an additional method to estimate the contribution of phytoautotrophic preys.

There was a high variability in the number of preys, content weight and photosynthetic pigments per stomach between individuals of the same sample. No empty stomachs were found, stomach content weights ranged from 0.04 to 1.22 g, representing between 0.1 and 2.1% of the individual total weight. The number of items per stomach varied between 42 and 67822, and the prey's average length was 100 μm in the summer and 60 μm in the spring. Phytoplankton was the most abundant group in all samples except for Portimão during the summer, although in terms of volume, zooplankton, predominantly copepods, dominated. The number of items per stomach was higher in Peniche, as well as the proportion of phytoplankton items and the number of photosynthetic pigments. Zooplankton proportion was higher in Portimão, as well as the average biovolume per stomach. All feeding parameters were higher in spring. Digestion rate was slightly higher in summer samples and in those collected with commercial vessels. The number of photosynthetic pigments was related to the number of phytoplankton cells in stomachs. There were no clear differences in photosynthetic pigment content between individuals of different length classes. Early spring stomach contents were compared with plankton samples collected at the surface, showing that sardine ingested essentially species of benthic nature in both areas.

The results reveal the need to study the annual feeding cycle of sardine to define the most important time for the energetic recovery of the individuals after the long spawning season, allow us to consider fluorimetry as an alternative to estimate the phytoautotrophic preys of planctivorous fish and suggest an additional method to attribute the importance of preys that quantifies their caloric content. Finally, according to the results obtained from the RNA/DNA ratio, pre-spawning female nutritional condition showed no relation with oocyte quality determined by the same ratio, suggesting that the transfer of proteins from the muscle to the gonad may have happened prior to the spawning season.

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1) Material	3
2.2) Amostragem Biológica	3
2.3) Identificação e Quantificação dos itens alimentares	6
2.4) Graus de digestão	7
2.5) Determinação do Biovolume dos itens alimentares	7
2.6) Análise do plâncton na água	8
2.7) Espectrofluorometria para quantificação dos pigmentos fotossintéticos	9
2.8) Técnica fluorimétrica para determinação da proporção RNA/DNA	10
2.9) Tratamento de dados	13
3 - RESULTADOS	14
3.1) Variáveis Biológicas	14
3.2) Análise qualitativa da dieta alimentar	18
3.3) Análise quantitativa da dieta alimentar	23
3.3.1) Número de itens e biovolume	23
3.3.1.1) Diferenças entre análise de conjuntos e de estômagos individuais	23
3.3.1.2) Variação entre indivíduos da mesma amostra	29
3.3.1.3) Diferenças entre amostras	31
3.3.2) Pigmentos fotossintéticos	38
3.3.2.1) Diferenças entre indivíduos da mesma amostra	38
3.3.2.2) Diferenças entre amostras	39
3.3.3) Relação entre a quantidade de pigmentos fotossintéticos e a abundância de presas fitoplanctônicas	42
3.4) Grau de digestão dos itens alimentares	49
3.5) Variação da dieta alimentar com o comprimento dos indivíduos	52
3.6) Alimentação da sardinha e disponibilidade alimentar	56
3.7) Condição nutricional das fêmeas e qualidade dos oócitos	59
4 - DISCUSSÃO	68
ANEXOS	

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A sardinha (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792) é um pequeno peixe pelágico de ciclo de vida relativamente curto que se distribui no sistema de afloramento do Atlântico Nordeste desde o Mar do Norte à Mauritânia. Está igualmente distribuída no Mediterrâneo e mares adjacentes e nos Arquipélagos da Madeira, Açores e Canárias. Na costa portuguesa, a sardinha representa cerca de metade do volume de pescado desembarcado anualmente, sendo importante para o país quer a nível económico quer a nível social (Pestana, 1989). A abundância deste recurso tem sofrido grandes oscilações e desde 1985 que se verifica uma tendência decrescente nos desembarques em Portugal e Espanha. Com excepção do ano 2000 e junto à costa norte de Portugal, o recrutamento pesqueiro dos últimos anos está abaixo do valor médio desde 1993.

Várias hipóteses são propostas para explicar as flutuações de abundância e do recrutamento da sardinha, relacionadas fundamentalmente com variações na biomassa do "stock" reprodutor e com factores ambientais. A alimentação dos adultos, dependente dos factores ambientais, é apontada como um possível factor determinante na abundância e distribuição dos pequenos pelágicos (*e.g.* Parrish *et al.*, 1981; Mathisen *et al.*, 1978, Schwartzlose *et al.*, 1999), embora a escassez de estudos sobre a alimentação de *Sardina pilchardus* não permitam avaliar o seu impacte na dinâmica deste recurso.

Os únicos trabalhos disponíveis sobre alimentação da sardinha ao largo da costa Portuguesa (Pinto, 1951 e Silva, 1954) sugerem que a sua dieta é composta por organismos fito e zooplactónicos, em proporções muito diferentes consoante a área de amostragem. A costa ocidental de Portugal, sujeita a um sistema de afloramento costeiro sazonal e, em regra, com uma maior biomassa planctónica na costa noroeste (Cunha, 2002, Moita, 2001), deverá proporcionar condições de composição e abundância de alimento bastante diferentes da costa Sul. No entanto, não se conhece a variabilidade geográfica da dieta desta espécie nem o seu comportamento alimentar. Para que se possa avaliar o impacte da alimentação na abundância e distribuição do recurso ao largo da costa continental portuguesa é necessário, em primeiro lugar,

caracterizar a dieta alimentar dos adultos, a sua variação geográfica e sazonal e o seu comportamento alimentar.

Vários estudos sugerem que a disponibilidade alimentar para os adultos pode afectar igualmente a viabilidade dos descendentes (*e.g.* Scott *et al.*, 1999, Kjesbu *et al.*, 1996 Chambers, *et al.* 1996, em *Gadus morhua*). No único trabalho realizado sobre os efeitos parentais na viabilidade dos descendentes em *Sardina pilchardus* (Riveiro *et al.*, 2000) ficou demonstrado que a viabilidade das larvas depende da qualidade dos ovos produzidos, o que será provavelmente determinado pela condição nutricional das fêmeas na altura da desova ou numa fase de pré-desova. Estudos efectuados no Japão (Morimoto, 1991), na espécie *Sardinops melanostictus*, demonstram que a condição nutricional das fêmeas adultas, em particular a acumulação de lípidos na época de alimentação, influencia a quantidade e qualidade de ovos produzidos. As experiências de Watanabe *et al.* (1985) em *Pagrus major* revelaram que a qualidade nutricional das dietas fornecidas aos adultos (de peixes que se alimentam durante o período da desova) têm uma grande influência na qualidade dos ovos produzidos. O estudo da relação entre a qualidade nutricional das fêmeas e a viabilidade dos descendentes ajudará a compreender de que forma a dieta alimentar da sardinha no período de alimentação e/ou no período da desova influencia o recrutamento da espécie.

O primeiro objectivo do presente trabalho é descrever a dieta alimentar da sardinha em duas zonas da costa continental portuguesa e estudar o seu comportamento alimentar. Assim, será caracterizada a dieta alimentar da sardinha na costa oeste e sul de Portugal continental (Peniche e Portimão) na época de Verão, denominada época de alimentação, e no final da época de desova (Primavera). O segundo objectivo deste trabalho é relacionar a condição nutricional das fêmeas com a qualidade dos ovócitos por si produzidos. Assim, será utilizado o índice RNA/DNA para determinar a condição nutricional das fêmeas adultas em desova e a qualidade dos oócitos hidratados por si produzidos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1) Material

Para a análise dos conteúdos estomacais foram recolhidas amostras de sardinha da costa oeste (Peniche) e sul (Portimão) de Portugal (Figura 1) durante o Verão de 2001 e Primavera de 2002. Realizaram-se 3 amostragens por zona, uma durante os meses de Verão (Agosto/Setembro) e duas na Primavera (Fevereiro/Março e Março/Abril).

As amostras de Agosto/Setembro e de Fevereiro/Março foram recolhidas em portos comerciais, e fazem parte da amostragem regular do IPIMAR para monitorização dos recursos de pesca na costa portuguesa. Estas amostras provêm de captura por cerco, em lances realizadas durante a noite até ao alvore e desembarcadas durante a manhã. As embarcações de Peniche operam geralmente desde a Ericeira até à Nazaré e as embarcações de Portimão no Barlavento. As amostras de Março/Abril foram recolhidas por arrasto pelágico durante uma campanha de investigação a bordo do navio “Noruega” durante a tarde; a de Portimão às 17.32 h a 44 m de profundidade e a de Peniche às 16.08 h a 30 m de profundidade. Durante esta campanha recolheram-se ainda amostras de plâncton da água a 3 m de profundidade através do amostrador CUFES, nos mesmos locais onde se obtiveram as amostras de sardinha.

Para a análise da proporção de ácidos nucleicos foram analisadas fêmeas com oócitos hidratados recolhidas numa campanha de investigação durante o mês de Novembro de 2001 ao largo da costa continental portuguesa e em Cádiz. No total reuniram-se 82 fêmeas das quais se retirou uma porção do músculo na zona dorsal e uma porção do ovário com oócitos hidratados. Os tecidos foram conservados a bordo em azoto líquido. Para estas fêmeas recolheram-se também os dados biológicos na amostragem regular do IPIMAR. Os locais de amostragem estão representados na Figura 1.

2.2) Amostragem Biológica

A amostragem regular de sardinha do IPIMAR é composta por cerca de 100 indivíduos, aos quais se recolhe a seguinte informação biológica:

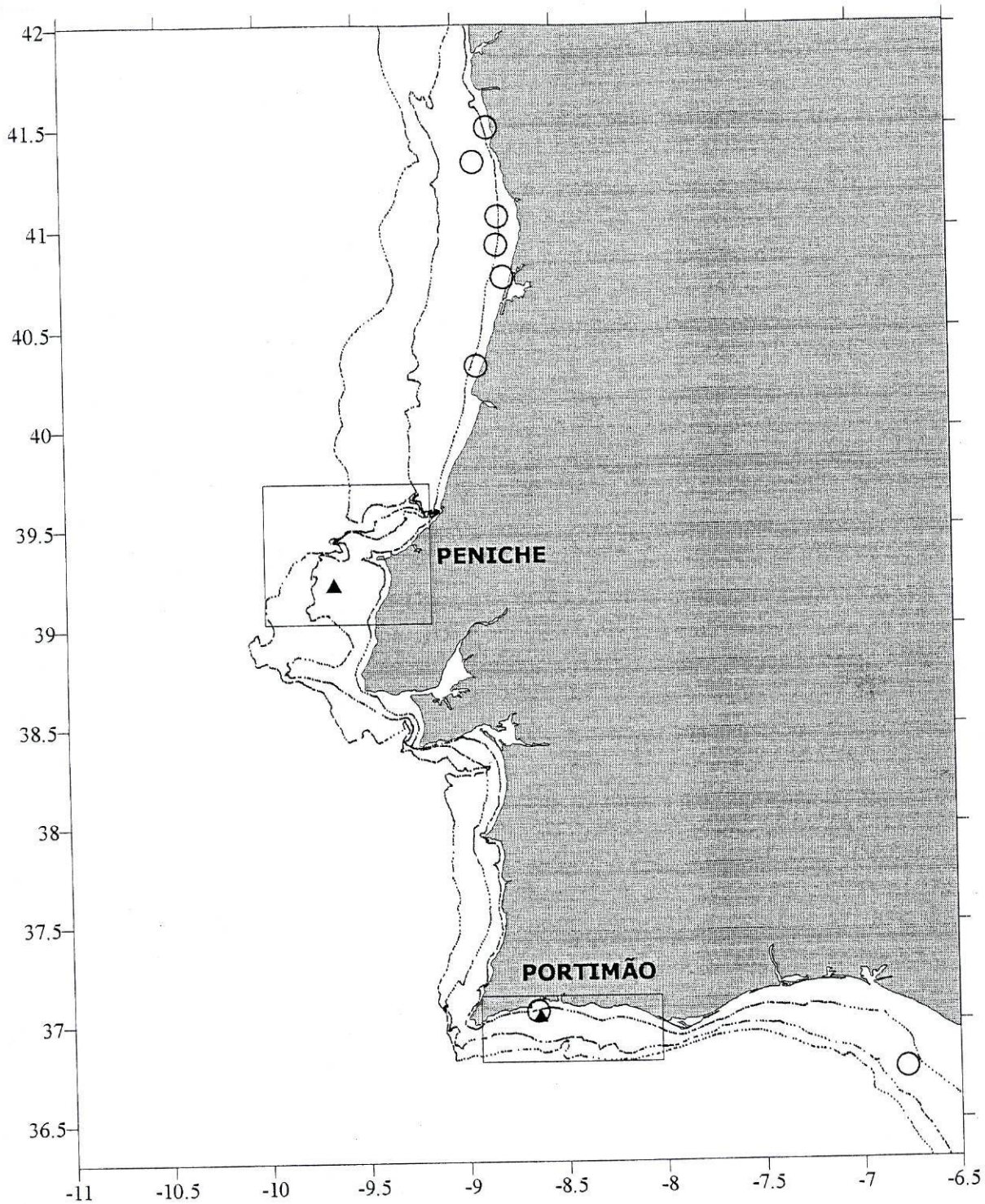


Figura 1 - Mapa da zona de estudo.
 A zona de pesca de Peniche e Portimão está delimitada, de grosso modo, por rectângulos.
 Os triângulos representam os locais das amostras da campanha de investigação para o estudo da alimentação e os círculos os locais da campanha onde se recolheram fêmeas em pré-desova.

- comprimento, peso total e eviscerado, sexo, estado de maturação (escala macroscópica de 7 níveis), grau de gordura (escala macroscópica de 4 níveis) e peso das gónadas.

No início da Primavera, ou seja, nas amostras de Fevereiro/Março de ambas as zonas, foram pesados todos os estômagos da amostra do IPIMAR (93 indivíduos no caso de Portimão e 114 no caso de Peniche) após a recolha dos dados biológicos.

Com o objectivo de descrever a dieta alimentar dos indivíduos, procedeu-se ao estudo dos conteúdos estomacais dos indivíduos seleccionados através de dois tipos de análise:

Análise individual: Esta análise teve como objectivo conhecer a variabilidade da dieta entre indivíduos da mesma amostra e comparar os resultados obtidos entre a contagem de itens fitoplanctónicos e a determinação de pigmentos fotossintéticos no mesmo estômago. Assim, em cada estômago da análise individual os itens alimentares foram identificados e quantificados em grandes grupos e foi também determinada a quantidade de pigmentos fotossintéticos por fluorimetria. Para esta análise seleccionaram-se 25 indivíduos no Verão e 25 na Primavera (12 de Fevereiro/Março e 13 de Março/Abril) com aproximadamente 20 cm de comprimento em cada zona (no total, 100 indivíduos). Nas duas amostras recolhidas durante o cruzeiro de Março/Abril foram também recolhidos os dados biológicos dos 10 indivíduos por amostra com o menor comprimento e foram quantificados os pigmentos fotossintéticos, para comparação com as sardinhas maiores. Todos os estômagos foram congelados entre a recolha de dados biológicos e a posterior análise.

Análise de conjuntos: Formou-se também um conjunto por amostra de vários conteúdos estomacais com o objectivo de classificar mais detalhadamente os itens alimentares presentes em cada amostra e proceder à sua medição, para estabelecer um biovolume médio de cada grupo de itens alimentares. Para este conjunto reuniram-se fracções de cerca de 25% dos estômagos da *análise individual* e outros estômagos do mesmo arrasto, formando, no total, conjuntos de 15 a 40 conteúdos estomacais por amostra. Estes estômagos foram também congelados entre a recolha e a análise.

Os estômagos de cada amostra que não foram utilizados para nenhuma das análises anteriores foram conservados em formalina (4%) no caso do Verão e congelados no caso da Primavera. Após uma análise preliminar dos conteúdos estomacais conservados em formol e congelados, optou-se por analisar apenas os estômagos congelados. Esta opção foi tomada por duas razões; para possibilitar a

análise espectrofluorimétrica e para facilitar a diluição do conteúdo estomacal, garantindo que a maioria deste se libertou das paredes do estômago, ao contrário da conservação em formol em que o estômago e o conteúdo enrijecem, dificultando a sua dissolução.

Para os estômagos congelados efectuou-se o seguinte procedimento: deixando descongelar o menos possível, pesou-se o estômago cheio e depois vazio e também o conteúdo numa balança de precisão. O conteúdo estomacal foi então homogeneizado sem diluição numa placa de petri, separando cerca de 50% para a quantificação dos itens da *análise individual*, cerca de 25% para *análise de conjuntos* por amostra e entre 25 e 10% para a análise espectrofluorimétrica (quantificação dos pigmentos fotossintéticos). Estas fracções voltaram a ser congeladas até proceder à sua análise.

2.3) Identificação e quantificação dos itens alimentares

A fracção dos conteúdos estomacais destinados à *análise individual* foi colocada numa placa de petri, sendo então diluída em água destilada e fragmentada com a ajuda de uma agulha. Após esta diluição inicial, o conteúdo foi passado por um crivo de 200 µm para separar o micro do mesoplâncton. Procedeu-se à contagem dos itens alimentares com a ajuda de um microscópio estereoscópio (80x), no caso da fracção de mesoplâncton, ou também através de um microscópio de inversão Zeiss IM 35 (400x) no caso da fracção de microplâncton.

Pela dificuldade em fixar uma determinada fracção de estômago destinada à contagem, devido à grande variação do número de itens alimentares entre estômagos, optou-se por fixar um número médio de itens alimentares contados. No caso da análise individual dos estômagos contou-se cerca de 100 itens alimentares por cada fracção, que foram classificados em grandes grupos, geralmente ao nível da Ordem ou Classe. No caso das fracções de estômagos associadas num conjunto por amostra, foram contados e medidos cerca de 300 a 400 organismos por fracção, identificados ao nível taxonómico mais baixo possível, de acordo com o que permitia o estado de digestão dos itens alimentares.

2.4) Graus de digestão

Os itens alimentares zoo e ictioplanctônicos foram classificados numa escala de 1 a 5 de acordo com o seu grau de digestão, adaptada de Sigurdsson & Astthorsson (1991). Esta escala está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Graus de digestão dos itens alimentares zooplanctônicos (adaptada de Sigurdsson & Astthorsson, 1991).

Grau de digestão	Descrição
1	Item intacto, aparentemente não digerido
2	Item praticamente intacto
3	Item com digestão limitada, facilmente identificável ao nível taxonômico pretendido
4	Item muito digerido, apresentando algumas dificuldades de identificação
5	Item quase irreconhecível ou presente apenas parte deste

Do fitoplâncton presente nos estômagos apenas as diatomáceas foram classificadas quanto ao grau de digestão, já que os dinoflagelados identificados apresentaram em todas as amostras um bom estado de conservação. Ao contrário, as diatomáceas presentes nos estômagos variaram entre um estado de conservação semelhante ao encontrado nas amostras de água e uma ruptura total da estrutura siliciosa, chegando a encontrar-se as duas valvas separadas, o que dificultou a sua identificação. As diatomáceas foram classificadas numa escala de 1 a 3 semelhante à anterior, de acordo com os graus de digestão (Tabela 2).

Tabela 2 – Graus de digestão das diatomáceas presentes nos estômagos.

Grau de digestão	Descrição
1	Item intacto, aparentemente não digerido
2	Item parcialmente digerido, identificando-se apenas a estrutura de sílica, esvaziada
3	Item identificável ao nível taxonômico pretendido com bastante dificuldade, aparentemente esvaziado e com a estrutura de sílica parcialmente digerida ou danificada

2.5) Determinação do Biovolume dos itens alimentares

No caso da análise dos conjuntos mediram-se os organismos após a sua identificação e contagem. Os primeiros 100 organismos da fracção maior de 200 μm ,

observados ao microscópio estereoscópico, foram fotografados com a ajuda do “software” IM 500 (Leica). Mediram-se os organismos pelas fotografias (diâmetro para os organismos aproximadamente esféricos, comprimento maior e menor para os indivíduos de forma elíptica), aproximando a forma do organismo inteiro quando este se encontrou parcialmente digerido. Como o objectivo é o cálculo de biovolumes, no caso dos copépodes, por exemplo, mediu-se apenas o abdómen, excluindo-se o comprimento de patas e antenas.

O cálculo dos biovolumes realizou-se de acordo com as seguintes fórmulas:

$$v = \frac{4}{3} * \pi * (a * b * c)$$

em que:

v = volume de um elipsóide (μm^3), $a, b, c = 3$ semi-eixos do elipsóide (μm). Visto terem sido medidos o eixo maior e um eixo menor, assume-se que o terceiro eixo, para o elipsóide, é idêntico ao semi-eixo menor ($b=c$).

No caso dos organismos aproximadamente esféricos, em que foi medido o diâmetro da circunferência (d), foi calculado:

$$v = \frac{4}{3} * \pi * r^3$$

em que:

v = volume de um organismo esférico (μm^3), r = raio (μm). Com base nos biovolumes médios dos itens alimentares do respectivo conjunto, estimou-se o biovolume de cada item presente nos estômagos analisados individualmente.

2.6) Análise do plâncton na água

As análises ao plâncton foram efectuadas em amostras obtidas pelo amostrador CUFES (Checkley *et al.* 1997) a 3 m de profundidade, filtrando 10 litros de água através de um crivo de 20 μm , recolhidas à superfície nos mesmos locais das amostras de sardinha. As amostras foram conservadas em formalina (4%). A contagem dos organismos observados nas amostras de plâncton da água seguiram o procedimento descrito anteriormente para os itens alimentares presentes nos conjuntos, classificando os organismos ao nível taxonómico mais baixo possível. No caso da fracção de microplâncton da água, menos concentrada do que a dos estômagos, seguiu-se a técnica de Utermöhl para quantificar a amostra (Hasle, 1978).

2.7) Espectrofluorometria para quantificação dos pigmentos fotossintéticos

A análise espectrofluorimétrica teve por objectivo a quantificação dos pigmentos fotossintéticos presentes nos estômagos, adaptando o método de Holm-Hansen *et al* (1965). Utilizou-se para os estômagos de Verão cerca de 25% do peso do conteúdo estomacal, embora se tenha optado por uma fracção menor nos conteúdos de Primavera, já que estes, sendo mais pesados e com maior quantidade de pigmentos fotossintéticos, facilmente atingiriam o limite de detecção do espectrofluorímetro.

As fracções do conteúdo estomacal congelado destinadas à análise de pigmentos fotossintéticos foram colocadas em tubos de centrifugadora e trituradas (Politron) com uma solução de 4 ml de acetona a 90%, juntando-se mais 4 ml desta solução depois da trituração. Após um intervalo de 24 horas no frio (4°C), os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm. Determinou-se em seguida o espectro de emissão do sobrenadante, com comprimento de onda de excitação de 425nm e comprimento de onda de emissão de 668nm, num espectrofluorímetro Perkin-Elmer Mod.204-A. Após a leitura no espectrofluorímetro procedeu-se à acidificação do extracto, adicionando 2 gotas de HCl a 5%, realizando-se posteriormente nova leitura. A concentração de pigmentos totais no estômago foi calculada através das equações adaptadas de Strickland & Parson (1968):

$$\text{Clor. } \underline{a} = F_d^a \frac{\tau}{\tau - 1} (R_b - R_a) * v * \frac{[P]}{[P]}$$

$$\text{Feopig } \underline{a} = F_d^a \frac{\tau}{\tau - 1} (R_b - R_a) * v * \frac{[P]}{[P]}$$

em que:

Clor. a - Quantidade de clorofila a por estômago (µg)

Feopig a - Quantidade de feopigmentos a por estômago (µg)

F_d^a - Factor de porta corrigido (µg/l)

R_b - Valor da fluorescência da amostra antes da acidificação

R_a - Valor da fluorescência da amostra após a acidificação

τ - Razão de acidificação (R_{A_b}/R_{A_a}) máxima na calibração

p – peso de amostra utilizada na extracção (g)

P – peso total do estômago (g)

v - volume total de amostra diluída em acetona a 90% (0.008 l)

Para estimar a quantidade total de pigmentos na amostra (Clorofila a e Feopigmentos a) somaram-se então os resultados das anteriores equações. Ao longo da tese será utilizado a denomina

O espectrofluorímetro foi calibrado com soluções de clorofila a pura da Sigma. Uma solução de clorofila a foi depois acidificada, dando origem a uma solução de feofitina a, utilizada como padrão secundário de calibração, uma vez que permanece inalterada por um longo período de tempo (Pissarra & Cavaco, 1984). A utilização da solução feofitina a é um padrão secundário de calibração que permite um melhor ajustamento da sensibilidade do espectrofluorímetro, no dia da análise das amostras. Em consequência, F_d^a ("Factor de Porta") associado ao fotomultiplicador e amplificador, é calculado através da equação (Pissarra & Cavaco, 1984):

$$F_d^a = F_d^o \frac{f_i}{f_a}$$

em que:

F_d^a - Factor de correcção da sensibilidade das portas na data da análise das amostras

F_d^o - Factor de porta corrigido de uma determinada escala, na data da calibração principal

f_i - Fluorescência da solução de feofitina a (padrão secundário) numa escala intermédia, na data da calibração

f_a - Fluorescência da solução de feofitina a (padrão secundário) numa escala intermédia, na data da análise das amostras

2.8) Análise fluorimétrica para determinação da proporção RNA/DNA

Para determinar a condição das fêmeas adultas e a qualidade dos oócitos por si produzidos usou-se a proporção RNA/DNA presente nos oócitos e nos tecidos das fêmeas, através de técnicas fluorimétricas descritas por Clemmesen, (1990) e Esteves *et al.*, (2000) e aplicadas já na determinação do estado nutricional de larvas de sardinha (Chícharo, 1998a; Chícharo, 1998b). Em cada fêmea classificada

macroscopicamente em estágio 4, i.e. em desova (com oócitos hidratados), foi retirada uma porção do músculo na região dorsal e uma porção das gónadas (aproximadamente de 100 a 500 oócitos). Os dois tecidos foram colocados em “ependorfs” de cores diferentes com o mesmo número e conservados em azoto líquido. Recolheram-se tecidos de 82 fêmeas em estágio 4, as quais foram também classificadas com os seguintes dados biológicos: comprimento (cm), peso total (g), peso eviscerado (g), gordura e peso das gónadas. Em 18 destas 82 amostras não foi possível fazer corresponder os dados biológicos aos músculos e respectivos oócitos devido a um erro de amostragem.

Utilizou-se cerca de 0.06 g de peso de músculo para realizar a extracção dos ácidos nucleicos e cerca de 0.004 g de peso de oócitos. Os cerca de 0.004 g de oócitos por cada gónada utilizados para a análise correspondem a cerca de 5 a 10 oócitos, aproximadamente, como foi observado no microscópio estereoscópico. Para isolar os oócitos das restantes células da gónada foi utilizado um crivo de 200 μm , passando-os por água destilada.

Utilizaram-se para a determinação dos ácidos nucleicos técnicas fluorimétricas diferentes para cada tecido, 1) baseada em Chícharo *et al.* (2001) para os oócitos e 2) baseado em Clemmesen (1990) para o músculo. Os protocolos encontram-se em anexo (Anexo I e II, respectivamente). Inicialmente experimentou-se em ambos os tecidos o protocolo I. No entanto, os resultados obtidos para o músculo de sardinha não foram satisfatórios (obtendo-se na maioria dos casos valores de concentração de RNA negativos). A técnica fluorimétrica utilizada para o músculo acrescentou, em relação à técnica utilizada para os oócitos, dois passos de extracção com soluções de Fenol, Clorofórmio e Álcool Isoamílico. As técnicas fluorimétricas utilizadas para a extracção dos ácidos nucleicos dos oócitos do músculo são comparáveis entre si (Esteves *et al.*, 2000).

Antes da análise dos tecidos foi construída uma curva de calibração com amostras padrão de DNA e RNA, para a fazer corresponder aos posteriores valores de fluorometria uma determinada concentração de ácidos nucleicos. Este procedimento foi repetido no início de cada semana de análise devido à sensibilidade da técnica às condições ambientais. Para a determinação da quantidade de RNA e DNA no músculo e nos oócitos as amostras foram retiradas do azoto líquido e colocadas em gelo picado. Inicialmente foram testados vários pesos dos tecidos, usando para isso 5

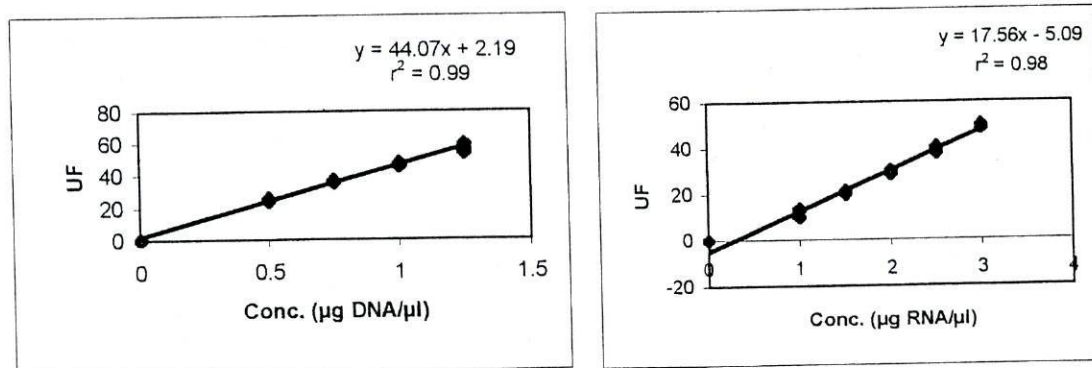
amostras de oócitos e de músculos incluídos no grupo de 18 com problemas de amostragem, tentando atingir um valor dentro dos valores estabelecidos pela recta de calibração.

Os oócitos foram extraídos em 0.15 ml de sarcosina 1% num tampão de Tris-EDTA congelado. Após sonicar, agitar e centrifugar (5min, 2500x g, 0-4°C), diluíram-se as amostras em Tris-EDTA congelado para chegar a uma concentração final de 0.1%. Determinaram-se então os valores de fluorescência usando brometo de etídeo (EB), um fluorocromo específico dos ácidos nucleicos que se liga às bases citosina-guanina que existem no DNA e no RNA. Determinou-se especificamente a fluorescência de RNA + DNA, ou seja, de ácidos nucleicos totais e de DNA através de um tratamento com ribonuclease A (incubação por 30 minutos a 37°C). A fluorescência ou quantidade de RNA foi estimada pela diferença entre o valor de RNA + DNA e de DNA.

No caso do músculo, a extracção dos ácidos nucleicos seguiu os mesmos passos do procedimento anterior até à diluição em Tris-EDTA, ao qual se seguiram mais dois passos de extracção, o primeiro em 0.6 ml de uma solução de Fenol:Clorofórmio:Ácido Isoamílico e o segundo em 0.3 ml de uma solução de Clorofórmio e Ácido Isoamílico. Os valores de fluorescência foram determinados utilizando o fluorocromo do protocolo anterior.

As rectas de calibração realizadas no dia das experiências e construídas através dos padrões de DNA e RNA estão representadas na Figura 2. Estas rectas permitem relacionar a concentração de ácidos nucleicos com as unidades de fluorescência lidas no fluorímetro.

Figura 2: Rectas de calibração do DNA e RNA padrão.



2.9) Tratamento de dados

Os gráficos e a maior parte do tratamento estatístico deste trabalho foram realizados no programa de estatística R, versão 1.5. Foram realizadas regressões entre vários parâmetros alimentares e entre o índice RNA/DNA do músculo e oócitos das fêmeas adultas e testes-t para a comparação das médias dos parâmetros alimentares entre áreas e épocas. Estes procedimentos seguiram a metodologia estatística descrita por Zar (1996).

A análise dos dados organizados em tabelas de contingência para analisar a distribuição dos itens alimentares nos vários graus de digestão seguiram a metodologia estatística descrita em Everitt (1977) para tabelas multidimensionais.

3 - RESULTADOS

3 - RESULTADOS

3.1) Variáveis Biológicas

As variáveis biológicas dos 100 indivíduos destinados à *análise individual* dos conteúdos estomacais estão resumidas na Tabela 3. Selecionaram-se em cada amostra indivíduos com aproximadamente 20 cm de comprimento (coeficiente de dispersão amostral para o comprimento igual a 0.01), o que corresponde a uma idade igual ou superior a dois anos. Para estes indivíduos o peso varia entre as estações do ano amostradas, sendo maior no Verão do que na Primavera, tanto em Peniche como em Portimão (cerca de mais 28% de peso médio no Verão). O mesmo se observa no índice de gordura (classificado macroscopicamente de 1 a 4 em ordem crescente de gordura), que diminui consideravelmente do Verão até à Primavera. O peso das gónadas é maior na Primavera (época de desova) do que no Verão nas duas zonas, diminuindo, no entanto, no final da Primavera (amostra de Março/Abril) em Peniche (indicando provavelmente o final da época de desova para os indivíduos desta zona).

O peso do conteúdo estomacal representou entre 0.05 e 2.3% do peso eviscerado do indivíduo (entre 0.05 e 2.08% se considerado o peso total do indivíduo), variando entre 0.04 g registado em dois estômagos do Verão (Peniche e Portimão) e 1.22 g de um estômago encontrado em Peniche no final da Primavera (coeficiente de dispersão amostral igual a 1.05). O peso dos conteúdos é menor nas amostras de Verão e é especialmente elevado no final da Primavera, quando existem vários estômagos com pesos de conteúdos em redor de 1g.

O peso das paredes do estômago aumentou com o peso dos indivíduos (peso eviscerado). A proporção de peso das paredes do estômago em relação ao peso eviscerado do indivíduo foi, no entanto, diferente para os três conjuntos de amostras, sendo cerca de 0.41% no Verão, 0.54% no início da Primavera e 0.93% no final da Primavera. O peso das paredes do estômago esteve também positivamente correlacionado com o peso dos conteúdos estomacais ($r^2=0.739$). Todavia, existe uma diferença de aproximadamente 0.2 g (cerca de 40%) entre o peso das paredes dos estômagos do final da Primavera (significativamente mais cheios) e os restantes deste estudo.

Tabela 3 - Variáveis biológicas dos indivíduos seleccionados para a análise individual dos estômagos.

Variáveis		Portimão Ago/Set	Peniche Ago/Set	Portimão Fev/Mar	Peniche Fev/Mar	Portimão Mar/Abr	Peniche Mar/Abr
Comprimento (cm)	min.	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
	mediana	20.5	20.3	20.5	20.5	20.5	20.4
	média	20.7	20.4	20.5	20.5	20.5	20.4
	máx.	22.6	21.5	20.8	20.8	21.0	20.9
Peso (g)	min.	73.2	70.6	55.3	50.2	46.9	50.5
	mediana	85.7	75.4	61.2	56.1	60.2	59.7
	média	87.4	77.1	61.3	56.2	58.6	59.9
	máx.	110.0	97.7	65.4	59.3	65.0	69.4
Peso eviscerado (g)	min.	63.1	62.7	49.2	47.5	43.1	46.3
	mediana	75.3	67.4	54.8	50.9	53.3	52.3
	média	76.1	69.0	54.8	50.6	52.5	52.8
	máx.	97.4	87.4	57.6	52.9	58.0	61.6
Sexo	M	12	13	5	8	8	4
	F	13	12	7	4	5	9
Estado de maturação	min.	1	1	5	5	4	2
	moda	5	5	6	6	6	5
	máx.	6	6	6	6	6	6
Índice de Gordura	min.	3	2	1	1	1	1
	moda	4	3	1	1	1	1
	máx.	4	4	1	1	1	1
Peso das gónadas (g)	min.	0.0	0.0	0.9	1.0	0.2	0.4
	mediana	1.0	2.0	2.0	1.9	1.5	2.2
	média	1.6	1.6	1.9	1.6	1.0	1.8
	máx.	9.0	3.0	3.0	3.3	4.5	5.1
Peso do estômago cheio (g)	min.	0.50	0.28	0.40	0.33	0.69	0.79
	mediana	0.64	0.40	0.50	0.44	0.94	1.15
	média	0.65	0.39	0.53	0.44	1.01	1.80
	máx.	0.89	0.54	0.91	0.66	1.44	1.82
Peso do estômago vazio (g)	min.	0.23	0.20	0.21	0.21	0.32	0.40
	mediana	0.30	0.31	0.28	0.30	0.47	0.49
	média	0.31	0.29	0.28	0.29	0.48	0.50
	máx.	0.44	0.34	0.35	0.37	0.64	0.60
Peso do conteúdo (g)	min.	0.04	0.04	0.05	0.11	0.24	0.38
	mediana	0.10	0.08	0.09	0.15	0.54	0.66
	média	0.10	0.08	0.11	0.17	0.53	0.67
	máx.	0.19	0.15	0.27	0.31	1.02	1.22

Nas amostras de Fevereiro/Março de ambas as zonas foram analisados os dados biológicos e peso dos estômagos de todos os indivíduos da amostra do IPIMAR (cerca de 100 para cada zona). Na amostra de Portimão o comprimento variou de 14.3 a 23 cm, sendo em média 18.7 cm, enquanto em Peniche variou de 16 a 22 cm, sendo em média 18.9 cm. Tal como ocorreu para os estômagos de todas as amostras analisadas, existe também uma correlação entre o peso das paredes do estômago e o peso eviscerado dos indivíduos ($r^2 = 0.58$), como se pode observar na Figura 3. A correlação entre o peso das paredes dos estômagos e o peso do conteúdo estomacal dos indivíduos da Primavera (Figura 4) é menos evidente quando comparados do que entre todas as amostras, embora seja significativa, o que deverá ser consequência da menor variação no peso dos conteúdos e das paredes do estômago entre os indivíduos da mesma amostra.

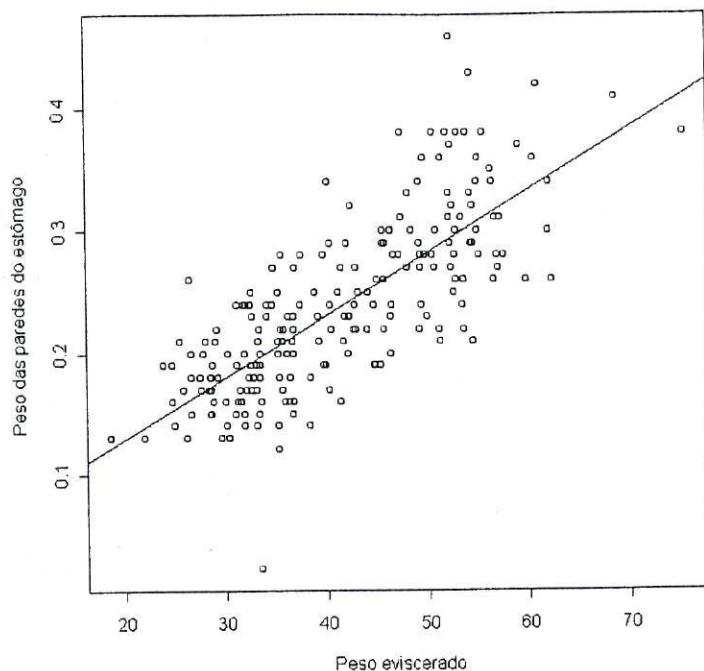


Figura 3 - Relação entre o peso das paredes do estômago (g) e o peso eviscerado dos indivíduos (g) das amostras do início da Primavera. Recta de regressão linear: $y=0.02+0.005x$ ($r^2=58\%$, $p<2*10^{-16}$).

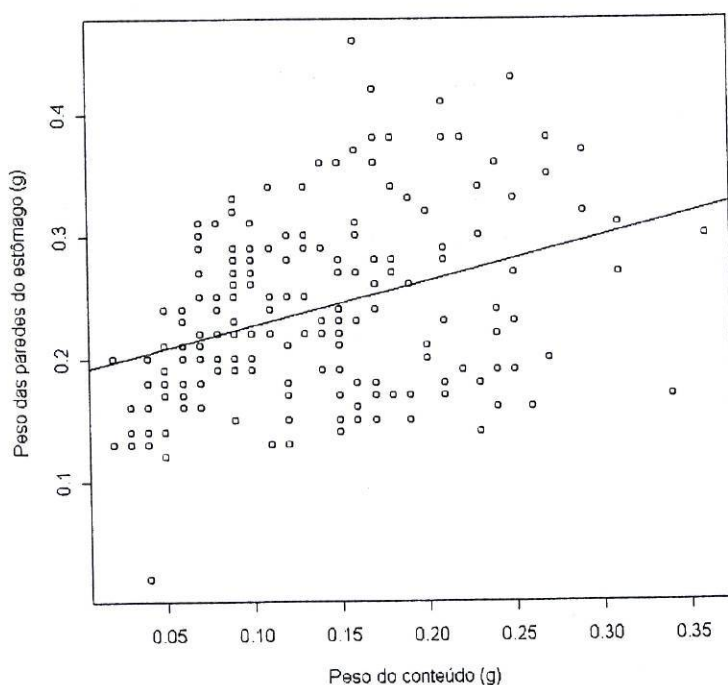


Figura 4 - Relação entre o peso das paredes do estômago (g) e o peso do conteúdo (g) dos indivíduos das amostras do início da Primavera. Excluíram-se 3 valores de peso do conteúdo superior a 0.5. Recta de regressão linear: $y=0.19+0.36x$ ($r^2=13\%$, $p = 1.4*10^{-7}$).

3.2) Análise qualitativa da dieta alimentar (amostras conjuntas)

Nas Tabelas 4 e 5 está representada a frequência relativa dos itens alimentares nos estômagos analisados, em termos de número de indivíduos e de biovolume para cada zona e período de amostragem. A Tabela 6 apresenta um resumo das listagens anteriores, discriminando os taxa mais abundantes dentro de cada um dos grandes grupos (fito, zoo e ictioplâncton). Em anexo encontram-se as tabelas referentes ao número médio de indivíduos por estômago (Anexo III) e o biovolume total (Anexo IV) e médio (Anexo V) dos organismos em cada uma das amostras.

À exceção da zona de Portimão no Verão, o fitoplâncton foi sempre o grupo mais abundante nos estômagos analisados, chegando a representar no início da Primavera mais de 80% do número de itens alimentares. A maior abundância relativa do zooplâncton nos estômagos ocorreu no Verão, principalmente na zona de Portimão. Esta zona, aliás, teve sempre maior número de itens zooplanctônicos, quando comparadas as mesmas datas de Peniche, enquanto o fitoplâncton foi sempre mais abundante em Peniche. O ictioplâncton esteve apenas representado nos estômagos de Peniche durante o Verão e no início da Primavera, numa frequência de cerca de um ovo de peixe por estômago.

No que respeita aos organismos fitoplanctônicos, os dinoflagelados ocorreram em todos os conjuntos de estômagos, ao contrário das diatomáceas, praticamente ausentes nos estômagos de Verão. Os dinoflagelados dominam assim claramente no Verão, sendo principalmente representados pelos géneros *Dinophysis* spp. e *Protoberidinium* spp., enquanto nos meses de Primavera dominaram as diatomáceas em cadeia em ambas as zonas. Ao contrário, em termos de biovolume, os dinoflagelados foram sempre mais importantes do que as diatomáceas, principalmente devido ao maior tamanho das espécies de *Protoberidinium* em relação aos restantes organismos fitoplanctônicos. Um terceiro grupo fitoplanctónico denominado “fitoplâncton não identificado” e representado maioritariamente por células esféricas autotróficas é também muito abundante nos meses de Primavera em ambas as zonas (representando cerca de 20% do número total de itens nos estômagos) embora em termos de biovolume contribuam apenas em cerca de 2%.

Em todos os conjuntos de estômagos a principal contribuição do zooplâncton, quer em termos de número de indivíduos quer em termos de biovolume, é por parte dos copépodes (incluindo adultos e outros estádios de desenvolvimento), embora em

Tabela 4 - Frequência relativa (%) do número de itens alimentares por estômago em cada amostra
Zero corresponde a <0.1 e ausências estão em branco.

Indivíduos F.rel.(nº inds/estom)	Ago/Set (n=25)		Fev/Mar (n=15)		Mar/Abr (n=15)	
	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
Fitoplâncton						
Fitoplâncton n.i.			26.1	23.2	11.4	18.0
Dinoflagelados (Dinophyceae)						
Dinoflagelados n.i.	16.8	7.2	2.8	0.3	3.8	1.3
<i>Dinophysis</i> spp.		0.7				
<i>Dinophysis acuta</i>	0.8	2.5		0.3		0.4
<i>Dinophysis caudata</i>	9.5	33.8	1.7			0.4
<i>Dinophysis tripos</i>		0.5				
<i>Dinophysis rotundata</i>	1.4					
Protoperidinium spp.	1.7	5.4	4.8	2.1	11.4	
<i>Protoperidinium divergens</i>	0.2	2.0	0.6		3.8	
<i>Protoperidinium depressum</i>	2.9	5.7	1.1	0.3	1.3	0.8
<i>Protoperidinium claudicans</i>					1.3	
<i>Protoperidinium diabolium</i>	0.6	0.2				
<i>Protoperidinium globulium</i>	0.2					
<i>Scropsiella</i> spp.	0.8					
<i>Ceratium</i> spp.	2.7	0.2	1.1	1.0	1.3	2.1
<i>Prorocentrum micans</i>	0.4	1.0				
Quisto dinoflagelado	0.2	1.0			1.3	
Diatomáceas (Bacillariophyceae)						
Diatomáceas n.i.			2.8	3.1	2.5	2.5
Diatomáceas cadeia			1.7		1.3	
<i>Coscinodiscus</i> spp.	0.8		1.1	2.4		1.3
<i>Thalassiosira</i> spp.	0.2		1.1	4.2	2.5	2.1
<i>Dictyoneis</i> spp.			0.8			
<i>Diploneis</i> spp.			2.3		1.3	6.7
<i>Navicula</i> spp.			3.4	0.7		4.2
Pleurosigma/Gyrosigma			0.6	0.3		2.5
<i>Paralia sulcata</i>			25.0	45.3	12.7	8.4
<i>Rhizosolenia</i> spp.			1.1	0.3		
<i>Surirella</i> spp.			1.7			
<i>Triceratium</i> spp.			0.6			0.8
<i>Trachyneis</i> spp.			0.8			
<i>Odontella</i> spp.					1.3	
<i>Thalassionema</i> spp.				2.1		8.3
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.				0.7		14.2
<i>Planktoniella sol</i>				0.3		
<i>Nitzschia</i> spp.				0.3		
Pinulada			1.7			2.1
Zooplâncton						
Crustacea						
Crustaceo n.i.			0.6			
ovo de crustáceo	0.8		1.7	3.9	0.0	10.9
Copepoda						
Ovo de cópode	32.7	28.1		2.8	5.1	6.7
nauplio de cópode	2.9	2.2	2.8	2.4	16.5	2.5
Copepodes n.i.	7.1	5.3	3.4	0.2	2.8	1.2
<i>Euterpina</i> spp.	0.4	0.2	0.8	0.2		0.3
Harpacticoida n.i.	1.1	0.1	0.8	0.0	3.3	0.1
<i>Microsetella</i> spp.		0.1	0.1	0.0	0.1	
<i>Oncaea</i> spp.	3.2	3.2	2.7	0.2	2.8	0.3
<i>Oithona</i> spp.	0.6	1.0			2.6	0.0
<i>Corycaeus</i> spp.					0.3	0.0
Calanus/Paracalanus/Clausocalanus		0.1	0.0	0.0	0.1	
<i>Temora</i> spp.		0.3			0.2	
<i>Temora longicornis</i>	0.1				0.2	
<i>Centropages</i> spp.	0.8	0.4		0.0	0.0	
<i>Centropages chierchiae</i>	0.8					
<i>Acarthia</i> spp.	0.1					
<i>Pleurommama</i> spp.	0.0				0.0	
<i>Candacia</i> spp.		0.0				
Cirripedia			1.3			
Cladocero		0.0				
<i>Penilia</i> spp.	0.1				0.0	
Decapoda	0.0	0.0				
Ostracoda			0.0	0.1	0.2	0.0
Mollusca	0.0		0.0			
Gastropoda				0.0		0.0
Tintinnoinea	0.2	0.3	0.6	0.3	2.5	
Appendicularia					1.3	0.0
Ictoplâncton						
ovo peixe		0.0		0.0		
Escama de peixe	0.0	0.1	0.0			
Quisto mucilaginoso	2.7		1.7	2.4	3.8	0.8
Grão de pólen	0.2		1.1		1.3	2.9
Células esféricas n.i.	7.4					
total	100	100	100	100	100	100

Tabela 5 - Frequência relativa (%) do biovolume dos itens alimentares por estômago em cada amostra
Zero corresponde a <0.1 e ausências estão em branco.

Indivíduos Freq.rel.biovol*n°spp/estomag	Ago/Set (n=25)		Fev/Mar (n=15)		Mar/Abr (n=15)	
	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
Fitoplâncton						
Fitoplâncton n.i.			1.5	1.6	1.2	2.5
Dinoflagelados (Dinophyceae)						
Dinoflagelados n.i.	0.3	0.6	0.5	0.2	0.7	0.1
<i>Dinophysis</i> spp.		0.0				
<i>Dinophysis acuta</i>	0.0	0.3		0.2		0.2
<i>Dinophysis caudata</i>	0.3	3.4	0.3			0.3
<i>Dinophysis tripos</i>		0.0				
<i>Dinophysis rotundata</i>	0.0					
<i>Protoperidinium</i> spp.	0.3	3.0	2.9	1.7	3.3	
<i>Protoperidinium divergens</i>	0.1	0.9	3.4		5.7	
<i>Protoperidinium depressum</i>	0.9	4.5	0.9	2.3	1.8	5.1
<i>Protoperidinium claudicans</i>					0.5	
<i>Protoperidinium diabolium</i>	0.0	0.1				
<i>Protoperidinium globulum</i>	0.0					
<i>Scipsiella</i> spp.	0.0					
<i>Ceratium</i> spp.	0.1	0.0	0.8	0.6	0.2	1.8
<i>Prorocentrum micans</i>	0.0	0.1				
Quisto dinoflagelado	0.0	0.0			0.0	
Diatomáceas (Bacillariophyceae)						
Diatomáceas n.i.			0.9	0.0	0.7	0.6
Diatomáceas cadeia			0.1		0.0	
<i>Coscinodiscus</i> spp.	0.1		1.2	1.6		1.3
<i>Thalassiosira</i> spp.	0.0		0.1	0.3	0.0	0.5
<i>Dictyoneis</i> spp.			0.0			
<i>Diploneis</i> spp.			0.1		0.0	0.1
<i>Navicula</i> spp.			0.1	0.0		0.4
Pleurosigma/Gyrosigma			0.1	0.1		0.5
<i>Paralia sulcata</i>			0.1	0.3	0.0	0.1
<i>Rhizosolenia</i> spp.			0.0	0.0		
<i>Surirella</i> spp.			0.1			
<i>Triceratium</i> spp.			0.1			0.2
<i>Trachyneis</i> spp.			1.0			
<i>Odontella</i> spp.					0.2	
<i>Thalassionema</i> spp.				0.0		0.0
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.				0.0		0.1
<i>Planktionella sol</i>				0.0		
<i>Nitzschia</i> spp.				1.2		
Pinulada			0.0			0.0
Zooplâncton						
Crustacea						
Crustaceo n.i.			2.8			
ovo de crustaceo	0.3		1.1	7.2	0.1	17.3
Copepoda						
Ovo de copépode	1.5	6.8		1.7	1.0	7.8
nauplio de copepode	0.5	0.9	5.3	2.6	0.2	6.0
Copepodes n.i.	10.3	20.2	14.5	4.8	9.7	20.2
<i>Euterpina</i> spp.	0.5	1.3	15.4	6.2		9.9
Harpacticoida n.i.	2.3	0.3	6.7	1.0	13.4	2.8
<i>Microsetella</i> spp.		0.4	0.6	0.4	1.0	
<i>Oncaea</i> spp.	4.0	13.7	29.8	5.1	12.5	10.5
<i>Oithona</i> spp.	0.8	2.9			1.0	0.4
<i>Corycaeus</i> spp.					15.9	0.8
Caianus/Paracalanus/Clausocalanus		6.6	0.2	3.2	2.9	
<i>Temora</i> spp.		13.3			9.2	
<i>Temora longicornis</i>	1.3				9.2	
<i>Centropages</i> spp.	27.8	6.6		2.3	2.3	
<i>Centropages chierchiae</i>	46.7					
<i>Acarthia</i> spp.	0.7					
<i>Pleurommama</i> spp.	0.5				1.1	
<i>Candacia</i> spp.		0.4				
Cirripedia			6.3			
Cladocero		0.4				
<i>Penilla</i> spp.	0.3				0.2	
Decapoda	0.1	0.2			5.3	1.5
Ostracoda			1.4	5.2		
Mollusca	0.1	0.0	0.4			
Gastropoda				1.8		3.4
Tintinnoinea	0.0	0.1	0.1	0.3	0.2	
Appendicularia					0.1	0.3
Ictioplâncton						
ovo peixe		12.7		48.2		
Escama de peixe	0.0	0.0	0.0			
Quisto mucilaginoso	0.0		0.9	0.1	0.3	0.1
Grão de poeja	0.0		0.7		0.1	5.2
Células esféricas n.i.	0.1					
total	100	100	100	100	100	100

Tabela 6 - Frequência relativa (FR) do número e biovolume dos grandes grupos de itens alimentares por estômago em cada amostra. Zero representa ausência ou uma frequência relativa inferior a 1%

Variável	Grupos	Ago/Set (n=25 cada)		Fev/Mar (n=15 cada)		Mar/Abr (n=15 cada)	
		Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
FR nº indivíduos	Fitoplâncton	39	60	82	87	57	74
	Dinoflagelados (Dinophyceae)	38	60	12	4	24	5
	Dinophysis spp.	12	38	2	0	0	1
	Protoperidinium spp.	6	13	6	2	18	1
	Diatomáceas (Bacillariophyceae)	1	0	44	60	22	51
	Zooplâncton	50	39	15	10	38	22
	Crustacea	50	39	14	10	34	22
	Copepoda	49	39	11	6	34	11
	outro zooplâncton	0	1	0	4	0	0
	Ictioplâncton	0	0	0	0	0	0
FR biovolume	Fitoplâncton	2	13	14	10	14	14
	Dinoflagelados (Dinophyceae)	2	13	9	5	12	7
	Dinophysis spp.	0	4	0	0	0	0
	Protoperidinium spp.	1	8	7	4	11	5
	Diatomáceas (Bacillariophyceae)	0	0	4	4	1	4
	Zooplâncton	98	74	84	41	85	81
	Crustacea	97	74	84	40	85	77
	Copepoda	97	74	72	27	79	58
	outro zooplâncton	0	0	0	2	0	4
	Ictioplâncton	0	13	0	48	0	0

Tabela 7 - Frequência relativa do micro e mesoplâncton nos estômagos por amostra

Variável	Fracção	Ago/Set (n=25 cada)		Fev/Mar (n=15 cada)		Mar/Abr (n=15 cada)	
		Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
F. rel. nº indivíduos	microplâncton (<200 µm)	88	85	96	99	91	99
	mesoplâncton (>200 µm)	12	15	4	1	9	1
F. rel. biovolume	microplâncton (<200 µm)	68	18	38	19	19	54
	mesoplâncton (>200 µm)	32	82	62	81	81	46

termos de número de itens dominem os ovos de copépodes e em termos de biovolume dominem os copépodes adultos. Destacam pela sua abundância *Oncaea* spp. e Harpacticoida, embora em termos de biovolume vários Calanóides passem também estar entre os mais representativos. Para além dos copépodes, outros crustáceos como Cirrípedos, Cladóceros, Decápodes e Ostracodes estiveram presentes nos estômagos analisados, embora com uma baixa frequência relativa. Com menor abundância no zooplâncton surgiram também Moluscos, Tintinídeos e Apendiculários.

Apesar da frequência em número consideravelmente baixa do ictioplâncton nas duas amostras em que ocorre, atinge quase metade do biovolume total dos itens alimentares nos estômagos de Fevereiro/Março, onde em número de indivíduos tinham dominado as diatomáceas em cadeia. Para calcular o biovolume dos ovos utilizou-se o diâmetro total da cápsula, que tem um biovolume superior às diatomáceas encontrados em cerca de 4 ordens de grandeza.

Comparando a contribuição das fracções de micro e mesoplâncton (Tabela 7), separadas a 200 μm , a fracção de microplâncton domina em todas as amostras com mais de 85% do número total de itens nos estômagos, embora em termos de biovolume a fracção de mesoplâncton domine em todos os conjuntos excepto em Peniche no final da Primavera, quando os ovos de crustáceos e estádios iniciais de desenvolvimento de copépodes foram muito abundantes.

O espectro do comprimento maior (ou diâmetro, no caso dos itens aproximadamente esféricos) dos itens alimentares variou desde 18.8 μm das células de *Paralia sulcata* e do grupo de fitoplâncton não identificado, ambos ocorrendo nas duas zonas durante a Primavera, até 1560 μm do copépoide *Centropages chierchiae*, encontrado no final da Primavera em Portimão. O comprimento médio dos itens de Verão foi de 116 μm para Peniche e 109 μm para Portimão, sendo em média menor nos meses de Primavera, quando a abundância de fitoplâncton foi maior. Os itens alimentares de Peniche tiveram em média um comprimento maior de 46.7 μm no início da Primavera e em Portimão para a mesma data 68.8 μm . No final da Primavera o comprimento médio foi de 68.3 μm para Peniche e 122.9 μm para Portimão.

3.3) Análise quantitativa da dieta alimentar

3.3.1) Número de itens e biovolume

3.3.1.1) Diferenças entre a análise de conjuntos e de estômagos individuais

Por forma a examinar se o número de itens por estômago estimado através da *análise individual* e da *análise de conjuntos* produz resultados semelhantes, compararam-se os valores obtidos pelos dois métodos, em termos de número total de itens por estômago e da proporção de grandes grupos (fito, zoo e ictioplâncton). Comparou-se o número de itens obtido através da análise dos conjuntos com a média de itens presentes nos estômagos individuais por amostra (Tabela 8).

Tabela 8 - Diferenças no número e biovolume (mm³) de itens alimentares por estômago entre a análise de conjuntos e de estômagos individuais.

Variável	Amostra	Total itens		Fitoplâncton		Zooplâncton		Ictioplâncton	
		Individual	Conjunto	Individual	Conjunto	Individual	Conjunto	Individual	Conjunto
Nº. itens	Portimão	3291	3226	1693	1263	1593	1629	5	0
	Ago-Set								
	Peniche	2515	2628	1627	1588	886	1036	4	0
	Portimão	2255	3518	1358	2898	776	519	4	1
	Fev-Mar								
	Peniche	3850	3264	2964	2847	732	338	13	1
Biovolume	Portimão	3.6	8.5	0.3	0.2	2.2	8.2	1.1	0.0
	Ago-Set								
	Peniche	1.5	2.6	0.4	0.3	0.5	2.0	0.7	0.0
	Portimão	2.1	1.3	0.1	0.2	1.4	1.1	0.4	0.4
	Fev-Mar								
	Peniche	1.9	0.9	0.1	0.1	1.5	0.4	0.4	0.0
Biovolume	Portimão	48.8	6.0	0.6	0.9	14.2	5.1	33.9	0.3
	Mar-Abr								
	Peniche	2.9	4.2	0.9	0.6	1.3	3.4	0.6	0.0
	Portimão								
	Fev-Mar								
	Peniche								

Em termos do número total de itens por estômago, a diferença entre os resultados obtidos através da análise individual e dos conjuntos é relativamente baixa na maioria das amostras (entre 2 e 15%), à excepção de Peniche no final da Primavera (26%) e Portimão no início da Primavera (36%). O número total de organismos fitoplanctónicos obtido através dos dois métodos de contagem é semelhante em Peniche no Verão e início da Primavera (2% e 4% de diferença). Em Portimão no Verão e em ambas as zonas no final da Primavera o número de indivíduos contados

através de estômagos individuais é cerca de 30% maior. Em Portimão durante a Primavera as contagens nos conjuntos foi mais de 50% maior do que nos estômagos individuais. O total de itens de zooplâncton estimado através das duas medições é razoavelmente semelhante durante o Verão e final da Primavera em Peniche (entre 2 e 14%), sendo cerca de 30 % maior a estimacão individual na zona de Portimão durante a Primavera. A maior diferença entre estimacões de zooplâncton ocorre no início da Primavera em Peniche, com cerca de 50% mais zooplâncton estimado através das contagens individuais.

A diferença mais importante ocorre no ictioplâncton. Em todos os casos as contagens em estômagos individuais estimaram uma maior quantidade de ictioplâncton do que a contagem dos conjuntos. Trata-se de um grupo pouco abundante, comparativamente aos dois anteriores, cujo erro associado à sub-amostragem é maior. Nos conjuntos este grupo apenas foi contabilizado no início da Primavera nas duas zonas, numa proporção de 1 ovo por estômago enquanto na contagem individual varia entre 2 e 5 na maioria das zonas, o que, em relação ao número total de itens representa uma diferença consideravelmente pequena. No entanto, na zona de Portimão em Fevereiro-Março este grupo aumentou para cerca de 90 indivíduos por estômago pela contagem individual, enquanto na estimacão por conjunto nenhum ovo de peixe foi contabilizado.

As Figuras 5.1 e 5.2 representam a variação dos parâmetros alimentares dos estômagos da análise individual (caixas com bigodes) de cada amostra em comparação com os valores obtidos para os mesmos parâmetros na análise dos conjuntos. Em termos de número de itens (Fig. 5.1), a média das duas análises foi muito aproximada, excepto na amostra de Portimão do início da Primavera, em que a análise dos conjuntos estimou um número total de presas fitoplanctónicas superior. A média de presas zoo e ictioplanctónicas foi semelhante entre os dois métodos para todas as amostras. Em termos de biovolume médio de itens por estômago (Fig.5.2) existe um afastamento maior entre os valores estimados pelos dois métodos, sendo desta vez o biovolume de fitoplâncton o que mais se aproximou na estimacão pelos dois métodos. A única amostra em que o biovolume estimado através dos conjuntos não está dentro dos valores da análise individual foi a de Peniche do Verão, em que a análise dos conjuntos estimou um biovolume de zooplâncton superior.

Em termos de proporção de fito e zooplâncton, os valores obtidos são aproximados nas duas análises, embora haja uma tendência para o fitoplâncton ser

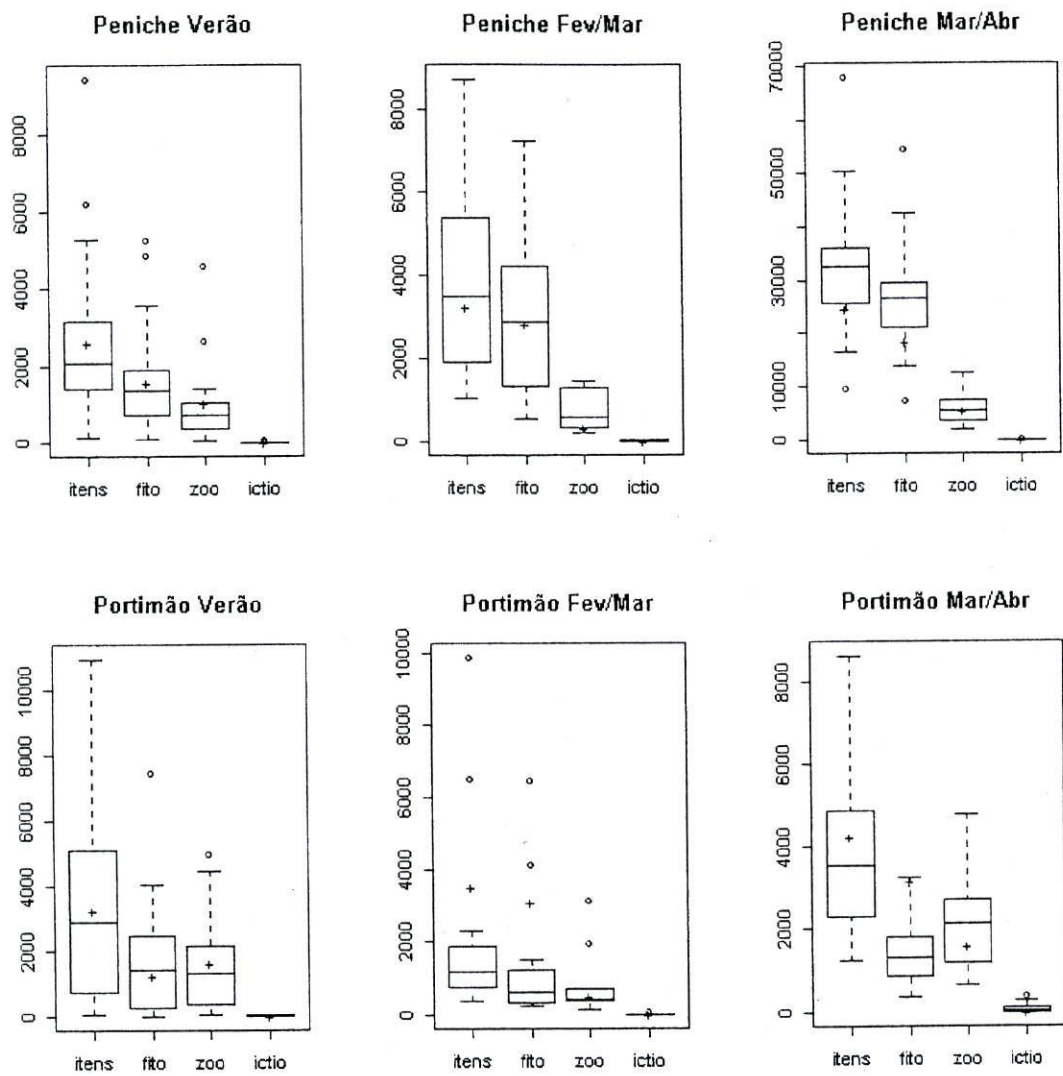


Figura 5.1 - Análise comparativa dos parâmetros alimentares (número total de itens por estômago, número de itens fitoplânctônicos, número de itens zooplânctônicos e número de itens ictioplânctônicos) estimados através da análise individual (caixas com bigodes) e da análise dos conjuntos (+). Os círculos representam outliers.

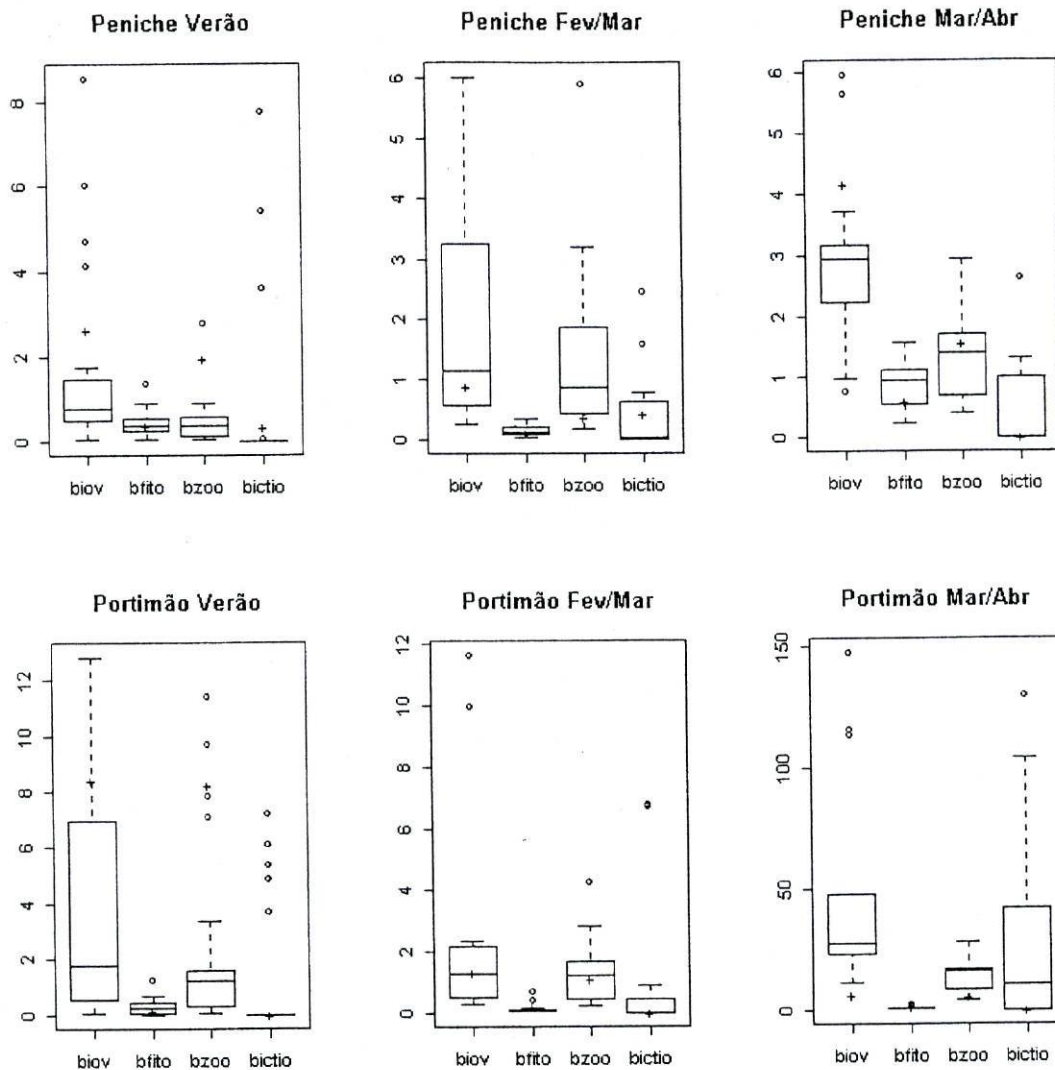


Figura 5.2 - Análise comparativa dos parâmetros alimentares (biovolume total de itens por estômago, biovolume de itens fitoplanctônicos, biovolume de itens zooplanctônicos e biovolume de itens ictioplanctônicos) estimados através da análise individual (caixas com bigodes) e da análise dos conjuntos (+). Os círculos representam outliers.

subestimado e o zooplâncton sobrestimado. Comparou-se também a nível qualitativo os resultados obtidos pelas duas análises e os resultados são muito semelhantes, principalmente para os grupos mais abundantes (*e.g.* copépodes, diatomáceas, dinoflagelados). A diferença mais significativa ocorre com os ovos de copépodes durante o Verão, que ultrapassam os 700 por estômago em ambas as amostras no que respeita à análise dos conjuntos embora em termos individuais se aproxime de 200 por estômago.

Nos conjuntos foram utilizados outros conteúdos para além das fracções de conteúdos da *análise individual*. Utilizaram-se para os conjuntos mais 2 estômagos completos na Primavera, mais 5 para o conjunto de Portimão durante o Verão e mais 12 para Peniche em Agosto-Setembro. O facto de se ter utilizado outros estômagos da mesma amostra não parece ter interferido com os resultados gerais, já que no Verão o resultado obtido com as duas contagens é o mais próximo.

Tabela 9 - Fracção (%) do peso dos conteúdos estomacais utilizada para a contagem dos itens alimentares na análise individual e dos conjuntos.

Amostra		microplâncton		mesoplâncton	
		Individual	Conjunto	Individual	Conjunto
Portimão	Ago-Set	7.9	0.5	23.7	3.1
Peniche		7.1	0.4	21.3	2.9
Portimão	Fev-Mar	7.5	0.3	41.3	10.5
Peniche		6.3	0.6	48.1	24.6
Portimão	Mar-Abr	4.5	0.1	12.8	3.8
Peniche		1.0	0.1	37.2	2.7

Não parece haver uma tendência para que uma análise estime mais itens do que outra, excepto no caso do número de itens ictioplanctónicos. Seria menos grave um método estimar sempre mais do que outro se a diferença fosse muito baixa do que existirem, como se passa nalguns casos deste estudo, diferenças superiores a 50% de maior número de itens totais estimados por um dos métodos. A principal razão para esta grande diferença parece ser o facto da fracção de estômagos cujos itens foram realmente contabilizados foi diferente entre os dois processos de contagem, sendo sempre maior no caso das contagens em estômagos individuais e na fracção de mesoplâncton (Tabela 9). A percentagem de peso de estômago analisado em termos de microplâncton foi também menor já que estes indivíduos foram mais abundantes.

Nas amostras de início da Primavera a fracção de mesoplâncton contabilizada foi superior às restantes amostras já que estas têm menos mesoplâncton, o que tornou necessário contar uma maior fracção de conteúdo para atingir a contagem de 300 itens definida à partida para as contagens dos conjuntos. Tendo em conta que a análise individual dos estômagos contou uma maior proporção dos estômagos deverá ser mais aproximada ao valor real do que a contagem nos conjuntos de estômagos.

3.3.1.2) Variação entre indivíduos da mesma amostra

Pretendeu-se analisar a variabilidade dos parâmetros alimentares entre indivíduos da mesma amostra. Utilizou-se o coeficiente de dispersão amostral ou coeficiente de variação, que divide o desvio padrão pela média (Tabela 10).

Em geral, a variabilidade entre estômagos da mesma amostra é muito grande. O Biovolume total de itens alimentares nos estômagos é o parâmetro em que o coeficiente de dispersão é maior, enquanto o peso do conteúdo tem a menor variabilidade entre estômagos da mesma amostra. O coeficiente de variação do peso do conteúdo é sempre menor em Peniche do que em Portimão, o que não ocorre na variação do número de itens por estômago.

Ao contrário do que acontece com as amostras de Verão e início da Primavera, provenientes de portos comerciais, os indivíduos das amostras de Março-Abril são provenientes do mesmo arrasto pelágico, pelo que se poderia esperar que entre estes indivíduos exista uma menor diferença nos parâmetros alimentares estimados, no caso dos indivíduos dos portos comerciais terem sido capturados em mais do que um cerco. Se isto parece ocorrer no caso da amostra de Peniche, em que o coeficiente de variação é sempre menor do que nas outras amostras (ainda que por vezes com pouca diferença), o mesmo não se passa com a amostra de Portimão, em que este coeficiente é quase sempre maior do que nas restantes amostras.

Tabela 10 - Coeficiente de dispersão amostral de estômagos da mesma amostra para vários parâmetros alimentares.

Coef. de dispersão	Peso conteúdo	Número itens	Fitoplâncton	Zooplâncton	Biovolume	% Fito.	% Zoo.
Portimão Verão	0.40	0.80	0.84	1.09	1.17	0.33	0.44
Peniche Verão	0.33	0.85	1.02	0.84	1.52	0.39	0.19
Portimão Fev/Mar	0.50	0.50	0.76	0.53	0.76	0.24	0.19
Peniche Fev/Mar	0.35	0.60	0.70	0.64	0.89	0.64	0.21
Portimão Mar/Abr	0.40	1.10	1.34	1.21	1.92	0.15	0.24
Peniche Mar/Abr	0.32	0.40	0.46	0.47	0.65	0.19	0.05

A proporção de itens fito e zooplancónicos nos estômagos (0-100%) variou relativamente pouco nos conteúdos da mesma amostra, excepto na amostra de Peniche

no início da Primavera. Mais uma vez os estômagos que apresentaram maior semelhança entre si na proporção de itens por grande grupo foram os indivíduos recolhidos em Peniche no final da Primavera.

3.3.1.3) Diferenças entre amostras

O número de itens alimentares por cada estômago analisado individualmente variou entre 42 registados na zona de Portimão durante o Verão e 67822 registados no final da Primavera na zona de Peniche. Os copépodes e os dinoflagelados são os únicos grupos de organismos que estiveram presentes em todos os estômagos analisados. Os copépodes ocorreram em maior número por estômago em Portimão no Verão e no final da Primavera, representando em média nessas datas 41 e 31% do total de itens alimentares, respectivamente. Os dinoflagelados ocorreram em maior número por estômago em Peniche na amostra de Março-Abril e no Verão nas duas zonas. No entanto, em termos de frequência relativa média, representam apenas 6% dos itens alimentares da amostra de final da Primavera de Peniche e no Verão representam 64 e 41% dos itens alimentares de Peniche e Portimão, respectivamente.

Na Figura 6.1 está representada a variação do peso do conteúdo e número de itens alimentares em cada amostra. O peso dos conteúdos estomacais foi largamente superior no final da Primavera em relação às restantes amostras, o que no caso de Peniche parece ser consequência do maior número de itens fito e zooplanctónicos e em Portimão devido ao maior número de itens zoo e ictioplanctónicos. Em particular, a amostra do final da Primavera em Peniche destaca-se pelo número total de itens, superior numa ordem de grandeza às restantes amostras. O número médio de organismos fitoplanctónicos ronda os 1500 por estômago em todas as amostras excepto em Portimão durante a Primavera, com cerca de 3000 presas em Fevereiro-Março e quase 27000 no final da Primavera em Peniche. O ictioplâncton é sempre pouco frequente (há poucos estômagos com ovos de peixes, raramente ultrapassando os 15 ovos por estômago quando ocorrem), excepto no final da Primavera em Portimão, em que a maioria dos estômagos têm mais de 20 ovos de peixe. Os itens zooplanctónicos são o dobro em Portimão no Verão em relação a Peniche na mesma data (cerca de 1600 e 900, respectivamente). No início da Primavera a quantidade de itens zooplanctónicos é relativamente baixa nas duas zonas, rondando os 750 itens, aumentando nas amostras do final da Primavera, particularmente em Peniche.

Na Figura 6.2 está representada a variação do biovolume dos itens alimentares por estômago em cada amostra. O biovolume total de itens alimentares por estômago variou entre 0.03 mm³ registados em Peniche durante o Verão e 147.7 mm³ de um estômago de Portimão do final da Primavera. Apesar da amostra de Peniche do final

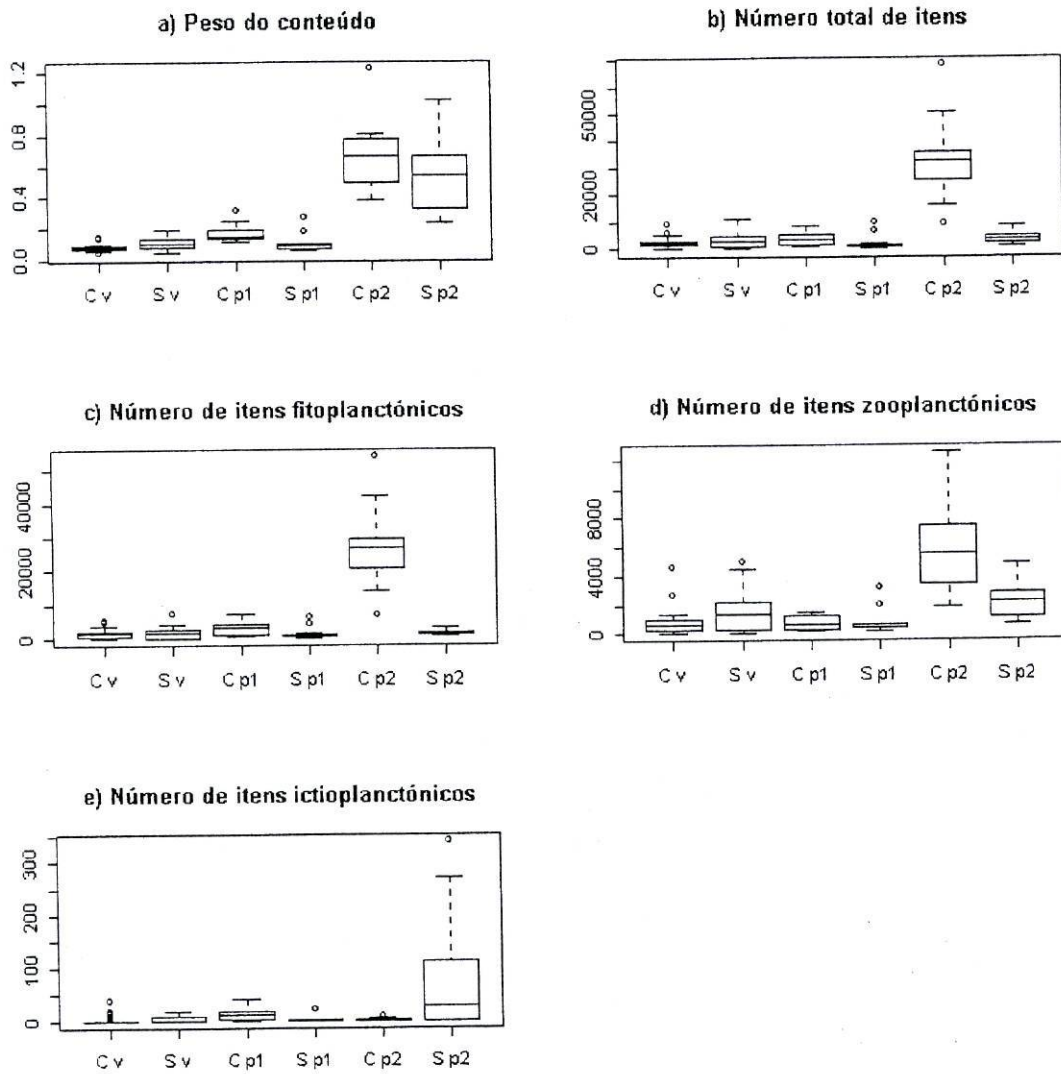


Figura 6.1 - Variação do **a)** peso do conteúdo (g), **b)** número total de itens, **c)** número de itens fitoplanctónicos, **d)** número de itens zooplanctónicos e **e)** número de itens ictioplanctónicos. **C** é relativo a Peniche, **S** a Portimão, **v** ao Verão, **p1** às amostras do início da Primavera e **p2** às do final da Primavera.

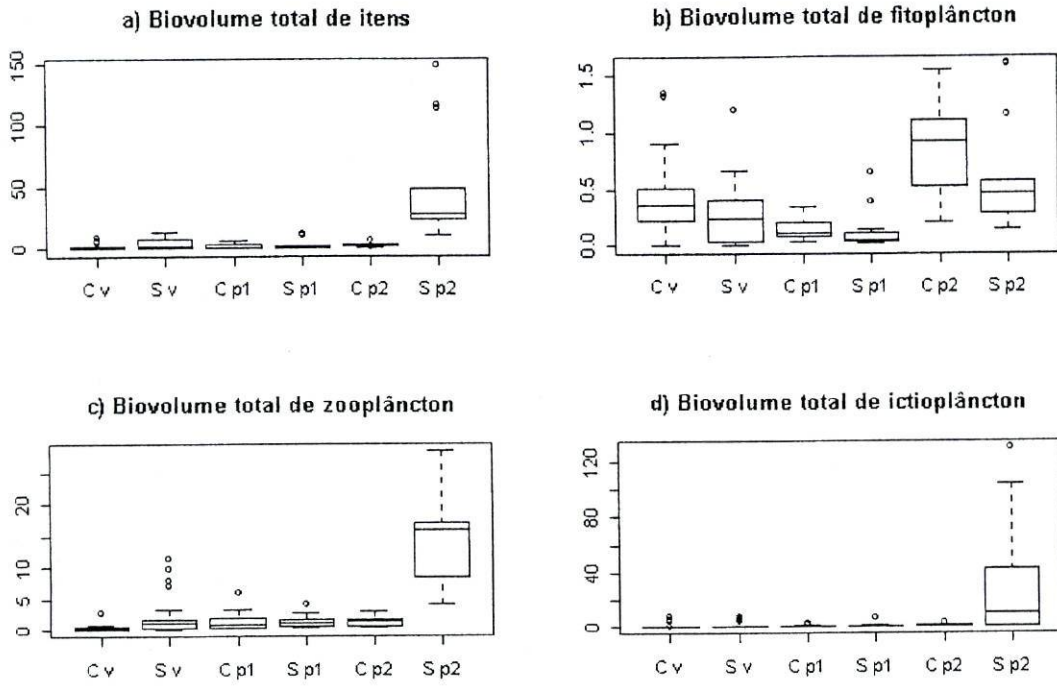


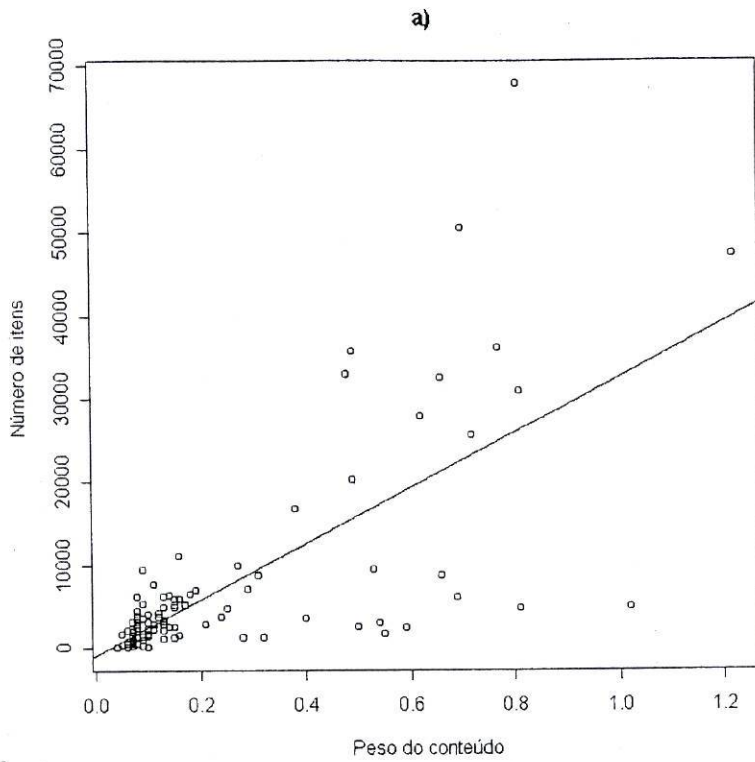
Figura 6.2 - Variação do biovolume (mm^3) **a)** total de itens por estômago, **b)** de fitoplâncton, **c)** de zooplâncton e **d)** de ictioplâncton por amostra. C é relativo a Peniche, S a Portimão, v ao Verão, p1 às amostras do início da Primavera e p2 às do final da Primavera.

da Primavera ter significativamente mais itens alimentares por estômago do que as restantes amostras deste estudo, esta abundância não se reflecte no biovolume total de itens alimentares por estômago, já que nesta amostra dominam diatomáceas com biovolumes muito reduzidos. O biovolume total de itens nos estômagos é especialmente elevado na amostra de Portimão de Março-Abril. A principal razão para esta amostra apresentar um biovolume tão elevado é o facto dos ovos de peixes ocorrerem numa média de 89 por estômago, o que corresponde a 33.9 mm^3 em termos de biovolume, enquanto as restantes amostras variaram entre 2 e 13 ovos por estômago. Para além disto, o biovolume de zooplâncton é também máximo nesta amostra (14.2 mm^3), embora o número de presas zooplanctónicas desta amostra seja bastante menor do que em Peniche na mesma data (2202 e 5735, respectivamente). Isto acontece porque cerca de 95% do zooplâncton presente na amostra de Peniche foi encontrado na fracção menor de $200 \mu\text{m}$ (mais de 3000 itens são ovos de crustáceos e nauplios de copépodes), apenas cerca de 300 itens zooplanctónicos são da fracção maior de $200 \mu\text{m}$. Ao contrário, na amostra de Portimão em que mais de metade dos itens têm mais de $200 \mu\text{m}$ sendo cerca de 1000 copépodes adultos.

Apesar dos itens fitoplanctónicos serem quase sempre mais abundantes nos estômagos do que os zooplanctónicos, a sua contribuição para o biovolume total é relativamente baixa, sempre inferior à de zooplâncton, o que é justificado pela grande diferença de tamanhos médios entre estes grupos de organismos.

O número de itens presentes nos estômagos esteve correlacionado com o peso do conteúdo ($r^2 = 20\%$), como se pode observar na Figura 7 a). A correlação entre o biovolume e o peso do conteúdo (Figura 7 b) é menor do que em termos de número de indivíduos ($r^2 = 21\%$). Apesar destes resultados, tanto o número de itens como o biovolume foram calculados tendo em conta o peso do conteúdo (já os itens foram contados em cerca de metade do conteúdo sendo então estimado o número total de itens no conteúdo total) o que condiciona parte da relação entre os parâmetros analisados. A Figura 8 representa a relação entre o número e biovolume dos itens alimentares por estômago. O biovolume total de itens nos estômagos não está correlacionado com o número de itens alimentares ($p = 0.08$), o que será provavelmente devido à grande amplitude de tamanho dos itens alimentares.

Para analisar se existem diferenças entre zonas e estações no que diz respeito aos diferentes parâmetros alimentares, realizou-se um teste estatístico cujos resultados estão resumidos no Anexo VI. Não existem diferenças significativas no peso do



7

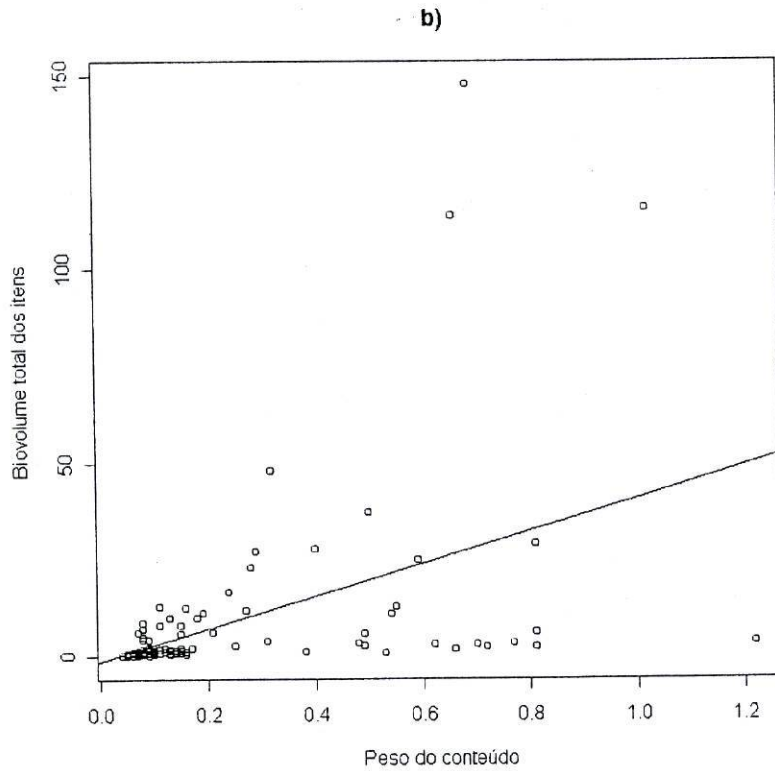


Figura 7 - Relação entre o peso do conteúdo (g) e **a)** o número de itens alimentares e **b)** o biovolume total (mm³) de itens por estômago. Recta de regressão linear a): $y = 5451 + 4425x$ ($p = 1.7 \cdot 10^{-6}$). Recta de regressão linear b): $y = -1.37 + 42.2x$ ($p = 8.9 \cdot 10^{-7}$).

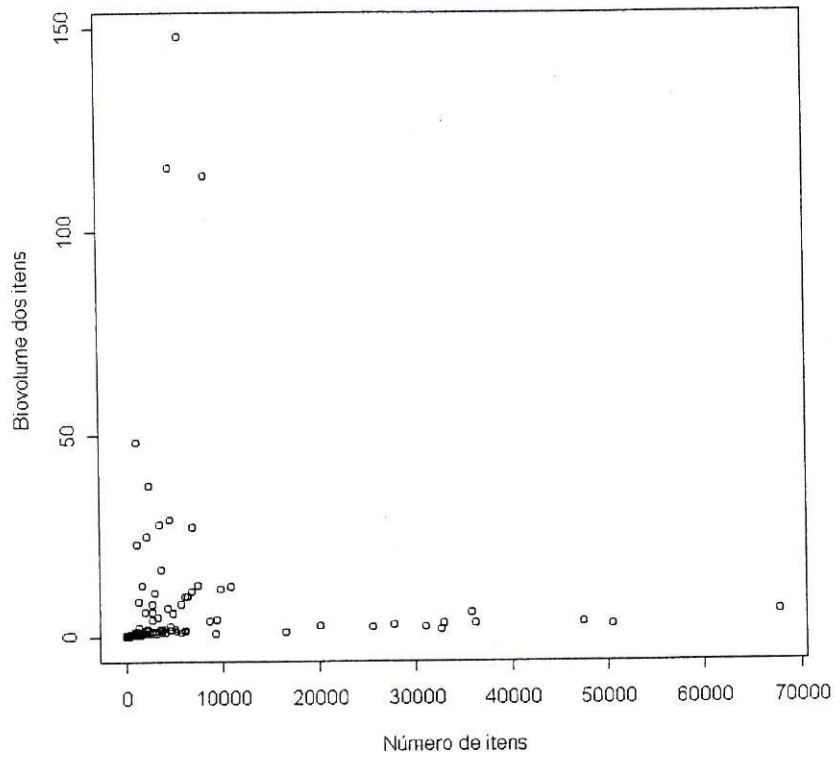


Figura 8 - Relação entre o número e biovolume (mm^3) dos itens alimentares por estômago.

conteúdo entre as duas zonas nas amostras analisadas, embora existam diferenças ao nível do número de itens alimentares por estômago, que em média foi superior em Peniche. O número de itens fitoplanctónicos é estatisticamente diferente nas duas zonas, sendo superior em Peniche, ao contrário do número de itens zooplanctónicos, para os quais não existiram diferenças significativas entre as duas zonas. Em termos do biovolume médio de itens alimentares por estômago, há diferenças significativas entre as duas áreas, bem como em termos de biovolume de fito e zooplâncton. O biovolume total dos itens em Portimão é superior do que em Peniche. Analisou-se também a proporção de fito e zooplâncton nos estômagos em relação ao total de itens, já que a maior abundância relativa de zooplâncton em Portimão é mascarada pelo facto de, em média, existirem menos itens no total nos estômagos. Assim, a percentagem de itens fitoplanctónicas é significativamente superior em Peniche e a percentagem de itens zooplanctónicos é significativamente superior em Portimão.

Todos os parâmetros alimentares dos estômagos de Verão e Primavera analisados mostraram diferenças significativas entre as duas estações do ano amostradas. O peso médio dos conteúdos foi significativamente maior na Primavera, bem como o número total de itens por estômago, o número de itens fitoplanctónicos, o número de itens zooplanctónicos e o biovolume total dos itens alimentares. Foi mais uma vez comparada a percentagem de itens fito e zooplanctónicos em relação ao total de itens. Nesse caso, a percentagem de itens fitoplanctónicos continua a ser superior na Primavera embora a percentagem de presas zooplanctónicas por estômago em relação ao total de itens seja significativamente superior no Verão.

3.3.2) Pigmentos fotossintéticos

3.3.2.1) Diferenças entre indivíduos da mesma amostra

Foi comparada a quantidade de pigmentos fotossintéticos (Clorofila a e Feofitina a) entre estômagos provenientes da mesma amostra tendo-se utilizado o Coeficiente de dispersão amostral ou coeficiente de variação (Tabela 11).

Tabela 11 - Coeficiente de dispersão amostral de estômagos da mesma amostra para o número total de pigmentos fotossintéticos e o número de pigmentos por grama de estômago.

Amostras	Coef. de variação	
	Pigmentos totais	Pigmentos/g estômago
Portimão – Verão	0.80	0.76
Peniche – Verão	0.59	0.56
Portimão – Fev/Mar	0.98	0.98
Peniche – Fev/Mar	0.58	0.49
Portimão – Mar/Abr	0.72	0.65
Peniche – Mar/Abr	0.78	0.84

Tal como ocorreu no caso do peso dos conteúdos e número de itens por estômago, existe uma grande variabilidade na quantidade de pigmentos totais entre estômagos da mesma amostra, sendo o coeficiente de variação sempre superior a 50%. Como a quantidade total de pigmentos por estômago está dependente do seu grau de enchimento, que também foi variável entre indivíduos da mesma amostra, optou-se por comparar o coeficiente de variação da quantidade de pigmentos fotossintéticos por grama de estômago (Tabela 11). A variabilidade é também muito grande neste caso, sendo apenas ligeiramente inferior à observada para os pigmentos totais presentes nos estômagos.

3.3.2.2) Diferenças entre amostras

A maioria dos pigmentos fotossintéticos encontrados nos estômagos, tal como esperado, encontraram-se numa alta taxa de degradação, ou seja, a maioria encontrou-se sob a forma de feopigmentos. Na Figura 9 podem observar-se os resultados relativos à quantidade total de pigmentos fotossintéticos (a) e de pigmentos por grama de estômago (b) em cada amostra. Os pigmentos fotossintéticos totais por estômago variaram entre 0.24 μg registados num estômago da amostra de Portimão de Verão e 549.85 μg de um estômago da mesma zona no final da Primavera. A quantidade de pigmentos por grama de estômago variou entre 2.8 e 1044 μg , ambas registadas no Verão na zona de Peniche. A quantidade de pigmentos por grama de estômago é superior nas amostras de Primavera. A zona de Peniche durante a Primavera registou a maior quantidade de pigmentos totais por estômago, seguida da amostra do início da Primavera para a mesma zona. A concentração de pigmentos no estômago (Fig. 9 b) é superior nas amostras do início da Primavera e no final desta estação em Peniche, sendo menor nas amostras de Verão e no final da Primavera em Portimão.

Para analisar se existem diferenças entre zonas e estações no que diz respeito à quantidade de pigmentos fotossintéticos por estômago realizou-se um teste estatístico cujos resultados estão resumidos no Anexo VII. Existem diferenças significativas no total de pigmentos fotossintéticos por estômago e por grama de estômago entre as duas zonas, sendo em média superior em Peniche. As diferenças são particularmente significativas no que respeita à comparação do total de pigmentos nos estômagos comparando estações do ano, sendo em média superior na Primavera (70.7 μg) do que no Verão (5.05 μg). A quantidade de pigmentos por grama de estômago é também significativamente superior na Primavera.

Pretendeu-se calcular de uma forma aproximada quanto volume de água a sardinha necessitaria de filtrar para concentrar a quantidade de pigmentos fotossintéticos presente nos estômagos observados. Usou-se o valor médio de 1 mg/m^3 de pigmentos fotossintéticos nas águas ao largo da costa continental portuguesa encontrado na bibliografia (Cunha, M.E, *com. pess.*). Assim, a sardinha teria de filtrar entre 0.24 l (correspondente ao mínimo de pigmentos encontrado nos estômagos) e 550 l (correspondente ao máximo de pigmentos encontrados no estômago). Mediu-se a área da boca de uma sardinha de 20 cm de comprimento e obteve-se o valor de 62.8 mm^2 ,

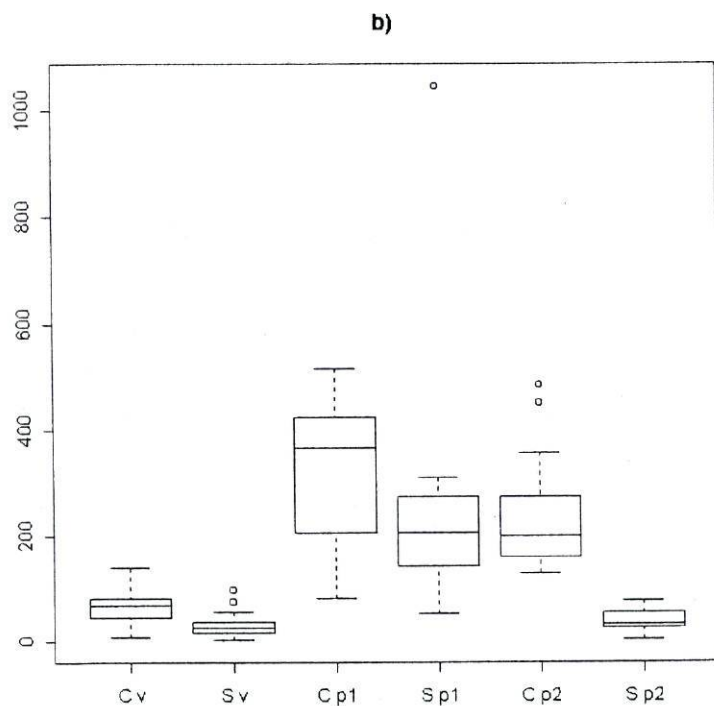
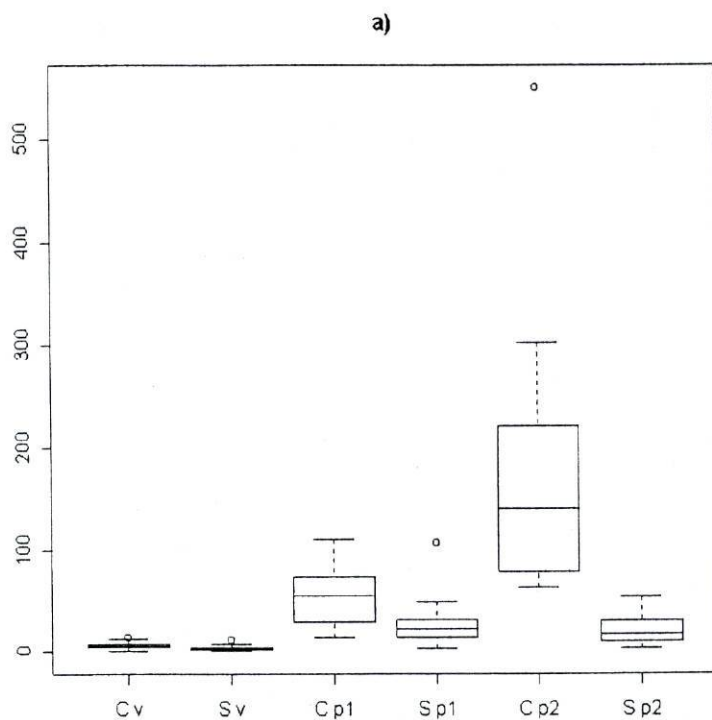


Figura 9 - Variação da a) Quantidade de pigmentos fotossintéticos totais por estômago (μg) e b) Quantidade de pigmentos fotossintéticos por grama de estômago ($\mu\text{g/g}$). C representa Peniche e S Portimão, v o Verão, p1 as amostras de Fevereiro/Março e p2 de Março/Abril.

pelo que, para que a sardinha filtre o volume de água anteriormente calculado teria de deslocar-se (admitindo a inexistência de correntes) entre 3 m e 8 Km.

3.3.3) Relação entre a quantidade de pigmentos fotossintéticos e abundância de presas fitoplanctónicas

Pretendeu-se comparar a contribuição dos itens fitoplanctónicos através dos resultados obtidos pela contagem de indivíduos (método numérico) e o seu biovolume (método volumétrico) e pela quantificação dos pigmentos fotossintéticos através da fluorimetria. Para isso usaram-se os estômagos da *análise individual*. O número de itens pertencente ao grupo *Protoperidinium spp.*, abundante em muitos estômagos deste estudo, não foi considerado para esta comparação, já que se trata de uma espécie heterotrófica, sem pigmentos fotossintéticos.

A variação da quantidade de itens fitoautotróficos por amostra está representada na Figura 10. O número de itens fitoautotróficos é muito superior na amostra de Peniche do final da Primavera do que nas restantes amostras, variando entre os 7000 e os 53000 itens fitoautotróficos por estômago. A amostra do início da Primavera para a mesma zona tem também um número de presas fitoplanctónicas superior às restantes amostras. A zona de Peniche tem sempre maior número de itens fitoautotróficos quando comparadas as mesmas datas de Portimão. Ao comparar a variação da quantidade total de pigmentos (Fig. 9 a) com a variação do número de itens fitoautotróficos por estômago em cada amostra (Fig. 10), verifica-se que os resultados são semelhantes no que diz respeito às amostras de Peniche da Primavera, bem como da menor diferença entre as amostras de Verão e Portimão na Primavera, com valores de pigmentos e número de itens fitoautotróficos mais aproximados.

A figura 11.1 relaciona a quantidade total de pigmentos fotossintéticos e o número de itens fitoautotróficos por estômago. Existe uma relação entre a quantidade de pigmentos fotossintéticos e o número de itens fitoautotróficos contados nos estômagos ($r^2 = 39\%$, $p=5*10^{-12}$). No entanto, como os pigmentos e o número de itens foram contados apenas numa fracção do conteúdo, foram estimadas para o peso do conteúdo total, pelo que parte desta relação pode dever-se ao cálculo para todo o conteúdo. Para evitar esse enviesamento, determinou-se a relação entre o número de itens fitoautotróficos por g de estômago e a concentração de pigmentos no estômago (Figura 11.2). Continua a existir uma relação entre o número de itens e a concentração de pigmentos nos estômagos ($r^2 = 9\%$, $p = 0.002$). No entanto, esta relação não foi observada quando considerados apenas os estômagos da mesma amostra (Figura 12).

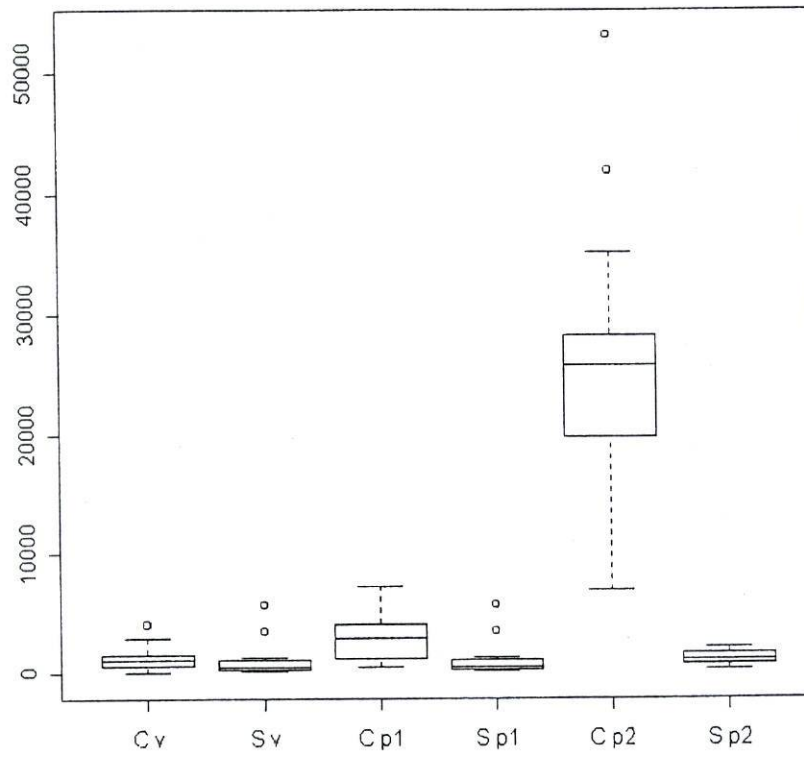


Figura 10 - Variação do número de itens fitoautotróficos por amostra. C representa Peniche e S Portimão, v representa as amostras de Verão, p1 de Fevereiro/Março e p2 de Março/Abril.

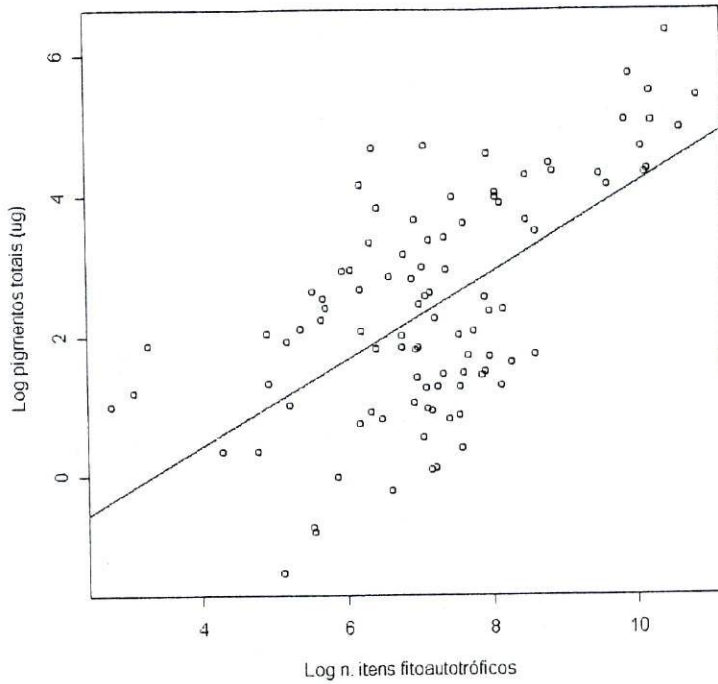


Figura 11.1 - Relação entre o logaritmo da quantidade total de pigmentos fotossintéticos (μg) e o logaritmo do número de itens fitoautotróficos por estômago. Recta de regressão linear: $y = -2.09 + 0.62x$

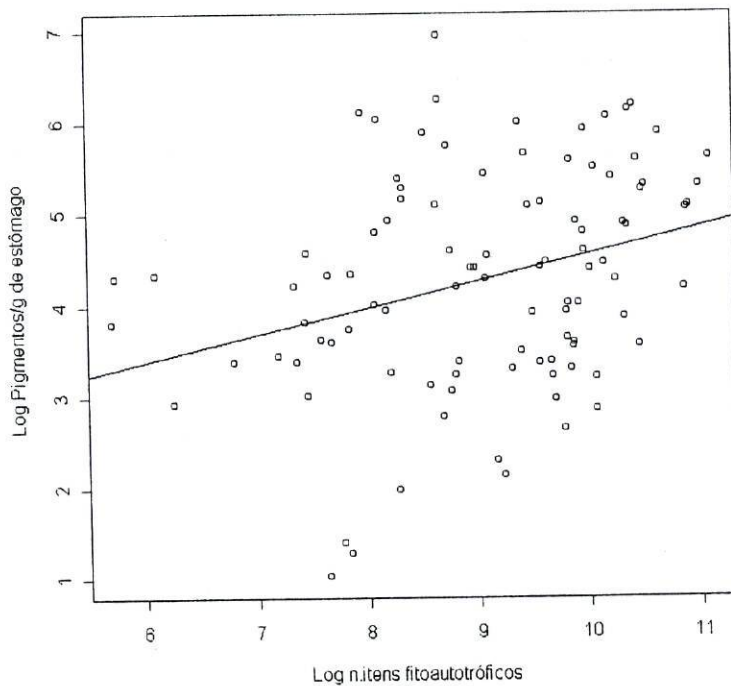


Figura 11.2 - Relação entre o logaritmo da quantidade de pigmentos fotossintéticos por g de estômago ($\mu\text{g/g}$) e o logaritmo do número de itens fitoautotróficos por estômago. Recta de regressão linear: $y = 1.64 + 0.69x$

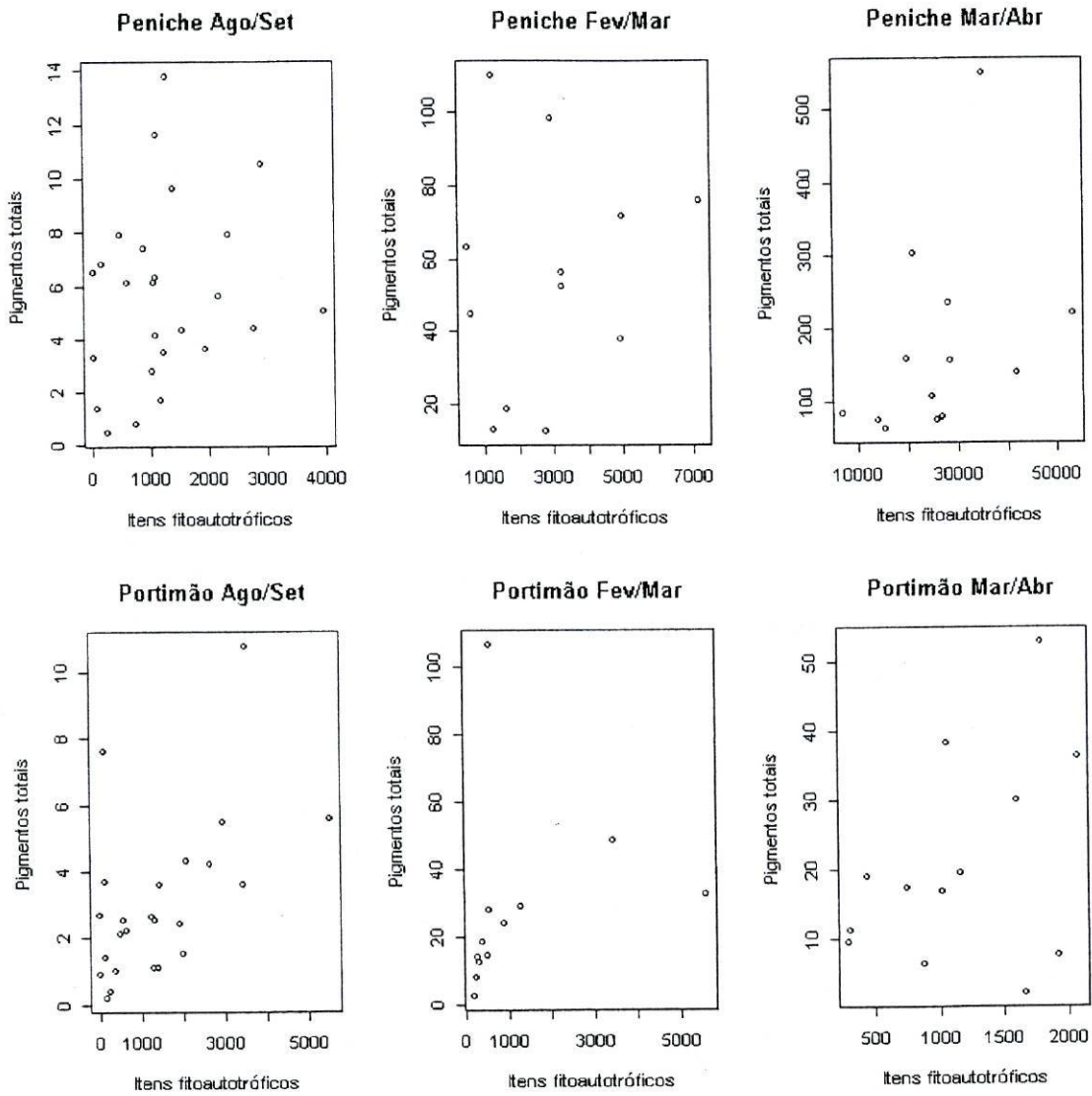
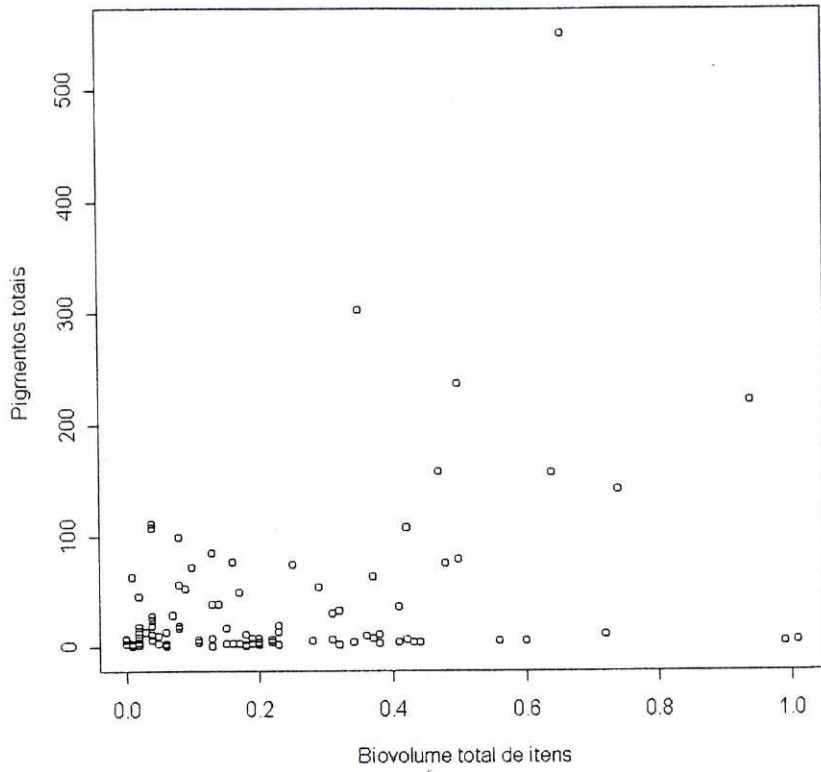


Figura 12 - Relação entre a quantidade total de pigmentos fotossintéticos (μg) e o número de itens fitoautotróficos entre estômagos da mesma amostra.

A relação entre o número de pigmentos fotossintéticos e o biovolume total de itens fitoplanctónicos (excepto o biovolume do *Protoberidinium* spp.) para cada estômago (Figura 13) foi menor do que a observada quando considerado o número de itens fitoautotróficos, obtendo-se um r^2 de 13% e um valor de $p = 0.0001$. A relação entre estas variáveis para os estômagos de cada amostra separadamente (Figura 14) não foi significativa excepto em duas amostras de Portimão, provavelmente pelas mesmas razões apresentadas no caso do número de presas fitoplanctónicas.



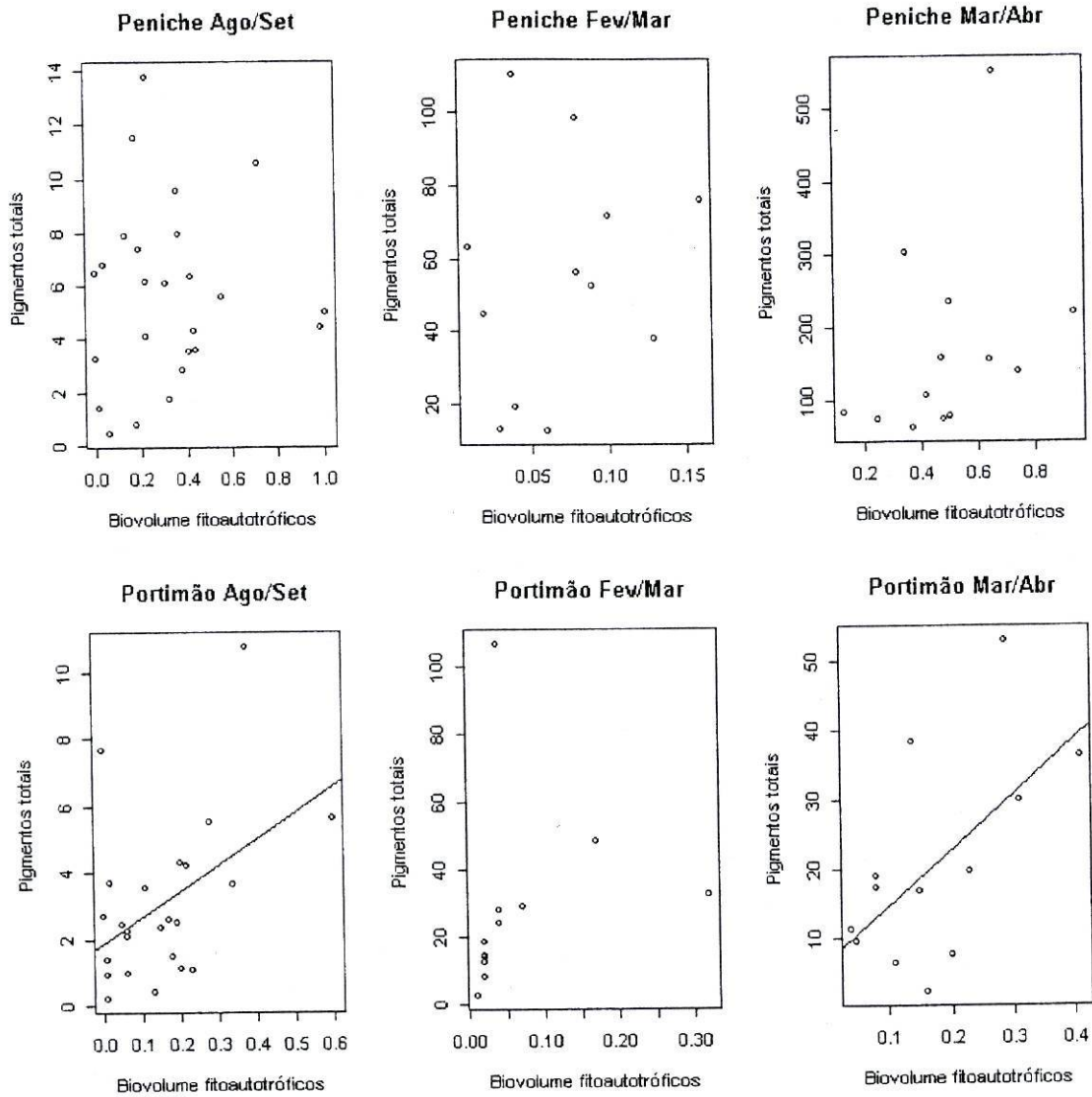


Figura 14 - Relação entre a quantidade total de pigmentos fotossintéticos (μg) e o biovolume de itens fitoautotróficos (mm^3) entre estômagos da mesma amostra. Recta de regressão de Portimão Ago/Set: $y = 1.86 + 7.87x$, $r^2 = 22\%$. Recta de regressão de Portimão Mar/Abr: $y = 6.4 + 0.02x$, $r^2 = 37\%$.

3.4) Grau de digestão dos itens alimentares

Os itens alimentares zoo e ictioplancônicos presentes em cada um dos 100 estômagos analisados individualmente foram classificados de acordo com o seu grau de digestão, numa escala de 1 a 5 descrita na Tabela 1. Do fitoplâncton, apenas as diatomáceas que ocorreram na Primavera foram classificadas de acordo com o grau de digestão (Tabela 2). A comparação do grau de digestão entre amostras incluiu a digestão do total de itens classificados, a digestão das diatomáceas e a digestão do grupo constituído por copépodes adultos e copepoditos, que ocorreu em todos os estômagos analisados. Esta última comparação foi usada para minimizar a variabilidade causada pela diferença qualitativa dos itens alimentares, já que diferentes organismos terão diferentes resistências à digestão.

No total, atribuiu-se um grau de digestão a 2877 diatomáceas e 12248 itens zoo e ictioplancônicos, dos quais 9762 eram copépodes. De uma forma geral, os organismos apresentaram graus de digestão muito variados, embora alguns grupos ocorram sempre num grau de digestão muito avançado, ao contrário de outros, aparentemente inalterados. Por exemplo, o grupo constituído por copépodes e copepoditos esteve quase sempre muito digerido, havendo uma grande quantidade de patas e antenas isoladas nas amostras. Os indivíduos do género *Oncaea* representaram o grupo de copépodes mais resistente à digestão, ao contrário dos Calanóides, que ocorreram maioritariamente num grau de digestão avançado. No caso do fitoplâncton, os dinoflagelados encontrados apresentaram, de uma forma geral, pouca digestão, sendo possível na sua maioria distinguir os cloroplastos intactos no interior. Ao contrário, dentro das diatomáceas, apenas os indivíduos do género *Diploneis* pareceram oferecer uma boa resistência à digestão, ao contrário de espécies como as *Pseudo-nitzschias*, quase sempre esvaziadas e muitas vezes com as duas valvas separadas, o que dificultou grandemente a sua identificação. Os ovos de peixes foram encontrados em diferentes graus de digestão, sendo possível nalguns distinguir a larva enquanto de outros se encontraram apenas as cápsulas vazias e achatadas. Nenhum dos ovos de peixe encontrados num grau de digestão que permitiu a identificação da espécie eram de sardinha.

Construíram-se tabelas de contingência multidimensionais com as variáveis “área”, “estação ou data” e os graus de digestão, nas quais cada célula representa o número de itens encontrados em cada um dos graus de digestão para cada amostra

estudada (Tabela 12). Aplicou-se o Teste de Independência de Qui-Quadrado para verificar se existem diferenças entre amostras no grau de digestão dos itens alimentares (Anexo VIII). Rejeitou-se a hipótese nula de independência das variáveis, tanto no caso do total de itens alimentares quanto no caso dos copépodes e das diatomáceas. Testou-se a hipótese de independência parcial, ou seja, que duas das variáveis têm um determinado grau de associação enquanto uma terceira seria completamente independente. Escolheu-se a variável “área” para testar a independência, já que através dos valores percentuais parece ser a que menos influencia a distribuição nos diferentes graus de digestão. Rejeitou as hipóteses nulas para a independência parcial da variável “área”, quer para o total de itens, copépodes e diatomáceas. Há então diferenças nos graus de digestão dos itens alimentares entre amostras, parecendo existir um efeito “área” e um efeito “estação”.

Tabela 12 - N.º de presas em cada grau de digestão por amostra para o Total de itens, Copépodes e Diatomáceas (C=Peniche, S=Portimão, Estação 1= Ago/Set, 2=Fev/Mar, 3= Mar/Abr)

Variável	Área	Estação	Digestão				
			1	2	3	4	5
Total	C	1	43	56	94	495	1821
		2	37	92	89	215	364
		3	65	207	239	415	560
	S	1	124	143	365	1160	2769
		2	27	259	161	269	305
		3	38	105	175	536	1020
Copépodes	C	1	8	41	71	436	1714
		2	15	75	77	147	274
		3	39	185	205	242	376
	S	1	33	122	293	912	2169
		2	21	246	146	197	216
		3	18	89	155	435	805
Diatomáceas	C	2	779	380	18	-	-
		3	327	784	29	-	-
		2	122	184	42	-	-
	S	3	99	81	32	-	-
		2	122	184	42	-	-
		3	99	81	32	-	-

Para visualizar as principais diferenças nos graus de digestão dos itens entre arrastos, foram observados os valores percentuais da quantidade relativa de itens alimentares em cada grau de digestão para cada amostra, já que é desaconselhado aplicar novos testes de independência somando vários níveis das variáveis (Everitt, 1977). Analisaram-se as diferenças entre Peniche e Portimão, entre o Verão e

Primavera e entre a captura por cerco e por arrasto pelágico. Assim, de acordo com o quadro percentual construído a partir da Tabela 12 e representado no Anexo IX, nalguns casos as diferenças não parecem ser muito acentuadas, particularmente, quando comparadas as áreas de estudo, cujas frequências percentuais em cada grau de digestão são muito idênticas para os itens estudados.

Os resultados obtidos para o grau de digestão do total de itens ictio e zooplancctônicos é muito semelhante ao resultado obtido exclusivamente para os copépodes. Em todos os casos o total de presas zoo e ictioplanctônicos foi proporcionalmente maior nas classes mais digeridas e mais difíceis de identificar. Ao contrário, as diatomáceas foram classificadas em maior número nas classes pouco ou não digeridas. Existe uma maior proporção de itens mais digeridos no Verão em relação à Primavera e também existe um maior número de itens em elevado grau de digestão por cerco do que por arrasto pelágico. Ainda assim, embora o teste estatístico aplicado aponte para uma dependência da variável “graus de digestão” em relação às variáveis “área” e “estação ou data”, as diferenças entre amostras não parecem ser, em termos percentuais, muito contrastantes. A diferença no grau de digestão de itens alimentares de estômagos provindos de arrastos ou amostras diferentes pode, no entanto, introduzir um erro nas contagens.

3.5) Variação da dieta alimentar com o comprimento dos indivíduos

Pretendeu-se comparar a dieta de indivíduos de comprimentos diferentes, particularmente no acesso aos itens mais pequenos, representados maioritariamente por espécies fitoplanctónicas. Para isso analisaram-se os estômagos das 10 sardinhas menores das amostragens de Peniche e Portimão do início da Primavera e das sardinhas de aproximadamente 20 cm de comprimento das mesmas amostras e utilizadas na análise individual. Assume-se que as sardinhas pertencem às mesmas áreas de distribuição e portanto tiveram acesso à mesma quantidade e variedade de alimento. Compararam-se os dados biológicos destes indivíduos, inclusivamente o peso dos estômagos e a quantidade de organismos fitoplanctónicos, estimada a partir da quantidade de pigmentos fotossintéticos por fluorimetria. Os dados biológicos destes indivíduos estão descritos na Tabela 13.

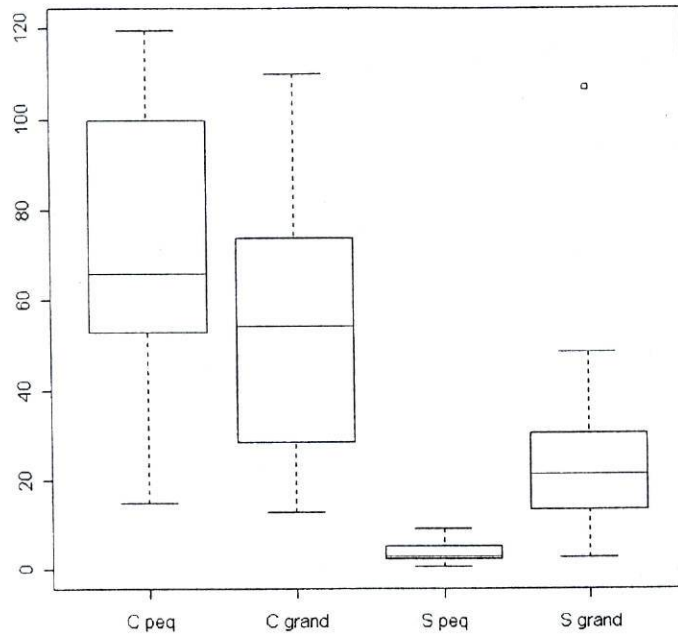
O comprimento médio das classes de comprimento menores foi semelhante para as duas zonas (aproximadamente 16 cm). O peso destes indivíduos é cerca de metade do peso das sardinhas de 20 cm da mesma zona, sendo o peso das gónadas entre 60 e 70% menor para os indivíduos menores. Enquanto a maioria dos indivíduos de Portimão e os maiores de Peniche estão em estado de maturação 6 (o que significa que ainda irão desovar durante a mesma época de desova), a maioria dos indivíduos de Peniche pertencentes à menor classe de comprimento estão na escala de maturação em estado 5, ou seja, não irão desovar novamente durante a decorrente época de desova, tendo portanto um peso das gónadas inferior aos indivíduos da mesma classe de comprimento da zona de Portimão. O índice de gordura é idêntico entre todos os indivíduos. Enquanto o peso dos conteúdos estomacais de Portimão é, em média, cerca de metade para as sardinhas de menor comprimento em relação às de 20 cm, em Peniche a diferença é de apenas 10% menos peso de conteúdo para os indivíduos menores. A quantidade ou peso de estômago usada para a análise fluorimétrica foi semelhante em ambos os casos.

Para verificar se as sardinhas maiores retêm proporcionalmente mais fitoplâncton do que as sardinhas de menor comprimento calculou-se o valor de pigmentos fotossintéticos por grama de conteúdo. A figura 15 compara a quantidade de pigmentos fotossintéticos totais (Fig. 15 a) e por grama de estômago (Fig. 15 b) dos indivíduos menores que 20 cm (classe 1) e de comprimento igual a 20 cm (classe 2) para a zona de Portimão e Peniche. Foi realizado um teste t bilateral com $\alpha = 0.05$

Tabela 13 - Variáveis Biológicas dos indivíduos de diferentes comprimentos seleccionados para a comparação da quantidade de pigmentos fotossintéticos por estômago.

Variáveis		Fev/Mar			
		Portimão 20 cm	Portimão <20 cm	Peniche 20 cm	Peniche <20 cm
Comprimento	min.	20.0	16.0	20.0	14.3
	mediana	20.5	16.2	20.5	16.1
	média	20.5	16.3	20.5	15.75
	máx.	20.8	16.7	20.8	16.5
Peso	min.	55.3	26.6	50.2	20.4
	mediana	61.2	28.7	56.1	29.3
	média	61.3	28.2	56.2	27.52
	máx.	65.4	31.5	59.3	31.3
Peso eviscerado	min.	49.2	23.9	47.5	18.6
	mediana	54.8	26.1	50.9	24.94
	média	54.8	26.1	50.6	26.65
	máx.	57.6	28.6	52.9	28.5
Sexo	M	5	6	8	7
	F	7	4	4	3
Estado de maturação	min.	5	5	5	1
	moda	6	6	6	5
	máx.	6	6	6	6
Índice de Gordura	min.	1	1	1	1
	moda	1	1	1	1
	máx.	1	1	1	1
Peso das gónadas	min.	0.9	0.25	1.0	0.04
	mediana	2.0	0.79	1.9	0.44
	média	1.9	0.80	1.6	0.43
	máx.	3.0	1.51	3.3	1.11
Peso do estômago cheio	min.	0.40	0.18	0.33	0.29
	mediana	0.50	0.27	0.44	0.39
	média	0.53	0.25	0.44	0.39
	máx.	0.91	0.57	0.66	0.48
Peso do estômago vazio	min.	0.21	0.13	0.21	0.13
	mediana	0.28	0.17	0.30	0.18
	média	0.28	0.17	0.29	0.17
	máx.	0.35	0.21	0.37	0.26
Peso do conteúdo	min.	0.05	0.02	0.11	0.09
	mediana	0.09	0.07	0.15	0.15
	média	0.11	0.04	0.17	0.15
	máx.	0.27	0.27	0.31	0.23

a) Pigmentos totais nos estômagos por comprimento e por área



b) Pigmentos/g de estômago por comprimento e área

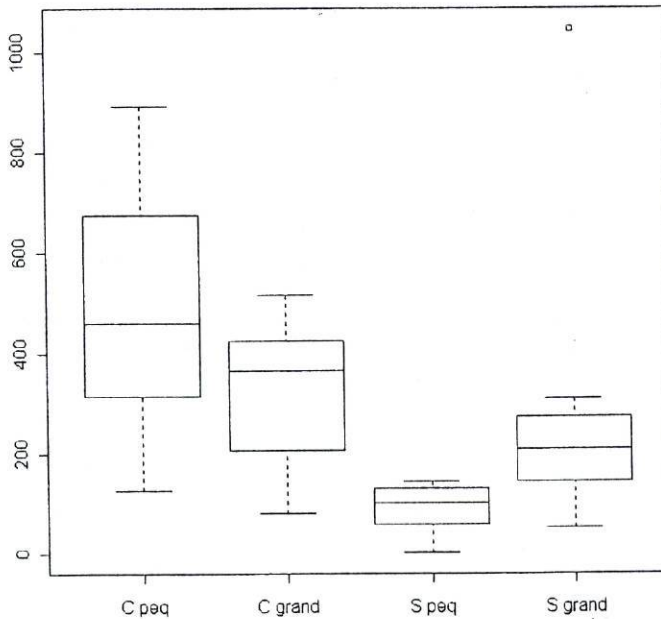


Figura 15 - Pigmentos fotossintéticos a) Totais por estômago (μg) e b) por grama de estômago ($\mu\text{g/g}$) dos indivíduos de Peniche (C) e de Portimão (S) com menos (*peq*) e com mais (*grand*) de 20 cm de comprimento.

para testar a hipótese nula “não existem diferenças significativas entre a quantidade de pigmentos por grama de estômago em sardinhas de diferentes classes de comprimento”. Os resultados obtidos foram diferentes para as duas zonas. No caso de Portimão rejeitou-se a hipótese nula com um valor de $p = 0.006$, indicando que existem diferenças significativas entre os valores de pigmentos fotossintéticos por grama de estômago, sendo menor para os indivíduos menores. No caso de Peniche aceitou-se a hipótese nula com um valor de p igual a 0.077 . Calculou-se a potência de teste à posteriori, admitindo através da tabela de Cohen uma probabilidade de 80% de estar a cometer um erro do tipo II, ou seja, não rejeitar a hipótese nula e esta ser falsa.

Se observarmos as caixas com bigodes do número total de pigmentos fotossintéticos em estômagos de sardinhas com comprimentos diferentes (Figura 15 a), os resultados voltam a ser diferentes para as duas zonas. Em Portimão, onde o peso dos conteúdos estomacais das sardinhas menores são quase metade das de 20 cm, a diferença entre os dois acentua-se, sendo claramente maior nas sardinhas maiores, ao passo que em Peniche, onde se observaram pesos dos conteúdos estomacais semelhantes para as duas classes de comprimento, a média de pigmentos é inclusivamente maior no caso dos indivíduos menores.

6) Alimentação da sardinha e disponibilidade alimentar

Na Tabela 15 estão representados os itens alimentares presentes nos estômagos das amostras de Março-Abril de Portimão e Peniche em comparação com as amostras recolhidas da água à superfície no mesmos locais e ao mesmo tempo. No Anexo XX apresenta-se os números absolutos por estômago e por litro de água. Na Tabela 14 está resumido o quadro anterior em termos de grandes grupos.

Tabela 14 - Frequência relativa de grandes grupos planctónicos nos estômagos e na água das amostras de Março/Abril. (Zero igual a ausência ou frequência relativa inferior a 1%).

Grupos	Portimão		Peniche	
	Estômago	Água	Estômago	Água
Fitoplâncton	57	68	74	99
Dinoflagelados (Dinophyceae)	24	22	5	14
Diatomáceas (Bacillariophyceae)	22	41	51	85
Zooplâncton	38	31	22	1
Copepoda	34	2	11	0
Tintinoinea	3	28	0	0

Não existe uma correspondência clara entre os itens encontrados na água e nos estômagos. A dominância do fitoplâncton em termos de número de itens é clara em ambos os tipos de amostras mas mais acentuada nas amostras de água. Para esta dominância contribuem aliás espécies diferentes.

As principais diferenças entre as amostras de estômagos e de água, comuns aos dois pares de amostras, são a grande diversidade e abundância de espécies de diatomáceas de afloramento (*e.g. Rhizosolenia, Detomula, Skeletonema costatum, Guinardia striata, Leptocylindricus e Chaetoceros*) nas amostras de água, estando a maioria completamente ausente nos estômagos. Da mesma forma, os tintinídeos, que em Portimão representam a grande maioria de espécies zooplanctónicas na água, estão ausentes ou em baixa frequência nos conteúdos estomacais. No caso dos copépodes, os grupos Poecilomastoida e Harpacticoida, que representam a maioria dos copépodes ingeridos pelas sardinhas deste estudo, não foram encontrados nas amostras de água, onde dominam vários géneros de Calanóides.

No caso de Portimão, a frequência relativa dos dinoflagelados é semelhante em ambas as amostras, embora nos estômagos os *Proto-peridinium spp.* sejam o grupo mais abundante enquanto na água as espécies enquistadas e não identificadas, bem

Tabela 15 - Frequência relativa dos organismos planctônicos presentes nos estômagos e na água nas amostras de Portimão e Peniche de Março/Abril. Zero é igual a uma frequência inferior a 1%.

Indivíduos	Portimão		Peniche	
	Estômago	Água	Estômago	Água
Fitoplâncton	11	5	18	0
Dinoflagelados	4	5	1	0
<i>Dinophysis acuta</i>		0	0	0
<i>Dinophysis caudata</i>			0	0
<i>Protoperdinium spp.</i>	11	3		0
<i>Protoperdinium divergens</i>	4			
<i>Protoperdinium depressum</i>	1	0	1	
<i>Protoperdinium claudicans</i>	1			
<i>Protoperdinium diabolium</i>		1		0
<i>Ceratium spp</i>	1	4	2	0
<i>Prorocentrum micans</i>		0		
Quisto dinoflagelado	1	6		
<i>Noctiluca spp.</i>		0		
<i>Goniodoma poliedrico</i>		2		
Diatomáceas	3	9	3	2
Diatomáceas cadeia	1			
<i>Coscinodiscus spp</i>		1	1	0
<i>Thalassiosira spp.</i>	3	1	2	0
<i>Dictioneis spp.</i>				
<i>Diploneis spp.</i>	1		7	
<i>Navicula spp.</i>		0	4	
<i>Pleurosigma/Girosigma</i>		0	3	
Pinulada		0	2	0
<i>Paralia sulcata</i>	13	1	8	0
<i>Rhizoselenia spp.</i>		1		13
<i>Surinella spp.</i>				
<i>Triceratium spp.</i>			1	
<i>Trachineis spp.</i>				
<i>Odontella spp.</i>	1			
<i>Thalassionema spp.</i>		2	6	1
<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>		3	14	24
<i>Planktonella sol</i>				0
<i>Nitzschia spp</i>				
<i>Detonula spp.</i>		14		20
<i>Asterolampra spp.</i>				0
<i>Eucampia spp.</i>		0		0
<i>Guinardia striata</i>		3		14
<i>Leptocylindricus spp.</i>		2		12
<i>Chaetoceros spp.</i>		1		12
<i>Dichthiocha fibula</i>		1		
<i>Skeletonema costatum</i>		1		
Zooplâncton				
Crustáceos				
ovo de crustaceo	0	0	11	0
Copepoda	3	0	1	
Ovo de copepode	5		7	0
nauplio de copepode	16	1	3	0
<i>Harpacticoida n.i.</i>	3	0	0	0
<i>Euterpina spp.</i>			0	
<i>Microsetella spp.</i>	0			0
<i>Oncaea spp.</i>	3		0	0
<i>Olithona spp.</i>	3		0	0
<i>Calanus/Paracalanus/Clausocalanus</i>	0	0		0
<i>Temora spp</i>	0			
<i>Centropages spp.</i>	0	0		0
<i>Corycaeus spp.</i>	0		0	
<i>Pleurommama spp.</i>	0			
<i>Acartia spp.</i>		0		0
<i>Candacia spp.</i>				
Cirripedia				
Decapoda	0	0		0
Ostracoda	0		0	
Molusca				
Gastropoda			0	
Tintinoinea	3	28		0
Apendicularia	1	0	0	0
Polichaeta		0		
Ictioplâncton				
Ovo peixe		0		
Escama de peixe		0		0
Quisto mucilaginoso	4	1	1	0
Grão de polen	1		3	
total	100	100	100	100

como as espécies do género *Ceratium* são também abundantes. Quanto às diatomáceas desta zona, a espécie *Paralia sulcata* domina no caso dos estômagos, ao contrário da amostra de água, com uma diversidade de diatomáceas muito maior e com uma dominância clara do género *Detomula*, ausente nos estômagos. Em Peniche, a diversidade e abundância das diatomáceas é significativamente diferente, já que nos estômagos dominam as diatomáceas pinuladas, praticamente ausentes na amostra de água, enquanto das espécies abundantes na água, apenas as *Pseudo-nitzschias* ocorrem também com uma abundância relativamente alta nos estômagos, enquanto as espécies de afloramento anteriormente referidas, que em conjunto compreendem cerca de 71% da frequência total de organismos planctónicos, estiveram ausentes dos estômagos. Os dinoflagelados em Peniche, tanto nos estômagos quanto na água, ocorreram em baixas frequências relativas e são maioritariamente representados por espécies do género *Dinophysis* e *Proto-peridinium*.

Os ovos de copépodes e de outros crustáceos foram os itens zooplancctónicos mais abundantes nos estômagos de Peniche, enquanto nos estômagos de Portimão dominaram os nauplios de copépode. Os ovos de crustáceos e copépodes em particular existiram em muito menor abundância relativa na água, enquanto os nauplios foram também muito menos abundantes na amostra de água de Portimão mas tiveram uma abundância semelhante no caso de Peniche. A abundância relativa muito baixa dos restantes grupos zooplancctónicos nas amostras de água de Portimão é reflexo da clara dominância dos tintinídeos.

3.7) Condição nutricional das fêmeas e qualidade dos oócitos

As fêmeas em estado de pré-desova seleccionadas para comparar a condição nutricional do músculo com os ovócitos hidratados presentes nas gónadas foram recolhidas em 8 arrastos realizados na costa continental portuguesa até Cádiz (Figura 1). Na Tabela 16 estão representadas as variáveis biológicas destas fêmeas. O comprimento das fêmeas variou entre 13.8 e 21 cm e o peso total entre 21 e 89 g. O índice de gordura atribuído macroscopicamente foi bastante baixo, apesar de ser no início da época de desova. O peso das gónadas variou entre 2 e 13 g.

O índice RNA/DNA deve ser independente do peso de tecido usado para a análise, já que o aumento de DNA deverá ser proporcional ao aumento de peso, realçando a quantidade de RNA por célula. De facto, como se pode observar na Figura 16, não há relação aparente no caso do músculo, embora no caso do oócito esta relação exista ($p= 5.9*10^{-5}$), embora com um coeficiente de regressão relativamente baixo ($r^2 = 0.24$).

Foi comparado o total de ácidos nucleicos nos oócitos não isolados com os isolados através de um crivo, com o objectivo de verificar se este procedimento é eficaz no isolamento dos oócitos de células maternas que existem nas gónadas (Figura 17). O teste t emparelhado para um $\alpha = 0.05$ indica que tanto a quantidade de DNA quanto de RNA é significativamente diferente entre os oócitos isolados e não isolados ($p= 9.5*10^{-5}$ e $p= 0.0007$, respectivamente), sendo o DNA ligeiramente superior nos oócitos não isolados e o RNA superior nos oócitos isolados. Assim, a diferença no índice RNA/DNA obtida para os oócitos isolados é também significativamente diferente ($p= 1*10^{-11}$), o que parece indicar que o isolamento dos oócitos através de um crivo é eficaz.

Os resultados dos ácidos nucleicos das fêmeas capturadas na região Sul e Norte de Portugal (dividindo as zonas sensivelmente na latitude de Lisboa) foram analisados em separado. Na Figura 18 está representada a quantidade de ácidos nucleicos no músculo e oócitos isolados para o total das duas zonas. A quantidade de ácidos nucleicos por mg de peso húmido foi largamente superior nos oócitos do que no músculo, quer na quantidade de DNA quer na quantidade de RNA, sendo superior em duas ordens de grandeza em ambos os casos. O índice RNA/DNA é também significativamente superior nos oócitos em comparação com o músculo. Não existem diferenças significativas no índice RNA/DNA dos músculos entre as fêmeas do norte e do sul. No entanto, existe uma diferença estatística ($p=0.017$, aplicando um teste t para

Tabela 16 - Variáveis Biológicas das fêmeas em pré-desova

Variáveis		Fêmeas 4
Comprimento (cm)	min.	13.8
	mediana	17.0
	média	17.1
	máx.	21.9
Peso (g)	min.	21.0
	mediana	40.5
	média	43.4
	máx.	89.0
Peso eviscerado (g)	min.	17.0
	mediana	34.0
	média	35.6
	máx.	70.0
Índice de Gordura	min.	1
	moda	1
	máx.	3
Peso das gónadas (g)	min.	2.0
	mediana	5.0
	média	5.1
	máx.	13.0

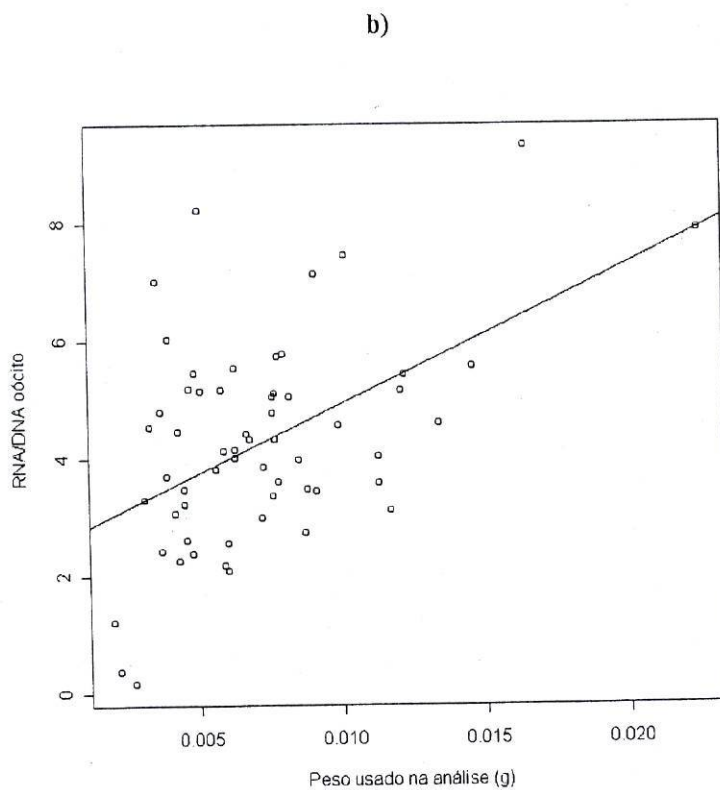
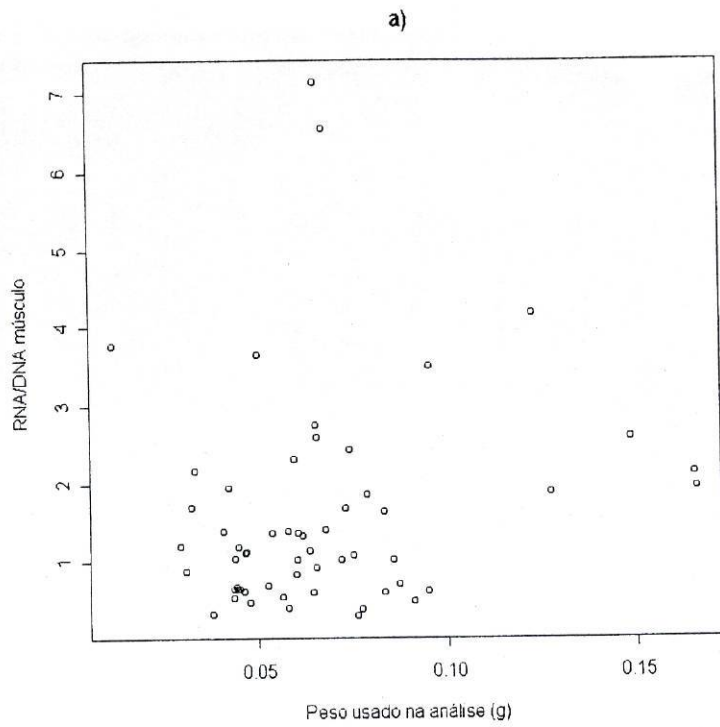


Figura 16 - Relação entre o índice RNA/DNA **a)** do músculo e **b)** dos oócitos com o peso do tecido usado na análise. Recta de regressão linear: $y = 2.5 + 236x$.

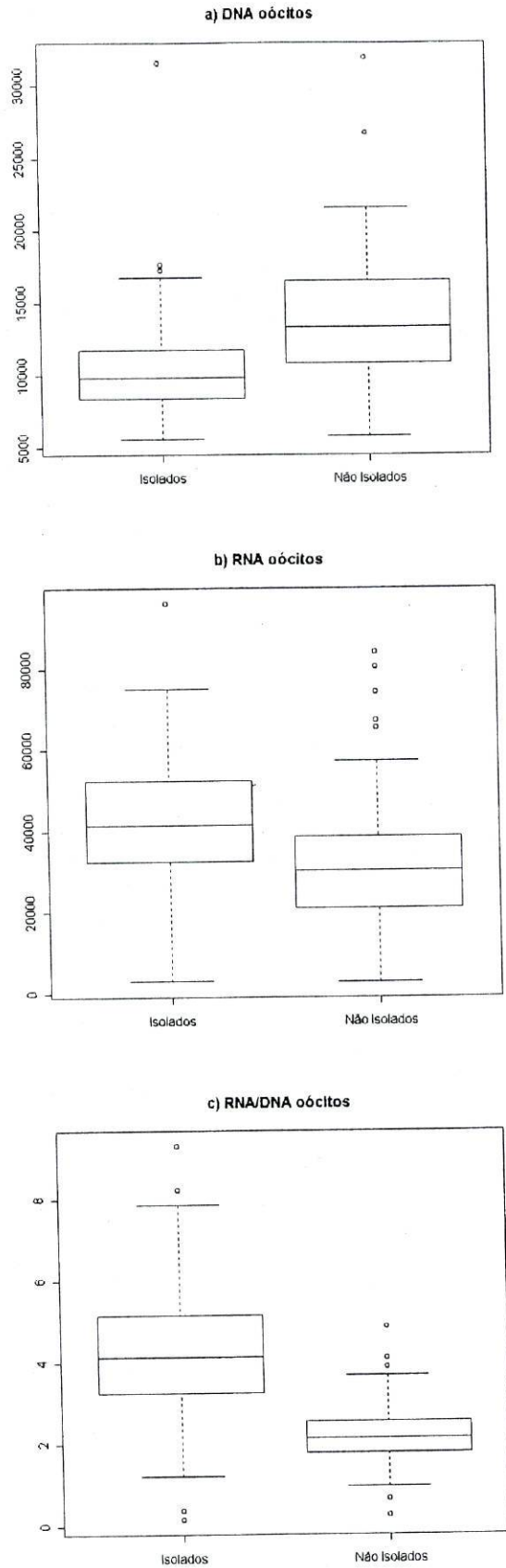


Figura 17- Ácidos nucleicos dos oócitos não isolados e isolados a) DNA ($\mu\text{g}/\text{mg}$), b) RNA ($\mu\text{g}/\text{mg}$), c) RNA/DNA.

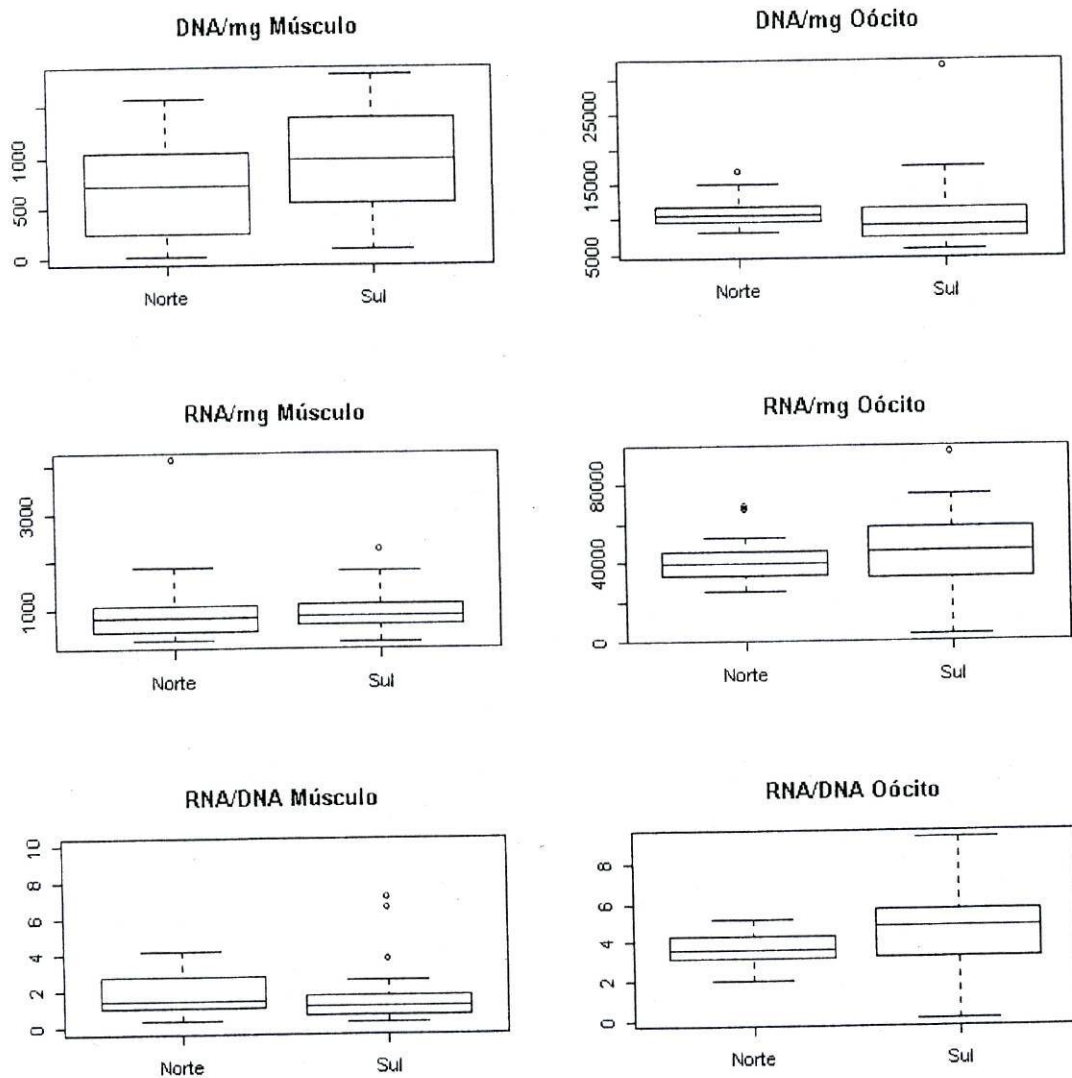


Figura 18 - Quantidade de ácidos nucleicos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) e razão RNA/DNA no músculo e oócitos das fêmeas em pré-desova na zona Norte e Sul.

um $\alpha = 0.05$) entre o índice RNA/DNA dos oócitos das duas zonas, sendo ligeiramente superior na região Sul. Esta diferença resulta do facto de existir menor quantidade média de RNA por mg de peso no caso da região norte e maior quantidade média de DNA por mg de peso na mesma região. Apesar da semelhança dos valores do índice no caso do músculo, a quantidade de DNA por mg de peso húmido é estatisticamente diferente nas duas zonas ($p=0.01$), embora com uma ligeira diferença.

Na Figura 19.1 está representada a relação da quantidade de ácidos nucleicos e o índice RNA/DNA no músculo e oócitos com o peso eviscerado e na Figura 19.2 com o comprimento dos indivíduos. O índice RNA/DNA e a quantidade de DNA não estão relacionados com o peso eviscerado nem com o comprimento dos indivíduos, enquanto a quantidade de RNA no músculo estão relacionada com ambas as variáveis, embora com um factor de correlação baixo. A quantidade de DNA e RNA nos oócitos está relacionada com o peso eviscerado e comprimento dos indivíduos com valores de correlação muito semelhantes para ambas as variáveis. O índice RNA/DNA do oócito esteve também correlacionado com o peso eviscerado dos indivíduos mas não com o comprimento destes. Todas estas relações descritas entre a quantidade de ácidos nucleicos e o peso e comprimento dos indivíduos foram inversas (quanto maior o peso ou comprimento dos indivíduos, menos a quantidade de ácidos nucleicos ou do índice RNA/DNA).

Foram comparados os valores do índice RNA/DNA entre o músculo e oócitos de cada fêmea (Figura 20) para as duas zonas, excluindo os 3 valores no músculo de índice superior a 10 considerados "outliers". Não existe nenhuma relação clara entre os valores do índice de condição RNA/DNA entre o músculo da fêmea e a qualidade dos oócitos por si produzidos, quer para o total de indivíduos ($p=0.8$) quer para os indivíduos de cada uma das zonas ($p=0.7$ para o Sul e $p=0.1$ para o Norte). No entanto, a Fig.20 indica que a maioria dos indivíduos do Sul têm valores de RNA/DNA no músculo bastante baixos correspondentes a valores de RNA/DNA do oócito muito variáveis, enquanto os indivíduos de Norte têm valores de RNA/DNA no músculo mais variáveis correspondentes a valores do mesmo índice no oócito mais constantes e intermédios.

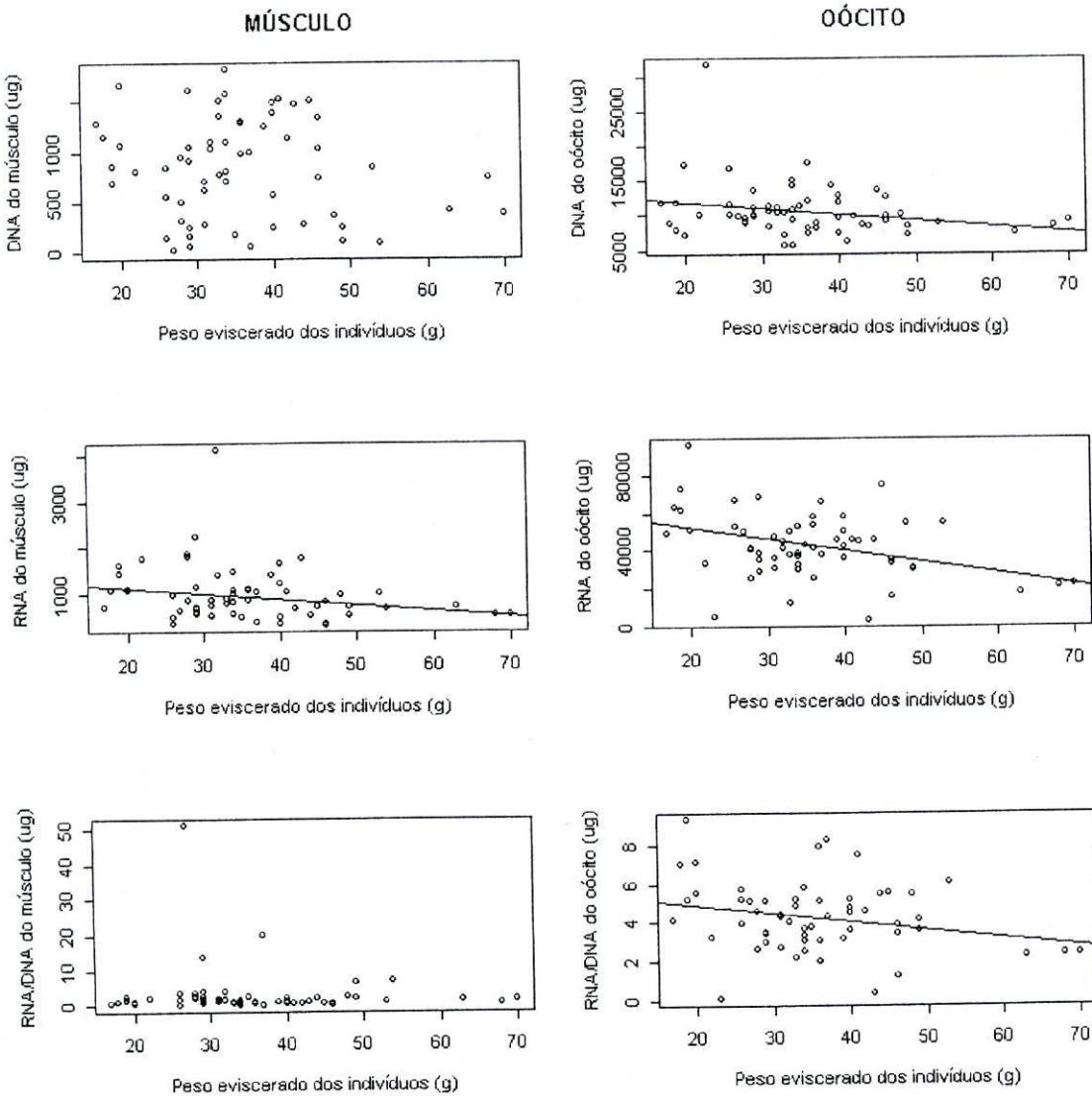


Figura 19.1 - Relação entre a quantidade de ácidos nucleicos ($\mu\text{g/g}$) e do índice RNA/DNA com o peso eviscerado dos indivíduos. Recta de regressão do RNA do músculo e do peso: $y = 1344 - 12.1x$, com $p = 0.014$ e $r^2 = 10\%$. Recta de regressão do DNA do oócito e do peso: $y = 13722 - 88.3x$, com $p = 0.047$ e $r^2 = 7\%$. Recta de regressão do RNA do oócito e do peso: $y = 63794 - 595x$, com $p = 0.002$ e $r^2 = 14\%$. Recta de regressão do RNA/DNA do oócito e do peso: $y = 5.7 - 0.04x$, com $p = 0.041$ e $r^2 = 7\%$.

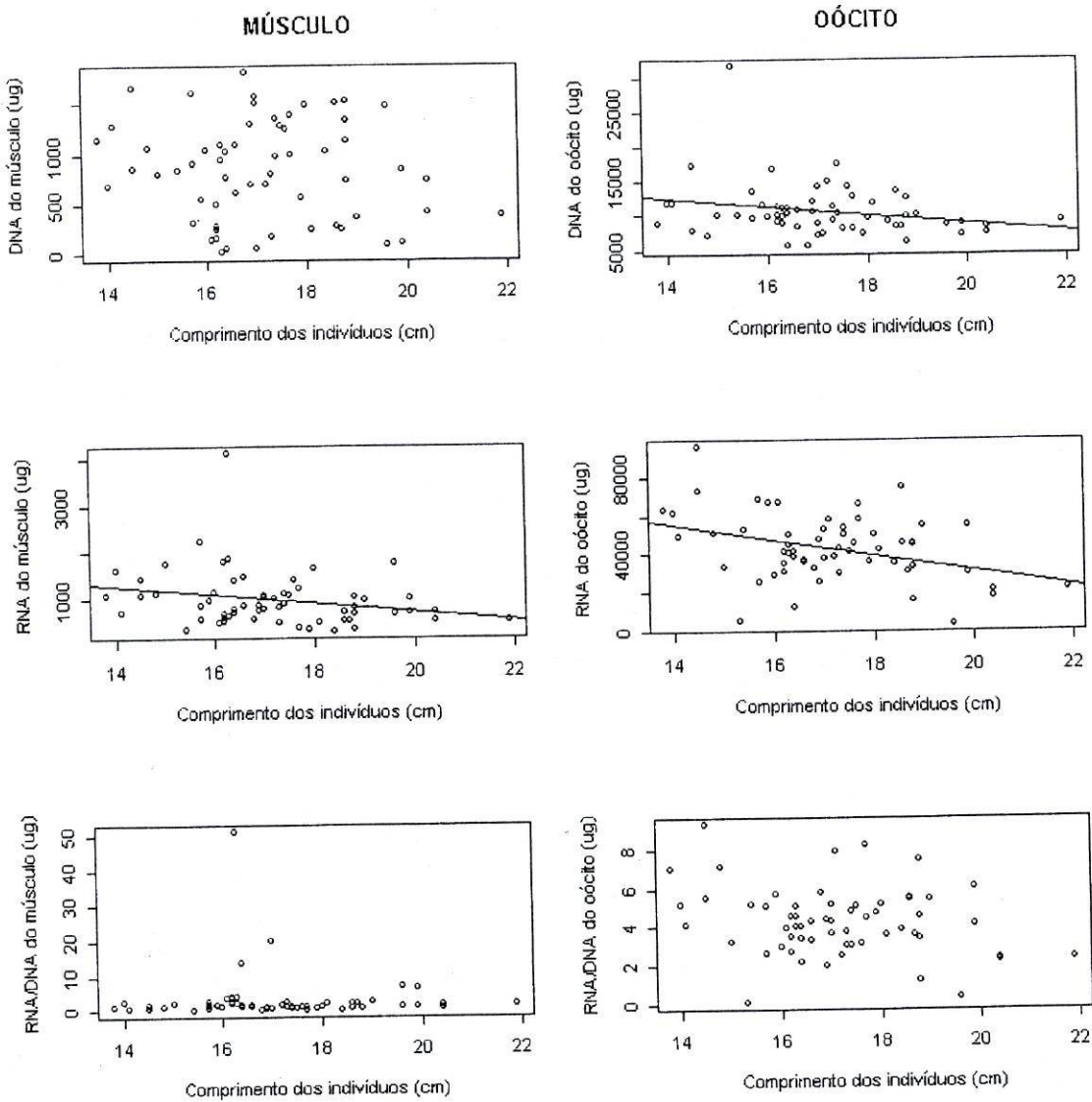


Figura 19.2 - Relação entre a quantidade de ácidos nucleicos ($\mu\text{g/g}$) e do índice RNA/DNA com comprimento dos indivíduos. Recta de regressão do RNA do músculo e do comprimento: $y = 2545 - 92.28x$, com $p = 0.042$ e $r^2 = 6\%$. Recta de regressão do DNA do oócito e do comprimento: $y = 20562 - 528x$, com $p = 0.049$ e $r^2 = 7\%$. Recta de regressão do RNA do oócito e do comprimento: $y = 109769 - 3917x$, com $p = 0.003$ e $r^2 = 14\%$.

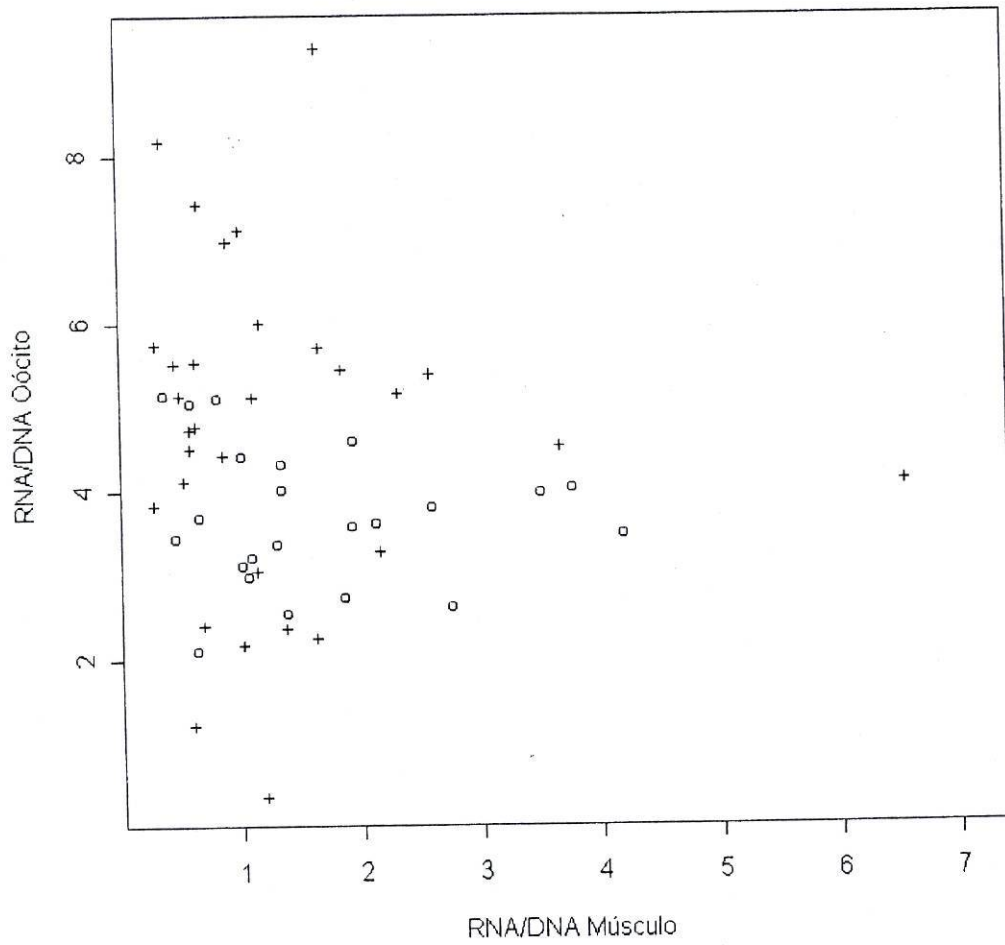


Figura 20 - Relação entre o índice RNA/DNA do músculo e dos oócitos das fêmeas em pré-desova da região Norte (o) e Sul (+).

4 - DISCUSSÃO

4 - DISCUSSÃO

Metodologias

A proporção do peso das paredes do estômago em relação ao peso eviscerado é diferente nos 3 conjuntos de amostras, sendo 0.41% no Verão, 0.54% no início da Primavera e 0.93% no final da Primavera. Uma das razões que pode explicar esta diferença são os diferentes níveis de gordura que existem em cada época. No Verão há muita gordura acumulada nos tecidos, que contribui significativamente para o peso dos indivíduos. A quantidade de gordura vai diminuindo ao longo da época de desova, o que explica a maior proporção do peso do estômago para o peso total dos indivíduos nas últimas amostras de Primavera. Para além disto, o peso das paredes dos estômago esteve correlacionado positivamente neste estudo com o peso do conteúdo estomacal. Duas hipóteses surgem para explicar esta relação. Os estômagos mais cheios ficam mais irrigados e hidratados, aumentando o peso do saco estomacal. Para além disso, o método de amostragem foi alterado do Verão para a Primavera; enquanto no Verão se congelavam as vísceras imediatamente após a recolha dos dados biológicos, na Primavera optou-se por se isolarem e pesarem os estômagos no seguimento da recolha destes dados. Como se trata de um processo demorado, foi necessário hidratar os estômagos para evitar que estes secassem, o que pode explicar o aumento de peso. No entanto, esta alteração foi efectuada em todas as amostras de Primavera e apenas nas de Março/Abril se observam maiores pesos das paredes.

Neste estudo foram comparados os resultados obtidos através de uma análise individual de estômagos da mesma amostra com os resultados obtidos através de conjuntos de fracções dos estômagos da mesma amostra. Para além da variabilidade entre os estômagos da mesma amostra, a diferente fracção de cada estômago realmente contabilizada nos conjuntos e na análise individual pode ser a principal causa das diferenças de resultados obtidas entre os dois métodos, particularmente nos grupos pouco abundantes. No caso de se pretender uma perspectiva geral da dieta desta espécie em vários locais ou épocas usando conjuntos de vários conteúdos estomacais por amostra, dever-se-à usar uma quantidade de conteúdos maior do que a usada neste trabalho, principalmente para garantir a representatividade das presas menos abundantes. Mesmo contabilizando uma maior fracção de estômagos nos

conjuntos, o tempo de análise é significativamente menor do que a contagem dos itens em estômagos individuais.

Van der Lingen (2002) encontrou diferenças mínimas entre conteúdos estomacais de peixes do mesmo cardume no que diz respeito a frequências médias de tamanhos das presas, embora as diferenças sejam significativas no que diz respeito ao número de presas identificáveis. Como as medições dos itens alimentares no presente estudo foram realizadas em conjuntos formados pelas fracções de conteúdos de cada amostra, não é possível concluir se as variações no tamanho das presas deste estudo foram também pouco variáveis entre indivíduos da mesma amostra, mas os parâmetros alimentares analisados (peso dos conteúdos, número de itens por estômago) foram também muito variáveis entre estômagos da mesma amostra. Se admitíssemos uma baixa variabilidade entre estômagos da mesma amostra, poder-se-ia realizar um estudo mais detalhado (por exemplo, um ciclo sazonal) do regime alimentar da espécie de uma forma mais expedita do que neste trabalho, agrupando vários estômagos da mesma amostra e observando apenas uma fracção destes, calculando depois a contribuição de cada estômago para o total através dos pesos individuais. Os resultados deste estudo sugerem, no entanto, uma grande variabilidade nos parâmetros alimentares entre indivíduos da mesma amostra, que deverá ser considerada num estudo deste género. Deve-se, assim, tentar escolher indivíduos das mesmas classes de comprimento já que poderão existir diferenças na dieta alimentar segundo o comprimento dos indivíduos, como foi referido anteriormente. Ao assumir um valor médio para os parâmetros alimentares de uma determinada amostra é de esperar uma grande variabilidade nos itens alimentares entre os estômagos que a compõe, embora a proporção geral de itens fito e zooplactónicos (e eventualmente do tamanho dos itens alimentares) pareça ser relativamente constante.

O método numérico e o método volumétrico usados neste estudo apontam para diferentes relações de importância das presas na dieta alimentar da sardinha. De acordo com o método numérico observa-se que em todas as amostras excepto uma (Peniche no final da Primavera) o fitoplâncton foi numericamente mais abundante do que o zooplâncton, chegando a representar cerca de 90% dos itens alimentares por estômago. No entanto, os métodos numéricos sobrestimam a importância das pequenas presas (Hyslop, 1980) e é por esta razão que, de acordo com van der Lingen (2002), se assumiu inicialmente uma fitofagia obrigatória dos clupeídeos em ecossistemas de afloramento, quando os métodos numéricos eram preferencialmente

usados. Apesar disso, o método numérico reflecte o processo de aquisição de presas, sendo útil quando se estuda o comportamento alimentar (MacDonald *et al.*, 1983). De acordo com Hyslop (1980), nenhum método de análise de conteúdos estomacais fornece um quadro completo da importância da dieta, pelo que se deverá utilizar um método numérico e um método que estime o tamanho das presas, bem como registar o grau de digestão dos itens.

O cálculo do biovolume visou melhorar a estimativa da relevância das presas para a alimentação da sardinha, entrando em linha de conta com as dimensões dos organismos. O método volumétrico tem como principal problema o facto da água retida no interior dos itens poder causar graves erros de estimativa (Hyslop, 1980). O biovolume médio dos grupos taxonómicos identificados em cada um dos conjuntos de estômagos não se alterou, por regra, entre amostras, principalmente em indivíduos classificados ao nível da espécie ou do género. No entanto, podem-se observar algumas diferenças, das quais importa justificar; os tamanhos díspares entre copépodes devem-se ao facto de se terem medido no mesmo grupo os indivíduos adultos e os copepoditos. Noutros casos, apesar de se tentar aproximar a forma do indivíduo inteiro quando este se encontrou parcialmente destruído nem sempre foi possível. De acordo com van der Lingen (2002), apesar do método volumétrico ser mais apropriado, não é ainda suficientemente preciso. De facto, o número de itens alimentares e o biovolume total destes não reflectem a sua biomassa, já que nem uma nem outra medição estiveram correlacionadas com o peso dos conteúdos estomacais. Van der Lingen (2002) propõe a utilização de conteúdos em carbono e nitrogénio das diferentes presas como forma de estimar o real valor nutritivo das presas.

Hyslop (1980) refere que a digestão diferencial causa erros na determinação da importância alimentar, e Varela *et al.* (1988) refere que o que se estuda ao observar conteúdos estomacais não é exactamente o que é comido mas sim o que resiste à acção digestiva. A ocorrência relativa dos tipos de presas é afectado pelas diferentes taxas de digestão (van der Lingen, 2002). Este autor refere ainda que o fitoplâncton se digere mais rapidamente do que o zooplâncton, o que pode subestimar a contribuição do fitoplâncton. As diferenças no grau de digestão entre amostras podem causar um erro nas contagens dos itens alimentares dos estômagos, já que a partir de um determinado ponto a matéria orgânica degrada-se até não ser identificável nem quantificável através da observação. Assumindo o mesmo procedimento laboratorial, a única diferença nas digestões seria consequência da diferente resistência dos itens

alimentares à digestão e do tempo decorrido entre a ingestão dos alimentos e a captura dos indivíduos (assumindo um tempo igual entre a captura e a conservação e análise) ou uma maior degradação dos tecidos na presença de diferentes condições ambientais. Assim, as diferenças significativas entre o Verão e a Primavera podem ser reflexo da maior velocidade de digestão no Verão por causa da temperatura ambiente mais elevada, enquanto as diferenças entre as amostras de portos comerciais e da campanha de investigação podem ser consequência da alteração no método de amostragem, descrito no material e métodos, que envolveu uma congelação mais eficiente dos indivíduos recolhidos nas campanhas. As amostras dos portos comerciais foram recolhidas durante a noite, ao contrário das amostras da campanha, recolhidas durante a tarde. Assumindo que a sardinha tem uma hora preferencial de alimentação (hipótese não confirmada pelas conclusões de van der Lingen, 1995 em *Sardinops sagax*), este factor levaria a que os conteúdos estomacais recolhidos à hora mais próxima do pico de alimentação estariam menos digeridos. Não há, no entanto, dados conclusivos para a *Sardina pilchardus* sobre o ciclo diário de alimentação nem o tempo de digestão dos alimentos.

Existem ainda outros problemas na representatividade do número, biovolume ou biomassa dos itens alimentares para a alimentação da sardinha, nomeadamente porque nem tudo o que está no estômago é assimilado, podendo existir alguns itens (por exemplo os quistos de dinoflagelados) que passam pelo sistema digestivo da sardinha sem serem assimilados. O mesmo poderá acontecer aos ovos de crustáceos, muito abundantes neste estudo, os quais parecem possuir resistência à passagem no tubo digestivo de Clupeídeos (Flinkman *et. al.*, 1994). Além disso, as espécies mais frágeis podem-se degradar assim que chegam ao estômago da sardinha, que não sendo sequer contabilizadas. É visível inclusivamente, matéria orgânica nos estômagos já digerida e portanto não identificada, o que explica de certa forma a correlação pobre entre o peso dos conteúdos estomacais e o número de itens alimentares quantificados em cada estômago.

Foi aplicado neste estudo um novo método para estimar a contribuição dos itens alimentares fitoplanctónicos para a dieta da sardinha, a fluorimetria, de uma forma significativamente mais rápida do que o tradicional método numérico. O facto da correlação entre os itens fitoplanctónicos autotróficos e dos pigmentos fotossintéticos não ser altamente significativa neste estudo pode ser devida a vários factores. Existem itens fitoplanctónicos sem uma estrutura exterior resistente que

provavelmente são degradados em contacto com o ácido do estômago e que, por essa razão, não são contabilizados através do método numérico embora o sejam através da fluorimetria, bem como itens de reduzidas dimensões não identificados. Para além disso, os copépodes e outros organismos zooplancónicos poderão ter no seu interior microalgas que não são contabilizadas, para além das existentes nos “pellets” fecais. Este método parece ser uma alternativa útil aos restantes métodos disponíveis para estimar a contribuição das presas fitoplanctónicas para a alimentação de espécies planctívoras, pela extrema rapidez de análise, já que se podem realizar no tempo de análise numérica de um conteúdo estomacal individual, aproximadamente 50 medições de pigmentos fotossintéticos em estômagos individuais, para além deste método conseguir também contabilizar os itens fitoplanctónicos que, pelo avançado estado de digestão, não conseguem ser identificados e quantificados. Dever-se-á, no entanto, homogeneizar previamente o estômago para garantir um valor médio de pigmentos para cada conteúdo estomacal.

Dieta alimentar

Neste trabalho é descrita a alimentação da sardinha em duas épocas do ano (Verão e Primavera) e em duas zonas da costa continental portuguesa (Peniche e Portimão) através da análise de conteúdos estomacais. Pela análise dos conteúdos estomacais observados neste estudo é possível concluir que a sardinha é uma espécie omnívora, que se alimenta de uma grande diversidade de espécies de fito e zooplâncton. De entre os vários grupos de plâncton identificados, os copépodes e dinoflagelados foram os únicos presentes em todos os estômagos. As diatomáceas dominaram claramente em termos de número total de itens por estômago nas amostras de Primavera, embora tenham estado praticamente ausentes durante o Verão. O fitoplâncton foi o grupo mais abundante praticamente em todas as amostras, embora o zooplâncton, em particular os copépodes, tenha sido o grupo mais representativo em termos de biovolume. De igual forma, Silva (1954), encontrou copépodes nos estômagos de sardinhas capturadas na costa portuguesa ao longo de todo o ano, o que levou a autora a considerá-los como o alimento básico para esta espécie. Também Varela *et al*, (1988) considera os copépodes, pelo seu tamanho, o elemento adequado para a alimentação da sardinha. Um estudo realizado no Adriático (Vuèetić, 1963)

aponta uma alimentação quase exclusiva de zooplâncton, fundamentalmente de copépodes e larvas de decápodes.

Os itens alimentares da sardinha variaram entre 18.8 μm e 1560 μm . Num estudo realizado na plataforma Galega, o comprimento dos itens alimentares de sardinha variou entre 50 μm e 5-6 mm (Varela *et al.*, 1988). O limite inferior do tamanho das presas desta espécie na pode, de facto, ser superior ao encontrado no presente estudo, já que corresponde ao tamanho de uma célula de *Paralia sulcata*, uma diatomácea em cadeia. O limite superior de tamanho dos itens filtrados pela sardinha foi largamente superior na costa Galega do que o encontrado no presente estudo. Para além disso, Varela *et al.*, (1988) encontraram várias amostras em que os itens alimentares zooplanctónicos de tamanho superior a 250 μm foram mais abundantes em número do que os itens da fracção menor de 250 μm . Ao contrário, no presente estudo, os itens da fracção inferior a 200 μm foram sempre mais abundantes (numa percentagem superior a 85%) do que as presas maiores. A fracção superior a 200 μm representou, no entanto, a maior percentagem do biovolume total de presas por estômago em praticamente todas as amostras.

Silva (1954) encontrou nos meses de Abril e Maio uma grande quantidade de ovos de peixe que "pela sua morfologia e tamanho" identificou como sendo de sardinha. Neste estudo, os ovos de peixe encontrados nos estômagos, apenas nas amostras de Peniche no Verão e início da Primavera, não foram identificados. Os que se encontraram em boas condições possuíam uma larva pigmentada, não sendo portanto de sardinha. Os restantes, que se encontraram em elevado estado de degradação (cápsula esvaziada e achatada) não se conseguiram identificar, embora de facto, pelo tamanho, poderiam ser de sardinha. Dado que vários autores sugerem que a predação dos ovos pelos adultos de sardinha poderá ser uma causa importante de mortalidade (Silva, 1954, Varela *et al.*, 1988), seria importante identificar os ovos de sardinha presentes nos conteúdos gástricos da mesma. Na costa sul africana, mais de 80% dos estômagos de sardinha capturada continham ovos de biqueirão, estimando-se em 56% a mortalidade dos ovos devido à predação da sardinha. (Szeinfeld, 1991). Dado a que a sardinha e o biqueirão partilham o mesmo habitat na costa sul de Portugal, seria igualmente interessante avaliar o impacto da predação da sardinha nos ovos de biqueirão.

Comportamento alimentar

As presas de pequeno tamanho foram as mais abundantes nos estômagos das sardinhas analisadas, tal como ocorreu num estudo realizado em *Sardinops sagax* (van der Lingen, 2002). Este autor (1995) sugere que a sardinha maximiza os ganhos de energia através de consumos prolongados e energeticamente pouco dispendiosos, sendo capaz de alterar o seu comportamento alimentar para uma perseguição e captura na presença de presas grandes em baixas concentrações. Assim, as presas de menor tamanho reflectem uma alimentação por filtração passiva, definida para a espécie sul africana abaixo dos 112 μm (van der Lingen, 1994). O mesmo cálculo não existe para *Sardina pilchardus* mas, se assumirmos um valor semelhante ao encontrado para *S. sagax*, a maioria das presas encontradas nos estômagos do presente estudo seriam resultado de uma filtração passiva da água.

Não foi encontrado nenhum estômago vazio neste estudo, no qual se analisaram sardinhas recolhidas durante o período da noite, início da manhã e durante a tarde, o que sugere uma alimentação contínua ao longo do dia. Este resultado está de acordo com o trabalho de van der Lingen (1998) para *Sardinops sagax* que aponta para diferenças mínimas na alimentação da sardinha ao longo de 24 horas. Por outro lado, as amostras de Março/Abril foram as únicas recolhidas ao final da tarde, enquanto as restantes foram recolhidas durante a noite, o que poderia ter sido influenciado por um ritmo de alimentação mais intenso durante esse período. Holzlöhner (1980) num estudo realizado em *Sardina pilchardus* na costa Noroeste de África sugere que a alimentação da sardinha é máxima no final da tarde e início da noite e mínima desde o início da manhã até ao período da tarde. Assim, geralmente os estômagos encontrar-se-ão mais cheios no período da noite do que no período do dia, conclusões opostas ao observado para o Adriático, em que Vuèetić, (1963) define o pico de alimentação ao início da tarde e sugere que a sardinha não se alimenta durante a noite.

O padrão de distribuição vertical da sardinha ao longo do dia influencia também o seu ritmo diário de alimentação, já que a abundância de alimento nas camadas superficiais e profundas da coluna de água é geralmente bastante diferente. Giannoulaki *et al.* (1999) através de dados acústicos propõem que a intensidade da luz e topografia de fundo são os principais factores que afectam a migração vertical da sardinha. De uma forma geral os indivíduos descem ao amanhecer, mantêm-se a essa

profundidade com pequenas variações relacionadas com a intensidade luminosa e sobem ao entardecer. Por um lado a luz pode favorecer o reconhecimento visual das presas durante o dia, por outro lado, a migração para a zona eufótica ao entardecer pode levar a sardinha para uma profundidade com maior abundância de plâncton, que por regra caracteriza a camada superficial do oceano, o que significaria que as amostras recolhidas ao entardecer estarão mais próximas do pico diário de alimentação da espécie. No entanto, Soares (1995), em águas portuguesas, observou um padrão de migração vertical da sardinha ao longo do dia oposto a este, em que no nascer do sol as sardinhas migram para a superfície formando cardumes individualizados e densos e no crepúsculo dispersam e migram para camadas mais perto do fundo. Um estudo do ciclo diário de alimentação da sardinha comparativo com uma amostragem vertical de plâncton da água poderia ajudar na determinação da posição da sardinha na coluna de água ao longo do dia.

Nas amostras de água recolhidas durante a Primavera nas mesmas zonas do que os estômagos de sardinha analisados, ocorrem em grande abundância espécies de diatomáceas de afloramento (*Rhizosolenia* spp., *Eucampia* spp., *Detonula* spp., *Guinardia striata*., *Leptocylindricus* spp. e *Chaetoceros* spp.) ausentes nos estômagos e típicas das águas de superfície (Moita, 2001). Ao contrário, nos estômagos, como foi referido, ocorre uma comunidade de natureza bentónica (Moita, 2001) como as espécies *Paralia sulcata*, *Thalassiosira* spp., *Navicula* spp., *Odontella* spp., *Pleurosigma* spp., *Diploneis* spp. e *Thalassionema* spp.. Um grupo abundante nos estômagos e na água são as *Pseudo-nitzschias*, espécies com uma distribuição mais profusa na coluna de água (Moita, M.T. *com. pess.*). Quanto aos dinoflagelados, a maioria das espécies presentes nos estômagos pertencem ao género *Protoberidinium*, sendo espécies heterotróficas cuja distribuição, por essa razão, pode estender-se a maior profundidade na coluna de água. O grupo de fitoplâncton não identificado presente nos estômagos, constituído por células esféricas aparentemente autotróficas (com cloroplastos visíveis), poderá representar uma forma de quisto temporário de alguma espécie de fitoplâncton que, por essa razão, se localize fundamentalmente em maiores profundidades. Da mesma forma, quando analisamos a composição relativa do zooplâncton, observa-se nos estômagos que os copépodes *Oncaea* juntamente com os Harpacticoida dominam. Ao contrário, na águas de superfície, existiu uma proporção maior de Calanóides e uma ausência de Poecilomastoida, como as *Oncaea*, sendo os tintinídeos o grupo mais abundante à superfície.

Poecilomastoida, como as *Oncaea*, sendo os tintínídeos o grupo mais abundante à superfície.

Kršinić (1998) propõe a existência de diferentes comunidades de microzooplâncton, baseado na zonação vertical, para o Adriático, distinguindo quatro comunidades; a de superfície (0-50 m), com máximos de tintínídeos, Calanóides e Ciclopóides, a de subsuperfície (50-100 m), com números intermédios entre as abundâncias desta e da seguinte comunidade, a média (100-600 m), em que 76% dos copépodes eram *Oncaea*, e finalmente a comunidade profunda (abaixo dos 600 m) em que a contribuição das *Oncaea* diminuiu, aumentando a contribuição dos Ciclopóides. Assumindo uma distribuição vertical do microzooplâncton para o Atlântico semelhante à do Adriático (em termos de níveis estratificados de espécies de plâncton, já que a profundidade de ambos os sistemas é bastante diferente) os dados de fito e zooplâncton do presente estudo parecem apontar para que a sardinha se alimenta, pelo menos durante a época de desova, numa camada subsuperficial ou média, onde dominam as diatomáceas pinuladas, os dinoflagelados heterotróficos e os copépodes Poecilomastoida e não na superfície, onde se encontram geralmente os máximos de indivíduos e de biomassa fito e zooplânctónica. Por outro lado, os Calanóides encontraram-se, regra geral, mais digeridos do que os restantes copépodes, o que pode explicar a sua baixa frequência nos estômagos. Estes dados apontam para que a sardinha se alimente principalmente junto ao fundo durante a época de desova ao final do dia, embora o facto de ter ocorrido nas duas amostras estudadas não permita para já generalizar esta conclusão. Não existem também neste estudo, amostras comparativas do plâncton da água à superfície e nos estômagos de sardinha durante o Verão. Nos estômagos de Verão analisados são dominantes os dinoflagelados *Dinophysis spp.* e *Protoperidinium spp.*. Os últimos, como foi já referido, não estão limitados à camada superficial da coluna de água já que são heterotróficos. O género *Dinophysis spp.* é característico de águas estratificadas junto à costa e é autotrófico, tendo ocorrido em grande abundância durante esse período do ano na costa portuguesa (Vilarinho, G. *com. pess.*).

Varela *et al.*, (1988) considera que as diatomáceas são preferidas em relação aos dinoflagelados e apenas nos meses de Verão, quando as diatomáceas são pouco abundantes, os dinoflagelados se tornam importantes na alimentação desta espécie. No entanto, a frequência de ocorrência de dinoflagelados no presente estudo é superior à das diatomáceas, tendo sido quantificados em todos os estômagos, ao

contrário das diatomáceas, praticamente ausentes durante o Verão. Apesar das diatomáceas serem o grupo mais abundante nas amostras de Primavera são também nesta época menos representativas em termos de biovolume do que os dinoflagelados, já que o tamanho das diatomáceas foi claramente inferior ao tamanho médio dos dinoflagelados encontrados neste estudo.

Varela *et al.*, (1988), ao analisar conteúdos estomacais de sardinhas capturadas no Norte de Espanha, encontrou algumas estações com predomínio de fitoplâncton na água embora com maior concentração de zooplâncton nos estômagos. Isto pode indicar uma actividade predadora selectiva para o zooplâncton mas, tal como referem os autores, pode também indicar que a sardinha, como espécie migradora, se alimentou noutras zonas onde predominou o zooplâncton. A falta de correspondência entre amostras de plâncton e de conteúdos estomacais recolhidos na mesma zona não implica necessariamente um comportamento alimentar preferencial por algum tipo de itens, já que a distribuição do plâncton não é uniforme na mesma zona, nem horizontal nem verticalmente, pelo que peixes migradores podem-se ter alimentado numa zona contígua ou a outra profundidade com uma composição planctónica diferente.

O resultado da comparação da quantidade e proporção de espécies de menor tamanho (fitoplanctónicas) nos estômagos das sardinhas com diferentes comprimentos não foram conclusivos. A alimentação da sardinha faz-se através de estruturas muito finas localizadas nas brânquias (branquispinhas), pelas quais consegue filtrar a água do mar e reter organismos planctónicos (Culley, 1971). De acordo com King *et al.*, (1976) num estudo em *Sardinops ocellata*, o sistema de branquispinhas da sardinha evolui com a maturação dos indivíduos, ganhando menor porosidade ou maior sobreposição das bransquispinhas no segundo, terceiro e quarto arcos branquiais. Desta forma, sardinhas jovens não têm a capacidade de reter partículas muito pequenas como grande parte das espécies de fitoplâncton e sardinhas adultas serão já capazes de reter partículas tão pequenas quanto a maioria das espécies de fitoplâncton. Poder-se-ia assim esperar que quanto maior a idade dos indivíduos, estes tivessem acesso a itens alimentares progressivamente menores, existindo uma maior quantidade de organismos fitoplanctónicos nos estômagos com a idade. Os resultados deste trabalho não apontam para estas diferenças de uma forma clara, possivelmente porque as classes de comprimento seleccionadas não foram suficientemente contrastantes. Por outro lado, enquanto as sardinhas de menor comprimento da

amostra de Portimão concentraram uma quantidade significativamente menor de fitoplâncton do que as sardinhas maiores, nas sardinhas da amostra de Peniche as diferenças não foram significativas. No entanto, para a maioria das sardinhas de menor tamanho de Peniche, ao contrário de todas as outras, a época de desova tinha já chegado ao fim, o que se pode ter traduzido num comportamento alimentar mais activo. De facto, o peso do conteúdo destes indivíduos é quase igual ao das sardinhas maiores, enquanto na zona de Portimão é cerca de metade. Seleccionando indivíduos de idades suficientemente diferentes mas em igual estado de maturação e caracterizando a morfometria do sistema de branquias para cada classe de comprimento e a predação de itens fitoplanctónicos, seria possível observar se sardinhas de diferentes idades têm diferentes capacidades de retenção dos itens menores.

Variação geográfica da dieta

Os estômagos recolhidos na zona de Peniche tiveram maior número de itens por estômago bem como uma maior proporção de itens fitoplanctónicos e de número de pigmentos fotossintéticos, quando comparadas as mesmas datas da zona de Portimão. A proporção de itens zooplanctónicos foi, no entanto, superior em Portimão, bem como o biovolume médio de itens alimentares por estômago.

Num estudo realizado ao longo da costa portuguesa (Moita, 2001), os máximos de fitoplâncton do Verão, época onde os dinoflagelados apresentaram a maior abundância, localizaram-se na costa NW de Portugal, embora exista também um pico na zona do Cabo de São Vicente, o que parece apoiar a ideia que durante esta época as sardinhas da costa NW tiveram acesso a uma maior biomassa fitoplanctónica. No estudo da mesma autora, os máximos fitoplanctónicos de Primavera, dominados por diatomáceas, localizaram-se na costa Sul de Portugal, enquanto a costa NW se mostrou bastante pobre em fitoplâncton total (onde existiram os máximos de biomassa zooplanctónica), o que contraria os resultados do presente estudo, em que os indivíduos da costa Sul tiveram acesso a uma maior proporção de zooplâncton e menor de fitoplâncton. No entanto, a autora é da opinião que o forte afloramento terá levado a maior concentração fitoplanctónica da costa NW mais para o largo, fora da zona de amostragem. De acordo com Moita (2001), existem diferenças espaciais na abundância e na organização das comunidades planctónicas

entre a plataforma NW e SW/S de Portugal, em que os máximos de fitoplâncton se encontram, de uma forma geral, durante todas as épocas do ano, a norte de Aveiro, o que parece dever-se a uma disponibilidade adicional de nutrientes originados por regeneração na região média da plataforma continental ou introduzidos pelas descargas dos rios. Para além disso, a costa ocidental está sujeita a afloramentos costeiros que estão intimamente ligados com o aumento da biomassa planctónica e que mantêm a produção primária elevada durante todo o Verão (Cunha, 2002), fenómeno que não ocorre na costa algarvia, embora ocorra no Cabo de São Vicente pelo que, de uma forma secundária, o aumento de biomassa planctónica pode ser arrastado para a costa sul.

Variação anual da dieta

Dias, *et. al.* (1996) propõe que o período de Julho a Setembro proporciona as melhores condições de alimentação da sardinha, já que é quando ocorrem as condições de afloramento mais intensas e mais extensas, que levam a grandes concentrações de fito e zooplâncton. Existem aliás autores que afirmam que a sardinha praticamente não se alimenta no período de desova (Cushing, 1978). Os resultados deste estudo contrariam esta ideia, já que os estômagos de Primavera, em plena época de desova, estiveram mais cheios do que os de Verão. No entanto, as amostras de Verão analisadas neste estudo são do final do mês de Agosto e de Setembro, não se sabendo se nos restantes meses de Verão a alimentação da sardinha atingiu um pico superior ao observado em Março-Abril. Na realidade, em estômagos recolhidos durante o mês de Junho do presente ano na Figueira da Foz (dados não incluídos nesta tese) registaram-se pesos de conteúdos superiores a 2 g, o que é praticamente o dobro do máximo registado nas amostras deste estudo. Silva (1954) registou os estômagos mais cheios durante um período de um ano no mês de Maio e os estômagos mais vazios no mês de Novembro, o que está de acordo com o ciclo anual de zooplâncton descrito por Cunha (2002). Por outro lado, as amostras de Primavera, onde ocorreram os estômagos com maior peso e maior número de itens alimentares, são as únicas efectuadas durante o dia, e não existem ainda, como foi já referido, dados conclusivos sobre o ritmo diário de alimentação da sardinha.

A comunidade de diatomáceas nos estômagos de Primavera, dominada por diatomáceas em cadeia como *Paralia sulcata*, *Pseudo-nitzschia spp.* e também do

género *Diploneis*, são características de uma zona de ressuspensão e mistura, composta por espécies de diatomáceas de natureza bentónica ou ticopelágica (Moita, 2001). As diatomáceas estão geralmente associadas à fase de intensificação do afloramento, sendo substituídas pelos dinoflagelados durante o relaxamento do processo (Fraga, 1993). As comunidades fitoplanctónicas presentes nos estômagos de Verão, essencialmente constituídas por espécies dos géneros *Dinophysis* e *Protoberidinium*, são comunidades típicas de águas estratificadas, com pouca turbulência e pouco ricas em nutrientes (Margalef, 1978).

Relação entre a condição nutricional das fêmeas e a qualidade dos oócitos

Neste estudo tentou-se relacionar a condição dos oócitos (como estimador da sua viabilidade) com a condição nutricional das fêmeas que os produziram. Não foi detectada nenhuma relação entre a condição nutricional das fêmeas em pré-desova e dos oócitos por si produzidos. Analisando a Figura 20 podem distinguir-se duas situações; 1) quando as fêmeas têm razões baixas de RNA/DNA (<1.8) no músculo na altura da postura os oócitos podem ter elevados ou baixos níveis de RNA/DNA, existindo uma maior variabilidade, 2) quando as fêmeas têm razões elevadas (>1.8) de RNA/DNA no músculo, os oócitos têm sempre também razões elevadas. Assim, a maior variabilidade de valores de RNA/DNA nos oócitos surge sobretudo se as fêmeas estão em má condição na altura da postura, o que parece indicar que a história alimentar da fêmea num período anterior à desova é que condiciona a desova. Se a fêmea esteve em condições de inanição durante a fase anterior à desova origina provavelmente oócitos com valores baixos de RNA/DNA, enquanto uma fêmea sujeita a condições alimentares óptimas num período anterior de alimentação provavelmente dá origem a oócitos de boa qualidade. As fêmeas que estão em más condições durante a desova mas que produzem oócitos com um elevado índice RNA/DNA devem ter já transferido as proteínas para as gónadas, apresentando uma relação RNA/DNA baixa no músculo.

Apesar destes resultados, vários estudos efectuados noutras espécies sugerem uma relação entre a condição nutricional das fêmeas na altura da desova e dos ovos por si produzidos (e.g. Scott, *et al.*, 1999; Chambers, *et al.* 1996; Kjesbu *et al.*, 1996 em *Gadus morhua*; Morimoto, 1991 em *Sardinops melanostictus*). O único trabalho encontrado que relaciona os efeitos parentais com a viabilidade dos descendentes em

Sardina pilchardus foi realizado por Riveiro *et al.* (2000). Em relação aos vários componentes bioquímicos estudados (proteínas, carboidratos e conteúdo lipídico), as proteínas foram as que estiveram melhor correlacionadas com a sobrevivência das larvas, ou seja, quanto maior o conteúdo proteico dos ovos maior a sobrevivência das larvas. De entre os vários índices de condição utilizados, o índice RNA/DNA foi o mais apropriado para classificar o estado nutricional de larvas de sardinha (Chícharo, 1996).

A quantidade de ácidos nucleicos nos oócitos e o RNA do músculo estiveram inversamente relacionados com o peso e o comprimento dos indivíduos. Em relação ao índice RNA/DNA dos oócitos esteve apenas inversamente correlacionado com o peso dos indivíduos. Há evidências que as fêmeas mais velhas iniciem a época de desova mais cedo (Cunha *et al.*, 1988; Figueiredo *et al.*, 1989), o que poderia explicar a sua pior condição física nesta altura da desova, reflectida na menor qualidade dos oócitos produzidos.

A quantidade de RNA e DNA por mg de peso foi significativamente superior nos oócitos, quando comparada com a mesma quantidade nas células do músculo de sardinha. A quantidade de RNA num oócito é muito elevada já que existem transcriptores maternos armazenados para o posterior desenvolvimento do embrião. O conteúdo em RNA de um oócito pode ser superior a um milhão de vezes do conteúdo numa célula somática (Tyler, *com. pess.*). Há assim uma grande quantidade de RNA no oócito fora do núcleo, que suporta a síntese proteica durante a oógenese e controla o desenvolvimento inicial até à transcrição do RNA embrionário que ocorre algum tempo após a fertilização (Tyler *et al.*, 1996). De igual forma, o DNA ribossómico está altamente amplificado nos ovócitos e é utilizado unicamente para fazer ribossomas durante a ovogénese, não sendo herdado pelo embrião e desaparecendo gradualmente durante as primeiras segmentações embrionárias (Roberts *et al.*, 1987).

No geral, encontrou-se, no entanto, pouca informação sobre genética de oócitos. A juntar à pouca informação existente, a quantidade de DNA por oócito não é fixa, como no caso das células somáticas o que dificulta a interpretação dos resultados com a utilização deste índice. Os índices bioquímicos que têm sido propostos para estudar esta relação são a determinação da quantidade de lipídios totais, classes de ácidos gordos, proteínas, vitaminas e aminoácidos livres, embora a combinação de vários índices seja ideal na determinação da relação entre o estado nutricional das fêmeas e dos ovos por si produzidos.

BIBLIOGRAFIA

- Chambers, R.C. and Waiwood, K., 1996. Maternal and seasonal differences in egg sizes and spawning characteristics of captive Atlantic cod, *Gadus morhua*. Can. J. Aquat. Sci., nº53, pp1986-2003.
- Checkley, D.M., Jr., P.B. Ortner, L.R. Settle, and S.R. Cummings. 1997. A continuous, underway fish egg sampler. Fish. Oceanogr. vol. 6, pp.58-73.
- Chícharo, M.A., 1996. Métodos de Avaliação do estado nutricional em larvas de *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) aplicados ao estudo das condições de sobrevivência no meio natural. Dissertação apresentada à Universidade do Algarve para a obtenção do Grau de Doutor.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Valdés, L., López-Jamar, E., Ré, P. 1998a). Does the nutritional condition limit survival of sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) larvae off the north coast of Spain? RNA/DNA and their variability. Fisheries Research, 39: 43-54.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Valdés, L., López-Jamar, E., Ré, P. 1998b). Estimation of starvation and diel variation of the RNA/DNA ratios in field caught *Sardina pilchardus* (L.) larvae off north of Spain. Mar. Ecol. Prog. Ser. 164: 273-283.
- Chícharo, L.M.Z., Chícharo, M.A., Alves, F., Amaral, A., Pereira, A. e Regala, J., 2001. Diel variation of the RNA/DNA ratios in *Crassostrea angulata* (Lamarck) and *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758) (Mollusca: Bivalvia). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., vol.259, pp121-129.
- Clemmesen, C., 1990. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA- and DNA content in individual marine fish larvae. ICES CM 1990/L:98.
- Culley, M., 1971. The Pilchard. Biology and Exploitation. Pergamon Press Ltd.: 241 pp.
- Cunha, M.E. and Figueiredo, I., 1988. Reproductive cycle of *Sardina pilchardus* in the central region off the portuguese coast (1971/1987). ICES CM 1988/H:61.
- Cunha, M.E., 2002. Physical control of biological processes in a coastal upwelling system: comparison of the effects of coastal topography, river run-off and physical oceanography in the northern and southern parts of Portuguese coastal waters. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Biologia, 293 pp.
- Esteves, E., Chícharo, M.A., Pina, T., Coelho, M.L. and Andrade, J.P. 2000. Comparison of RNA/DNA ratios obtained with two methods for nucleic acid quantification in gobiid larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 245 : 43-55.
- Cushing, D. H., 1978. Upper Trophic levels in Upwelling Areas. In: Boje, R., Tomczak, M. (eds.), Upwelling Ecosystems. Springer-Verlag, New York, p.101-110.
- Dias, C.A., Pestana, G., Soares, E. and Marques, V., 1996. Present state of sardine stock in ICES Divisions VIIIc and Ixa. ICES WD to the working group on the assessment of mackerel, sardine and anchovy.
- Everitt, B.S. The analysis of contingency tables. Chapman and Hall, London, 1977.
- Figueiredo, I. e Santos, A.M., 1989. Reproductive biology of *Sardina pilchardus* (Walb.): seasonal maturity evolution (1986 to 1988). ICES C.M. 1989/H:40.
- Flinkman, J., Vuorinen, I. e Christiansen, M., 1994. Calanoid copepod eggs survive passage through fish digestive tracts. ICES J. mar. Sci., vol.51, pp.127-129.

- Fraga, S., 1993. Harmful algal blooms in relation to wind induced coastal upwelling and river plumes. ICES C.M. 1993/L:38.
- Giannoulaki, M., Machias, M., Tsimenides, N., 1999. Ambient luminance and vertical migration of the sardine *Sardina pilchardus*. Mar. Ecol. Progr. Ser., vol.178 pp29-38
- Hasle, G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia A (ed). Phytoplankton manual. UNESCO Paris, pp88-96.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. J. Cons. Int. Expl. Mer., vol.30, pp3-15.
- Hislop, E. J., 1980. Stomach content analysis - a review of methods and their application. J. Fish. Biol., vol.17, pp411-429.
- Holzlohner, S., 1980. Diurnal food intake variations in *Sardina pilchardus* Walb. ICES CM 1980/H:55.
- King D.P.F. and MacLeod, 1976. Food and feeding of pilchard and Anchovy. Rep. Of South Africa Dep. Of Industries. Sea branch Investigational Rep. N°111.
- Kjesbu, O.S., Solemdal, P., Bratland, P. and Fonn, M., 1996. Variation in annual egg production in individual captive Atlantic cod (*Gadus morhua*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., n°53, pp610-620.
- Kršinić, F., 1998. Vertical distribution of protozoan and microcopepod communities in the South Adriatic Pit. J. Plankton Res., vol.20, pp.1033-1060.
- MacDonald, J.S. e Green, R.H., 1983. Redundancy of variables used to describe importance of preys species in fish diets. Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 40, pp635-637.
- Margalef, R., 1978. Phytoplankton communities in upwelling areas. The example of NW Africa. Oecologica Aquatica, vol. 3, pp. 97-132.
- Mathisen, O.A., Thorne, R.E., Trumble, R.J. and Blackburn, M., 1978. Food consumption of pelagic fish in an upwelling area. In: Upwelling Ecosystems. Edited by R. Boje and M. Tomczak. Springer-Verlag, New York, pp111-123.
- Moita, T., 2001. Estrutura, Variabilidade e Dinâmica do fitoplâncton na costa de Portugal Continental. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Doutor em Biologia, 157 pp.
- Morimoto H., 1991. Relationship between reproductive ability and nutritional body condition in Japanese sardine. ICES CM 1991/H:19.
- Parrish, R. H., Nelson, C. S. and Bakun A., 1981. Transport mechanisms and reproductive success of fishes in the California current. Biol. Oceanogr. 1(2):175-203.
- Pestana, G., 1989. Nota histórica sobre a avaliação do recurso de sardinha e seu desenvolvimento programático em Portugal (1950-1989). Prova complementar para as provas de acesso à categoria de Investigador auxiliar no IPIMAR.
- Pinto, J. S., 1951. Considerações gerais sobre a alimentação das sardinhas. Boletim de Pesca n°30 - Março 1951.
- Pissara, J. e Cavaco, M.H., 1984. Análise fluorimétrica de pigmentos fotossintéticos: condições de medição. Relat. INIP, Lisboa, 17pp.

- Riveiro, I., Guisande, C., Lloves, M., Maneiro, I. And Cabanas, J.M., 2000. Importance of parental effects on larval survival in *Sardina pilchardus*. Mar. Ecol. Progr. Ser., vol.205, pp249-258.
- Roberts, E. e Roberts Jr., E., 1996. Biologia celular e molecular. Ed: Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Schwartzlose, R.A., Alheit, J., Bakun, A., Baumgartner, T.R., Cloete, R., Crawford, R.J.M., Fletcher, W.J., Green-Ruiz, Y., Hagen, E., Kawasaki, T., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, S.E., MacCall, A.D., Matsuura, Y., Nevárez-Martínez, M.O., Parrish, R.H., Roy, C., Serra, R., Shust, K.V., Ward, M.N. and Zuzunaga, J.Z., 1999. Worldwide large-scale fluctuations of sardine and anchovy populations. S. Afr. J. Mar. Sci. 21, pp 289-347.
- Scott, B., Marteinsdottir, G. and Wright, P., 1999. Potential effects of maternal factors on spawning stock-recruitment relationships under varying fishing pressure. Can. J. Fish. Aquat. Sci., nº56, pp1882-1890.
- Sigurdsson, T. H., Astthorsson, O.S., 1991. Aspects of the feeding of the capelin (*Molotus villosus*) during autumn and early winter in the waters north of Iceland. ICES C.M./ H 49-, pp1-11.
- Silva, E., 1954. Some notes on the food of the pilchard *Sardina pilchardus* (Walb.), of the Portuguese coasts. Rev. Fac. Cienc. Lisboa, 2ª Série vol. 4, fasc. 2º:281-294.
- Soares, E., 1995. Contribuição para o estudo da distribuição e do comportamento da sardinha na costa continental portuguesa. Prova de Acesso à Categoria de Assistente de Investigação, 100pp.
- Strickland, J.D.H e Parson, T.R., 1968. A practical handbook of sea water analysis. Bull. Fish. Res. Board Canada, pp167-311.
- Szeinfeld, E., 1991. Cannibalism and intraguild predation in clupeoids. Mar. Ecol. Progr. Ser., vol.79, pp. 17-26.
- Tyler, C.R. e Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. in Fish Biol. and Fish., vol. 6, nº.3, pp.353-360.
- van der Lingen C.D., 1994. Effect of particle size and concentration on the feeding behaviour of adult pilchard *Sardinops sagax*. Mar. Ecol. Progr. Ser. Vol.109, pp1-13.
- van der Lingen C.D., 1995. Respiration rate of adult pilchard *Sardinops sagax* in relation to temperature, voluntary swimming speed and feeding behaviour. Mar. Ecol. Progr. Ser. Vol.129, pp 41-54.
- van der Lingen C.D., 1998. Nitrogen excretion and absorption efficiencies of *Sardinops sagax* fed phytoplankton and zooplankton diets. Mar. Ecol. Progr. Ser. Vol.175, pp67-76.
- van der Lingen C.D., 2002. Diet of sardine *Sardinops sagax* in the Southern Benguela Upwelling Ecosystem. S. Afr. J. Mar. Sci. 24: 301-316.
- Varela, M., Larreñaga, A., Costas, E. e Rodríguez, B., 1988. Contenido estomacal de la sardina (*Sardina pilchardus*, Walbaum) durante la campaña Saracus 871 en las plataformas Cantábrica y de Galicia en Febrero de 1987.
- Vučetic, T., 1963. Sur la nutrition de la sardine adulte (*Sardina pilchardus* Walb) dans la partie moyenne de l'Adriatique orientale. Acta Adriatica, nº2: pp.1-47.
- Watanabe, T., Itoh, A., Satoh, S., Kitajima, C. e Fujita, S., 1985. Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of

eggs produced by red sea bream broodstock. Bull. Jap. Soc. of Scient. Fish.,
vol.51, n°.9, 1501-1510.

Zar, H., 1996. Biostatistical analysis. Prentice-Hall international, inc...

ANEXOS

ANEXO I - PROTOCOLO I PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS
(Chícharo *et al.* 2001)

- 1) Homogeneizar o tecido em 150 µl de sarcosina gelada 1%
- 2) Ultrasonificar (1 minuto/ 50 Amplitude) em gelo
- 3) Temperatura ambiente durante 15 minutos
- 4) Adicionar 1.35 ml Tris-EDTA
- 5) Agitar 3*5 segundos
- 6) Centrifugar 5 min. 2500*4930 rpm (0°C)
- 7) Do sobrenadante retirar:

200 µl (RNA + DNA)

- . Preparar recta de calibração
- . Adicionar 400 µl de Tris-NaCl
- . Adicionar 50 µl de EB
- . Esperar 5 min e ler:
365 nm (Slit 10nm) de excitação
590 nm (Slit 5 nm) de emissão
Range 1
Fineza média

200 µl (DNA)

- . Preparar recta de calibração
- . Preparar solução de Rnase*** (100 µl stock Rnase + 900 µl de Tris-NaCl)
- . Adicionar 350 µl de Tris-NaCl
- . Adicionar 50 µl de solução de Rnase***
- . Incubar em banho maria a 37°C / 30 min.
- . Temperatura ambiente 15 min.
- . Adicionar 50 µl de EB
- . Esperar 5 min e ler:
365 nm (Slit 10nm) de excitação
590 nm (Slit 5 nm) de emissão
Range 1
Fineza média

ANEXO II PROTOCOLO II PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS
(Clemmesen, 1990)

- 1) Homogeneizar o tecido em 150 µl de sarcosina gelada 1%
- 2) Ultrasonificar (1 minuto/ 50 Amplitude) em gelo
- 3) Temperatura ambiente durante 15 minutos
- 4) Adicionar 1.35 ml Tris-EDTA
- 5) Agitar 3*5 segundos
- 6) Centrifugar 5 min. 2500*4930 rpm (0°C)
- 7) Retirar 600 µl do sobrenadante
- 8) Adicionar 600 µl de Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico (49.5:49.5:1, v/v)
- 9) Agitar 10 min.
- 10) Centrifugar 10 min. 6000 rpm (0°C)
- 11) Retirar 300 µl do sobrenadante
- 12) Adicionar 300 µl de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1, v/v)
- 13) Agitar 1 min.
- 14) Centrifugar 5 min. 6000 rpm (0°C)
- 15) Do sobrenadante retirar:

200 µl (RNA + DNA)

- . Preparar recta de calibração
- . Adicionar 400 µl de Tris-NaCl
- . Adicionar 50 µl de EB
- . Esperar 5 min e ler:
365 nm (Slit 10nm) de excitação
590 nm (Slit 5 nm) de emissão
Range 1
Fineza média

200 µl (DNA)

- . Preparar recta de calibração
- . Preparar solução de Rnase*** (100 µl stock Rnase + 900 µl de Tris-NaCl)
- . Adicionar 350 µl de Tris-NaCl
- . Adicionar 50 µl de solução de Rnase***
- . Incubar em banho maria a 37°C / 30 min.
- . Temperatura ambiente 15 min.
- . Adicionar 50 µl de EB
- . Esperar 5 min e ler:
365 nm (Slit 10nm) de excitação
590 nm (Slit 5 nm) de emissão
Range 1
Fineza média

Anexo III - Número médio de indivíduos por estômago em cada amostra

Indivíduos (nº inds/estom)	Ago/Set (n=25 cada)		Fev/Mar (n=15 cada)		Mar/Abr (n=15 cada)	
	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
Fitoplâncton						
Fitoplâncton n.i.			919	757	486	4454
Dinoflagelados (Dinophyceae)						
Dinoflagelados n.i.	542	189	100	11	162	311
<i>Dinophysis</i> spp.		20				
<i>Dinophysis acuta</i>	27	86		11		104
<i>Dinophysis caudata</i>	307	889	80			104
<i>Dinophysis tripos</i>		13				
<i>Dinophysis rotundata</i>	46					
<i>Protoperidinium</i> spp.	56	142	160	68	486	
<i>Protoperidinium divergens</i>	7	52	20		162	
<i>Protoperidinium depressum</i>	93	151	40	11	54	207
<i>Protoperidinium claudicans</i>					54	
<i>Protoperidinium diabolum</i>	20	7				
<i>Protoperidinium globulum</i>	7					
<i>Sciosella</i> spp.	20					
<i>Ceratium</i> spp.	86	7	40	34	54	518
<i>Prorocentrum micans</i>	13	26				
Quisto dinoflagelado	7	26			54	
Diatomáceas (Bacillariophyceae)						
Diatomáceas n.i.			100	102	108	622
Diatomáceas cadeia			60		54	
<i>Coscinodiscus</i> spp.	27		40	79		311
<i>Thalassiosira</i> spp.	7		40	136	108	518
<i>Dictyonella</i> spp.			20			
<i>Diploneis</i> spp.			80		54	1657
<i>Navicula</i> spp.			120	23		1036
<i>Pleurosigma/Gyrosigma</i>			20	11		622
<i>Paralia sulcata</i>			879	1480	540	2072
<i>Rhizosolenia</i> spp.			40	11		
<i>Surirella</i> spp.			60			207
<i>Triceratium</i> spp.			20			
<i>Trachyneis</i> spp.			20			
<i>Odontella</i> spp.					54	
<i>Thalassionema</i> spp.				68		1554
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.				23		3522
<i>Planktonella sol</i>				11		
<i>Nitzschia</i> spp.				11		
Pinulada			60			518
Zooplâncton						
Crustacea						
Crustaceo n.i.			21			
ovo de crustaceo	25		61	126	2	2696
Copepoda						
Ovo de copépode	1055	686		90	216	1657
nauplio de copepode	92	57	100	79	702	622
Copepodes n.i.	230	140	119	7	119	294
<i>Euterpina</i> spp.	13	5	27	8		75
<i>Harpacticoida</i> n.i.	35	2	27	1		20
<i>Microsetella</i> spp.		3	2	1	5	
<i>Oncaea</i> spp.	102	85	94	7	111	75
<i>Oithona</i> spp.	19	27			110	5
<i>Corycaeus</i> spp.					12	2
<i>Calanus/Paracalanus/Clausocalanus</i>		3	1	1	4	
<i>Temora</i> spp.		7			9	
<i>Temora longicornis</i>	2				9	
<i>Centropages</i> spp.	20	10		1	2	
<i>Centropages chierchiae</i>	19					
<i>Acarthia</i> spp.	4					
<i>Pleurommama</i> spp.	1				2	
<i>Candacia</i> spp.		1				
Cirripedia			46			
Cladocera		1				
<i>Penilia</i> spp.	2				2	
Decapoda	1	1				
Ostracoda			1	4	11	5
Mollusca	1		1			
Gastropoda				2		10
Tintinnoinea	7	7	20	11	108	5
Appendicularia					54	
Ictioplâncton						
ovo peixe		1		1		
Escama de peixe	1	3	1			
Quisto mucilaginoso	88		61	79	162	207
Grão de polen	7		40		54	725
Células esféricas n.i.	239					
total	2684	2438	2499	2496	3616	19967

Anexo IV - Biovolume total dos itens alimentares por estômago em cada amostra

Indivíduos	Ago/Set (n=25 cada)		Fev/Mar (n=15 cada)		Mar/Abr (n=15 cada)	
	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
Fitoplâncton						
Fitoplâncton n.i.			194	141	686	1028
Dinoflagelados (Dinophyceae)						
Dinoflagelados n.i.	252	170	61	14	389	44
Dinophysis spp.		2				
Dinophysis acuta	19	72		14		85
Dinophysis caudata	272	889	45			110
Dinophysis tripos		9				
Dinophysis rotundata	24					
Protoperidinium spp.	254	789	377	150	1960	
Protoperidinium divergens	58	226	449		3367	
Protoperidinium depressum	751	1191	112	200	1079	2119
Protoperidinium claudicans					283	
Protoperidinium diabolium	23	28				
Protoperidinium globulium	15					
Scropsiella spp.	17					
Ceratium spp.	110		102	51	108	757
Prorocentrum micans	2	15				
Quisto dinoflagelado	1	7			9	
Diatomáceas (Bacillariophyceae)						
Diatomáceas n.i.			120	2	421	254
Diatomáceas cadeia			13		24	
Coscinodiscus spp.	103		156	140		529
Thalassiosira spp.	4		11	29	23	208
Dictonella spp.			1			
Diploneis spp.			15		26	50
Navicula spp.			15	3		178
Pleurosigma/Gyrosigma			12	6		190
Paralia sulcata			11	24	11	41
Rhizosolenia spp.			5	2		
Surirella spp.			8			
Triceratium spp.			13			73
Trachyneis spp.			125			
Odontella spp.					138	
Thalassionema spp.					1	12
Pseudo-nitzschia spp.					1	60
Planktoniella sol					3	
Nitzschia spp.					105	
Pinulada			6			18
Zooplâncton						
Crustacea						
Crustaceo n.i.			345			
ovo de crustaceo	257		144	619	54	7179
Copepoda						
Ovo de copépode	1257	1791		144	807	3222
nauplio de copepode	408	239	897	224	145	2485
Copepodes n.i.	8686	5323	1897	410	5774	8402
Euterpina spp.	458	355	2025	531		4117
Harpacticoida n.i.	1963	68	875	85	7976	1167
Microsetella spp.		92	76	32		567
Oncaea spp.	3348	3597	3890	435	7425	4356
Oithona spp.	838	761			601	182
Corycaeus spp.					9482	328
Calanus/Paracalanus/Clausocalanus		1745	28	271	1753	
Temora spp.		3628			5488	
Temora longicornis	1101				5488	
Centropages spp.	23491	1729		196	1363	
Centropages chierchiae	39442	0				
Acarthia spp.	602	0				
Pleurommama spp.	393	0			651	
Candacia spp.		100				
Cirripedia						
Cladocero						
Penilla spp.	244					
Decapoda	68	56			112	
Ostracoda			189	442	3147	624
Mollusca	45		52			
Gastropoda					133	1406
Tintinnoines	32	19	12	29	117	
Appendicularia					80	118
Ictioplâncton						
ovo peixe		3338		4132		
Escama de peixe	0	8	2	0		
Quisto mucilaginoso	35		124	9	151	57
Grão de polen	15		87		66	2174
Células esféricas n.i.	119					
total		84507	26349	13122	8576	59567
						41570

Anexo V - Biovolume médio dos itens alimentares por estômago em cada amostra

Indivíduos biovol médio por spp (µm3/1000)	Ago/Set (n=25 cada)		Fev/Mar (n=15 cada)		Mar/Abr (n=15 cada)	
	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche	Portimão	Peniche
Fitoplâncton						
Fitoplâncton n.i.			21	19	141	23
Dinoflagelados (Dinophyceae)						
Dinoflagelados n.i.	47	90	61	128	240	14
Dinophysis spp.		9				
<i>Dinophysis acuta</i>	71	110		128		82
<i>Dinophysis caudata</i>	89	100	76			106
<i>Dinophysis tripos</i>		69				
<i>Dinophysis rotundata</i>	52					
Protoperidinium spp.	455	555	235	221	403	
<i>Protoperidinium divergens</i>	877	431	2247		2078	
<i>Protoperidinium depressum</i>	809	790	281	1767	1997	1023
<i>Protoperidinium claudicans</i>					524	
<i>Protoperidinium diabolium</i>	115	431				
<i>Protoperidinium globulium</i>	221					
Scropsiella spp.	83					
Ceratium spp.	128	61	258	151	200	146
<i>Prorocentrum micans</i>	15	58				
Quisto dinoflagelado	19	28			16	
Diatomáceas (Bacillariophyceae)						
Diatomáceas n.i.			120	2	390	41
Diatomáceas cadeia			22		44	
Coscinodiscus spp.	390		390	177		170
Thalassiosira spp.	61		28	21	21	40
Dictyoneis spp.			6			
Diploneis spp.			19		48	3
Navicula spp.			12	14		17
Pleurosigma/Gyrosigma			61	51		31
<i>Paralia sulcata</i>			1	2	2	2
Rhizosolenia spp.			12	17		
Surirella spp.			14			
Triceratium spp.			65			35
Trachyneis spp.			628			
Odontella spp.					256	
Thalassionema spp.				1		1
Pseudo-nitzschia spp.				3		2
<i>Planktonella sol</i>				28		
Nitzschia spp.				928		
Pinulada			10			4
Zooplâncton						
Crustacea						
Crustaceo n.i.			1622			
ovo de crustaceo	1023		235	489	3054	266
Copepoda						
Ovo de copepode	119	261		159	281	194
nauplio de copepode	442	417	698	284	21	400
Copepodes n.i.	3772	3793	1587	6057	4852	2856
<i>Euterpina</i> spp.	3599	6758	7628	6530		5520
Haracticoida n.i.	5611	3900	3219	7793	5607	5866
<i>Microsetella</i> spp.		3518	4006	3912	10752	
<i>Oncaea</i> spp.	3290	4241	4124	6689	6710	5840
<i>Olthona</i> spp.	3345	2809			548	3652
<i>Corycaeus</i> spp.					77120	13178
Calanus/Paracalanus/Clausocalanus		49892	4424	49892	49892	
<i>Temora</i> spp.		51858			62492	
<i>Temora longicornis</i>	51954				62492	
<i>Centropages</i> spp.	118632	16472		36124	77610	
<i>Centropages chierchiae</i>	206708					
<i>Acarthia</i> spp.	14192					
<i>Pleurommama</i> spp.	37053				37053	
<i>Candacia</i> spp.		11469				
Cirripedia			1813			
Cladocero		11497				
<i>Penilia</i> spp.	11497					
Decapoda	6371	6371			6371	
Ostracoda			29862	12544	29862	12544
Mollusca	4247		8181			
Gastropoda				8181		14137
Tintinnoinea	476	257	60	256	108	
Appendicularia					148	2378
Ictioplâncton						
ovo peixe		381704		304830		
Escama de peixe	0	311	311		93	28
Quisto mucilaginoso	40		203	11	123	300
Grão de polen	221		217			
Cáculas esféricas n.i.	50					
total	474072	558257	72756	447408	441547	68900

ANEXO VI

Tabelas ANOVA para comparação dos parâmetros alimentares entre zonas e estações com $\alpha = 0.05$.

Peso do conteúdo (g)					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	0.042	0.042	1.952	0.1655
Estação	1	3.883	3.883	176.9	$<2 \cdot 10^{-16}$
area*estação	1	0.108	0.108	4.9	0.028

Número de itens					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	1465067486	1465067486	27.5	$9.2 \cdot 10^{-7}$
Estação	1	3671222228	3671222228	68.9	$6.3 \cdot 10^{-13}$
area*estação	1	3478507890	3478507890	65.3	$1.8 \cdot 10^{-12}$

Número de itens zooplanctônicos					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	7701180	7701180	2.8	0.09
Estação	1	1033186484	1033186484	37.9	$1.7 \cdot 10^{-8}$
area*estação	1	70276485	70276485	25.7	$1.8 \cdot 10^{-6}$

Número de itens fitoplanctônicos					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	1202542877	1202542877	36.3	$3.1 \cdot 10^{-8}$
Estação	1	2353603638	2353603638	71.1	$3.4 \cdot 10^{-13}$
area*estação	1	2440766745	2440766745	73.7	$1.6 \cdot 10^{-13}$

Número de itens ictioplanctônicos					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	11067	11067	5.5	0.0204
Estação	1	26065	26065	13.1	0.0004
area*estação	1	26158	26158	13.1	0.0004

Biovolume dos itens					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	4281	4281	13.4	0.0004
Estação	1	7988	7988	25.1	$2.5 \cdot 10^{-6}$
area*estação	1	7005	7005	21.9	$9.1 \cdot 10^{-6}$

Biovolume de itens zooplanctônicos					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	444	444	30.6	$2.7 \cdot 10^{-7}$
Estação	1	612	612	42.2	$3.6 \cdot 10^{-9}$
area*estação	1	431	431	29.7	$3.8 \cdot 10^{-7}$

Biovolume de itens fitoplanctônicos

Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	0.51	0.51	3.6	0.0596
Estação	1	2.02	2.02	14.1	0.0002
area*estação	1	0.03	0.03	0.2	0.6233

Biovolume de itens ictioplanctônicos

Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	2050	2050	7.2	0.0085
Estação	1	3948	3948	13.8	0.0003
area*estação	1	4023	4023	14.1	0.0002

Porcentagem de zooplâncton

Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	15934	15934	80.8	$2.18 \cdot 10^{-14}$
Estação	1	1752	1752	8.89	0.003
area*estação	1	1522	1522	7.72	0.006

Porcentagem de fitoplâncton

Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	16919	16919	82.1	$1.54 \cdot 10^{-14}$
Estação	1	16919	16919	7.2	0.008
area*estação	1	1683	1683	8.9	0.003

ANEXO VII

Tabelas ANOVA para comparação da quantidade de pigmentos nos estômagos entre zonas e estações com $\alpha = 0.05$.

Pigmentos totais por estômago					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	54649	54649	20.3	$1.8 \cdot 10^{-5}$
Estação	1	145245	145245	54.1	$6.5 \cdot 10^{-11}$
area*estação	1	87116	87116	32.4	$1.3 \cdot 10^{-7}$

Pigmentos por g de estômago					
Variáveis	g.l.	SS	MS	F	p
Área	1	163837	163837	8.3	0.0048
Estação	1	269168	269168	13.6	0.0003
area*estação	1	105093	105093	5.3	0.0231

ANEXO VIII

Resultados dos Testes de Qui-Quadrado aplicado à Tabela de Contingência Multidimensional dos Graus de digestão das presas.
($\alpha = 0.05$)

Variável	g.l.	X ²	χ^2
Total de Itens	22	1529	33.9
Copépodes	22	1631	33.9
Diatomáceas	7	1700	14.1

Resultado do Teste de Independência Parcial da Variável "Área"

Variável	g.l.	X ²	χ^2
Total de Itens	22	455	33.9
Copépodes	22	1039	33.9
Diatomáceas	7	283	14.1

ANEXO IX

Percentagem do número de presas em cada grau de digestão por amostra para o Total de itens, Copépodes e Diatomáceas (C=Peniche, S=Portimão, Estação 1= Ago/Set, 2=Fev/Mar, 3= Mar/Abr)

Variável	Área	Estação	Digestão				
			1	2	3	4	5
Total	C	1	2	2	4	20	73
		2	5	12	11	27	46
		3	4	14	16	28	38
	S	1	3	3	8	25	61
		2	3	25	16	26	30
		3	2	6	9	29	54
Copépodes	C	1	0	2	3	19	76
		2	3	13	13	25	47
		3	4	18	20	23	36
	S	1	1	3	8	26	61
		2	3	30	18	24	26
		3	1	6	10	29	54
Diatomáceas	C	2	66	32	2	-	-
		3	29	69	3	-	-
	S	2	35	53	12	-	-
		3	47	38	15	-	-

ANEXO X - Número de organismos planctônicos nos estômagos e na água nas amostras de Portimão e Peniche de Março/Abril.

Indivíduos	Portimão		Peniche	
	itens/estômago	itens/l água	itens/estômago	itens/l água
Fitoplâncton	486	20	4454	1
Dinoflagelados	162	18	311	28
<i>Dinophysis acuta</i>		1	104	1
<i>Dinophysis caudata</i>			104	1
<i>Protoperidinium</i> spp.	486	11		6
<i>Protoperidinium divergens</i>	162			
<i>Protoperidinium depressum</i>	54	2	207	
<i>Protoperidinium claudicans</i>	54			
<i>Protoperidinium diabolium</i>		4		1
<i>Ceratium</i> spp.	54	16	518	2
<i>Prorocentrum micans</i>		1		
Quisto dinoflagelado	54	24		
<i>Noctiluca</i> spp.		1		
<i>Goniodoma polyedrico</i>		7		
Diatomáceas	108	36	622	151
Diatomáceas cadeia	54			
<i>Coscinodiscus</i> spp.		3	311	4
<i>Thalassiosira</i> spp.	108	5	518	30
<i>Dictioneis</i> spp.				
<i>Diploneis</i> spp.	54		1657	
<i>Navicula</i> spp.		1	1036	
<i>Pleurosigma/Girosigma</i>		1	622	
<i>Pinulada</i>		1	518	1
<i>Paralia sulcata</i>	540	2	2072	22
<i>Rhizoselenia</i> spp.		6		1159
<i>Surinella</i> spp.				
<i>Triceratium</i> spp.			207	
<i>Trachineis</i> spp.				
<i>Odontella</i> spp.	54			
<i>Thalassionema</i> spp.		8	1554	89
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.		11	3522	2115
<i>Planktonella sol</i>				1
<i>Nitzschia</i> spp.				
<i>Detonula</i> spp.		54		1783
<i>Asterolampra</i> spp.				3
<i>Eucampia</i> spp.		2		22
<i>Guinardia striata</i>		10		1199
<i>Leptocylindricus</i> spp.		9		1014
<i>Chaetoceros</i> spp.		5		1096
<i>Dichthiocha fibula</i>		2		
<i>Skeletonema costatum</i>		6		
Zooplâncton				
Crustáceos				
ovo de crustaceo	2	1	2696	1
Copepoda	119	0	294	
Ovo de copépode	216		1657	2
nauplio de copepode	702	5	622	8
<i>Harpacticoida n.i.</i>	142	0	20	0
<i>Euterpina</i> spp.			75	
<i>Microsetella</i> spp.	5			0
<i>Oncaea</i> spp.	111		75	0
<i>Olithona</i> spp.	110		5	1
<i>Calanus/Paracalanus/Clausocalanus</i>	4	1		3
<i>Temora</i> spp.	9			
<i>Centropages</i> spp.	2	1		0
<i>Corycaeus</i> spp.	12		2	
<i>Pleurommama</i> spp.	2			
<i>Acarthia</i> spp.		0		4
<i>Candacia</i> spp.				
Cirripedia				
Decapoda	2	1		0
Ostracode	11		5	
Molusco				
Gastropode			10	
Tintínideo	108	107		32
Apendicularia	54	1	5	0
Polichaeta		1		
Ictioplâncton				
Ovo peixe		0		1
Escama de peixe		0		6
Quisto mucilaginoso	162	2	207	
Grão de polen	54		725	
total	4256	376	24732	8788

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da zona de estudo

Figura 2 - Rectas de calibração do DNA e RNA padrão

Figura 3 - Relação entre o peso das paredes do estômago e o peso eviscerado dos indivíduos das amostras do início da Primavera.

Figura 4 - Relação entre o peso das paredes do estômago e o peso do conteúdo dos indivíduos das amostras do início da Primavera

Figura 5.1 – Análise comparativa dos parâmetros alimentares (número total de itens por estômago, número de itens fitoplanctónicos, número de itens zooplanctónicos e número de itens ictioplanctónicos) estimados através da análise individual e da análise dos conjuntos.

Figura 5.2 - Análise comparativa dos parâmetros alimentares (biovolume total de itens por estômago, biovolume de itens fitoplanctónicos, biovolume de itens zooplanctónicos e biovolume de itens ictioplanctónicos) estimados através da análise individual e da análise dos conjuntos.

Figura 6.1 - Variação do **a)** peso do conteúdo (g), **b)** número total de itens, **c)** número de itens fitoplanctónicos, **d)** número de itens zooplanctónicos e **e)** número de itens ictioplanctónicos.

Figura 6.2 - Variação do biovolume **a)** total de itens por estômago, **b)** de fitoplâncton, **c)** de zooplâncton e **d)** de ictioplâncton por amostra.

Figura 7 - Relação entre o peso do conteúdo e **a)** o número total de itens e **b)** o biovolume total de itens por estômago.

Figura 8 – Relação entre o número e biovolume dos itens alimentares por estômago.

Figura 9 – Variação do **a)** quantidade de pigmentos fotossintéticos totais por estômago, **b)** quantidade de pigmentos fotossintéticos por grama de estômago.

Figura 10 – Variação do número de itens fitoautotróficos por amostra.

Figura 11.1 - Relação entre o logaritmo da quantidade total de pigmentos fotossintéticos (μg) e o logaritmo do número de itens fitoautotróficos por estômago.

Figura 11.2 - Relação entre o logaritmo da quantidade de pigmentos fotossintéticos por g de estômago ($\mu\text{g/g}$) e o logaritmo do número de itens fitoautotróficos por estômago.

Figura 12 – Relação entre a quantidade total de pigmentos fotossintéticos e o número de itens fitoautotróficos entre estômagos da mesma amostra.

Figura 13 - Relação entre a quantidade total de pigmentos fotossintéticos e o biovolume de itens fitoautotróficos por estômago.

Figura 14 - Relação entre a quantidade total de pigmentos fotossintéticos e o biovolume de itens fitoautotróficos entre estômagos da mesma amostra

Figura 15 - Pigmentos fotossintéticos **a)** totais por estômago e **b)** por grama de estômago dos indivíduos de Peniche e Portimão de comprimentos iguais e inferiores a 20 cm.

Figura 16 – Relação entre o índice RNA/DNA **a)** do músculo e **b)** dos oócitos com o peso do tecido utilizado na análise.

Figura 17 – Ácidos nucleicos dos oócitos isolados e não isolados.

Figura 18 - Quantidade de ácidos nucleicos e razão RNA/DNA no músculo e oócitos das fêmeas em pré-desova na zona Norte e Sul.

Figura 19.1 - Relação entre a quantidade de ácidos nucleicos ($\mu\text{g/g}$) e do índice RNA/DNA com o peso eviscerado dos indivíduos.

Figura 19.2 - Relação entre a quantidade de ácidos nucleicos ($\mu\text{g/g}$) e do índice RNA/DNA com comprimento dos indivíduos.

Figura 20 - Relação entre o índice RNA/DNA do músculo e dos oócitos das fêmeas em pré-desova da região norte e sul.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Graus de digestão dos itens alimentares zooplanctónicos

Tabela 2 - Graus de digestão das diatomáceas presentes nos estômagos

Tabela 3 - Variáveis Biológicas dos indivíduos seleccionados para a análise individual dos estômagos

Tabela 4 - Frequência relativa do número de itens alimentares por estômago em cada amostra.

Tabela 5 - Frequência relativa do biovolume dos itens alimentares por estômago em cada amostra.

Tabela 6 - Frequência relativa do número e biovolume de grandes grupos de itens alimentares por estômago em cada amostra.

Tabela 7 - Frequência relativa de micro e mesoplâncton nos estômagos por amostra.

Tabela 8 - Diferenças no número e biovolume dos itens alimentares por estômago entre a análise de conjuntos e de estômagos individuais

Tabela 9 - Fracção (%) do peso dos conteúdos estomacais utilizada para a contagem dos itens alimentares na análise individual e de conjuntos.

Tabela 10 - Coeficiente de dispersão amostral de estômagos da mesma amostra para vários parâmetros alimentares.

Tabela 11 - Coeficiente de dispersão amostral de estômagos da mesma amostra para o número total de pigmentos fotossintéticos e o número de pigmentos por grama de estômago.

Tabela 12 - Número de presas em cada grau de digestão para o Total de itens, Copépodes e Diatomáceas.

Tabela 13 - Variáveis biológicas dos indivíduos de diferentes comprimentos seleccionados para comparação da quantidade de pigmentos fotossintéticos no estômago

Tabela 14 - Frequência relativa de grandes grupos planctónicos nos estômagos e na água nas amostras de Portimão e Peniche em Março-Abril.

Tabela 15 - Frequência relativa dos organismos planctónicos presentes nos estômagos e na água nas amostras de Portimão e Peniche de Março-Abril.

Tabela 16 - Variáveis biológicas das fêmeas em pré-desova.

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo I** - Protocolo I para determinação de ácidos nucleicos
- Anexo II** - Protocolo II para determinação de ácidos nucleicos
- Anexo III** - Número médio de indivíduos por estômago em cada amostra
- Anexo IV** - Biovolume total dos itens alimentares por estômago em cada amostra
- Anexo V** - Biovolume médio dos itens alimentares por estômago em cada amostra
- Anexo VI** - Tabelas ANOVA para comparação dos parâmetros alimentares entre zonas e estações com $\alpha = 0.05$.
- Anexo VII** - Tabelas ANOVA para comparação da quantidade de pigmentos nos estômagos entre zonas e estações com $\alpha = 0.05$.
- Anexo VIII** - Resultados dos Testes de Qui-Quadrado aplicado à Tabela de Contingência Multidimensional dos Graus de digestão das presas.
- Anexo IX** - Percentagem do número de presas em cada grau de digestão por amostra para o Total de itens, Copépodes e Diatomáceas
- Anexo X** - Número de organismos planctônicos presentes nos estômagos e na água nas amostras de Portimão e Peniche de Março-Abril.