

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

IMPORTÂNCIA DE MACROALGAS MARINHAS NA DIETA
DE JUVENIS DE *CHELONIA MYDAS* LINNAEUS, 1758
NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

THAÍSA FERNANDES BERGAMO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Oceanografia
Biológica da Universidade Federal do
Rio Grande, como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRE.

Orientadora: Dr^a. Margareth da Silva Copertino
Co-orientadora: Dr^a. Silvina Botta

RIO GRANDE
Setembro 2015

À minha família

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me apoiado em todas as minhas decisões e sempre estarem ao meu lado.

Aos “Filogeneticamente próximos”, amigos da FURG, Gabi, Vini, Aline, Luisa e Fabi, por terem me escutado reclamar demais e me ajudado muito.

Agradeço à Kerly por ter me ajudado com o mapa e à Marie, companheira de casa e filmes de sábado à noite, pela ajuda nas análises estatísticas, principalmente com o GLM.

Queria agradecer à Margareth, minha orientadora, pela oportunidade da realização do mestrado, pois me aceitou para trabalhar com ela, e à Sil, minha co-orientadora, pela ajuda durante os dois anos e meio de mestrado e por toda a sua preocupação.

Às meninas do ECOVECO, obrigada por toda ajuda (pesagens, correções, mates, conversas jogadas fora, pastel da praia...) e companheirismo. Tenho certeza que levarei vocês comigo pra onde eu for.

Ao laboratório da Megafauna. Em especial ao Edu que me ajudou projeto, à Lília que teve que me aguentar sempre e à Lu por sempre estar disposta a ajudar.

Ao pessoal do Nema: Dani, Maria e Andrine, pelas coletas, triagens, necrópsias e risadas. Sem vocês esse trabalho não seria nem metade do que é.

À CAPES, agencia de fomento da bolsa. E ao PPGOB (Verinhhaaaa!!! Obrigada por tudo!!!).

Ao NEMA, pelo suporte logístico, financeiro, intelectual e disponibilização de todos os exemplares coletados.

Ao Laboratório da Megafauna Marinha que através do projeto “CAPES AuxPe/PNPD Institucional” fez esse projeto ser possível e ao Laboratório Ecologia Vegetal Costeira, pelo envolvimento e apoio de infraestrutura.

Aos componentes da banca avaliadora, Leandro Bugoni, Alexandre Garcia e Agnaldo Martins, pelas contribuições valiosas que ajudaram a tornar este trabalho melhor e mais completo.

E por último, mas não menos importante, obrigada Led Zeppelin, Pink Floyd, Gary Moore, Black Sabbath, Metallica e tantos outros pelos momentos de descanso e descontração.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2. O LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL COMO ÁREA PARA TARTARUGAS MARINHAS.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
4. CAPÍTULO 1- ECOLOGIA ALIMENTAR DA TARTARUGA-VERDE (<i>CHELONIA MYDAS</i>) NO EXTREMO SUL DO BRASIL.....	24
4.1 Introdução.....	25
4.2 Material e Métodos.....	29
4.2.1 Área de estudo.....	29
4.2.2 Amostragens.....	31
4.2.3 Análises isotópicas.....	32
4.2.4 Análises dos dados.....	33
4.2.5 Modelos de mistura.....	34
Resultados.....	36
4.3.1 Modelos de mistura isotópica.....	40
4.4 Discussão.....	45
4.5 Conclusão.....	48
5. CAPÍTULO 2- EFEITOS DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS NOS VALORES DE $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ NO MÚSCULO E NA PELE DE TARTARUGAS-VERDES (<i>CHELONIA MYDAS</i>).....	49
5.1 Introdução.....	50
5.2 Material e Métodos.....	53
5.2.1 Coleta e preparação das amostras.....	53
5.2.2 Análise estatística.....	55
5.3 Resultados.....	55
5.4 Discussão.....	59

5.5 Conclusão	62
6. Considerações finais.....	63
7. Referências.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Localização da área de estudo mostrando em detalhe os encalhes de *Chelonia mydas* (círculos) e os locais de amostragem das macroalgas (triângulos) em Torres (a), Molhes da Barra de Imbé, de Tramandaí, de Rio Grande (c) e do Chuí (d).....30

Figura 1.2. Biplot dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio no músculo e pele de *C. mydas* coletadas no sul do Rio Grande do Sul, durante os meses frios (Δ músculo e \square pele) e quentes (\blacktriangle músculo e \blacksquare pele). Os valores isotópicos das potenciais presas também são apresentados: Cl, Clorófitas; Rodo, Rodófitas; Mol, Moluscos; Ane, Anêmonas; Med, Medusas. Os valores médios do grupo Mol e Ane foram reportados em Condini et al. (2015). Os símbolos representam o valor médio e as barras o desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$40

Figura 1.3. Contribuição relativa das presas para a dieta de *C. mydas* do sul do Rio Grande do Sul. A proporção de cada presa é apresentada como caixas mostrando os intervalos de confiança de 50 %, 75 % e 95 %: IC50 = cinza escuro, IC75 = cinza médio, IC95 = cinza claro. Os resultados de quatro modelos são apresentados: modelo construído a partir de dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em pele de indivíduos coletados em meses frios (a) e quentes (b) e modelos construídos a partir de dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em músculo de indivíduos coletados em meses frios (c) e quentes (d). As presas utilizadas no modelo foram agrupadas em Clorófitas (Cl), Rodófitas (Rod), Moluscos (Mol), Medusas (Med) e Anemonas (Ane).....43

Figura 2.1. Relação entre a diferença entre os valores isotópicos de carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) das amostras controle e com extração de lipídios para a pele (círculos abertos) e músculo (círculos pretos) e a razão C:N das amostras controle.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Valores isotópicos de carbono e nitrogênio do músculo e da pele de *C mydas* e razão C:N dos tecidos das tartarugas-verdes (Mín: mínimo; Máx: máximo; M ± DP: média ± desvio padrão).....37

Tabela 1.2. Composição da dieta modelada através do SIAR para *C. mydas* coletadas no sul do Rio Grande do Sul. Os modelos foram construídos para os dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de pele e músculo de exemplares coletados durante os meses quentes e frios. As presas utilizadas no modelo foram agrupadas em Clorófitas (Cl), Rodófitas (Rod), Moluscos (Mol), Medusas (Med) e Anêmonas (Ane). Os resultados são mostrados como a proporção média (%) de cada grupo de presa na dieta com um intervalo de confiança de 95 % (IC₉₅).....42

Tabela 2.1. Valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$ em ‰) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$ em ‰) e razão C:N de músculo e pele das tartarugas-verdes, *Chelonia mydas*. São indicados a média ± DP e valores mínimos e máximos para as amostras controle (sem extração lipídica) e com extração de lipídios.....57

RESUMO

Dentre as sete espécies de tartarugas marinhas existentes no globo, a tartaruga-verde *Chelonia mydas*, é a única considerada herbívora em sua fase adulta. *Chelonia mydas* apresenta mudanças no seu hábito alimentar ao longo da vida, utilizando primeiramente o ambiente pelágico onde tem uma dieta onívora e, posteriormente, se alimenta em ambiente nerítico, em habitats bentônicos. Na costa do sul do Brasil, a espécie é avistada ao longo do litoral bem como em regiões de lagunas, onde sua alimentação foi caracterizada como onívora e oportunista e com variação temporal através de análises do conteúdo gastrointestinal. O presente estudo analisou os valores de isótopos estáveis de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ na pele e músculo de juvenis de *C. mydas*, visando avaliar a importância das macroalgas e fanerógamas marinhas na ecologia alimentar destes animais. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da pele e músculo de 48 animais encontrados encalhados na costa sul do Rio Grande do Sul (31°21'S a 33°45'S) entre maio de 2013 e julho de 2014, foram obtidos por meio de espectrometria de massas de razão isotópica. Uma subamostra de tecidos de 15 indivíduos foi utilizada para verificar a necessidade de extrair os lipídeos nestas amostras através do uso do solvente clorofórmio-metanol. A contribuição isotópica dos diferentes itens alimentares para a dieta de *C. mydas* foi calculada através de modelos de mistura isotópica Bayesianos. Os modelos foram desenvolvidos para dois períodos do ano: quente e frio. Os resultados sugeriram que há a necessidade da extração de lipídios apenas no músculo, uma vez que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram modificados significativamente

após a extração. Através do teste t de Student e teste U de Mann Whitney, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram comparados entre os períodos quente e frio. O comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) dos indivíduos variou de 30 a 50 cm, sendo considerados juvenis. O teste não paramétrico foi aplicado somente para $\delta^{13}\text{C}$ de pele. Nenhuma diferença significativa foi encontrada, exceto para os valores de $\delta^{15}\text{N}$ da pele que foram mais elevados no período frio. Todos os modelos de mistura desenvolvidos indicaram uma maior contribuição das algas vermelhas na dieta de *C. mydas*, em relação aos outros itens alimentares (i.e. algas verdes, gastrópodes e cnidários). Assim, as pradarias de macroalgas da região são um recurso alimentar importante para os juvenis de *C. mydas* na região do presente estudo, devido à assimilação observada desse grupo alimentar em detrimento dos itens animais. Entretanto, estudos a longo prazo com análises de tratos gastrointestinais em conjunto com AIE são necessários para o melhor entendimento da ecologia alimentar e as assimilações na dieta de *Chelonia mydas* do sul do Brasil.

Palavras-chave: tartaruga-verde, ecologia alimentar, conteúdo gastrointestinal, isótopos estáveis.

ABSTRACT

Among the seven species of sea turtles in the world, the green sea turtle, *Chelonia mydas*, is the only one considered herbivorous on adult stage. *C. mydas* demonstrates ontogenetic changes in its foraging habits, first using the pelagic environment where it has an omnivorous diet, and subsequently feeding in neritic environment/benthic habitats. In the southernmost Brazilian coast, the species is sighted along the coast, as well as, on lagoon areas, where its feeding habits were characterized as omnivorous and opportunistic with temporal variation through analysis of gastrointestinal contents. This study analyzed the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope values on skin and muscle *C. mydas* juveniles, in order to evaluate the importance of macroalgae and seagrasses on the feeding ecology of these animals. The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of skin and muscle of 48 animals found stranded on the south coast of Rio Grande do Sul (31 ° 21'S 33 ° 45'S) between May 2013 and July 2014, were obtained through isotope ratio mass spectrometry. A subsample of 15 individual's skin and muscle samples was used to verify the need of lipid extraction in these tissues. The isotopic contribution of different food items for the *C. mydas* diet was calculated based on Bayesian isotopic mixture models. The models were developed for two seasons: warm and cold. The results suggested that there is a need of extracting lipids only in muscle tissue, since $\delta^{13}\text{C}$ values were significantly changed after extraction. Through the Student t test and Mann Whitney U test, the values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were compared between warm and cold periods. The Curved Carapace Length (CCL) of the individuals ranged

from 30 to 50 cm, being considered juveniles. The nonparametric test was applied only for $\delta^{13}\text{C}$ skin. No significant difference was found, except for the $\delta^{15}\text{N}$ skin values were higher in the cold period. All mixing models developed indicated a greater contribution of red algae to *C. mydas* diet in comparison to other food items (i.e. green algae, gastropods and cnidarians). Thus, macroalgae of the region is an important food resource for the *C. mydas* juvenile in the present study area, due to assimilation observed for this group. However, long-term studies with analysis of gunt content and stable isotope are necessary to better understand the feeding ecology and assimilation in *Chelonia mydas* diet in southern Brazil.

Keywords: Green sea turtle, feeding ecology, gastrointestinal contents, stable isotopes.

INTRODUÇÃO GERAL

As tartarugas marinhas possuem funções relevantes nos ecossistemas de regiões oceânicas e neríticas, tanto em zonas pelágicas, como demersais e bentônicas. Dentro da relação presa-predador, exercem importante estruturação em comunidades bentônicas controlando a abundância de populações de macroalgas, plantas e invertebrados (Bjørndal 1997, Lazaret al. 2010, Reisser et al. 2013). Além disso, podem fazer papel de substrato para plantas e animais com seu casco, contribuindo para a dispersão desses organismos (Frick et al. 2002). As tartarugas marinhas são cosmopolitas sendo encontradas mais comumente em mares tropicais e subtropicais (Márquez 1990, Meylan & Meylan 1999).

Segundo a IUCN (2004), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas* Linnaeus, 1758) é considerada em risco de extinção, enquanto para o MMA (2014) é tida como vulnerável na lista brasileira de espécies ameaçadas em extinção. O motivo pelo qual as tartarugas possuem tal classificação é pela pressão de diversas atividades antrópicas que vem sofrendo, tais como a coleta de ovos, o trânsito de veículos nas praias de desova, a poluição e principalmente, interação com as artes de pesca (National Research Council 1990, Oravetz 1999).

Dentre as sete espécies de tartarugas marinhas registradas no globo, a tartaruga-verde (*C. mydas*) é a única herbívora na fase adulta. Indivíduos dessa espécie são migradores e frequentemente retornam para as mesmas áreas de alimentação nas mesmas épocas do ano, exercendo pressão de

pastagem sobre determinadas espécies de macroalgas (Bjorndal 1997, Reisser et al. 2013).

Chelonia mydas apresenta mudanças no seu hábito alimentar ao longo da vida (Reich et al. 2007). Entre os três e os cinco anos de idade (aproximadamente 20-35 cm de comprimento curvilíneo de carapaça- CCC) a espécie utiliza o ambiente pelágico, possuindo dieta onívora com tendência à carnívora (Bjorndal 1997). Pouco é conhecido sobre a dieta dessa espécie na fase de desenvolvimento oceânico (James & Seminoff 2013). Alguns estudos observacionais (Salmon et al. 2004), com análise gastrointestinal (Boyle & Limpus 2008), e mais recentemente, com análise de isótopos estáveis (Reich et al. 2007, Arthur et al. 2008) vem tentando decifrar a ecologia alimentar de *C. mydas* nesta fase. Variações na alimentação de acordo com o local e disponibilidade do alimento são observadas na espécie (Guebert-Bartholo et al. 2011), por exemplo, durante a fase pelágica, *C. mydas* pode se alimentar principalmente de macroalgas e fanerógamas marinhas como foi observado na Flórida (Estados Unidos) (Salmon et al. 2004) ou possuir uma dieta similar à tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), se alimentando de animais gelatinosos, crustáceos, plantas e insetos, como no leste da Austrália (Boyle & Limpus 2008). Após o recrutamento para ambientes neríticos, a tartaruga-verde forrageia primariamente sobre organismos bentônicos, principalmente sobre fanerógamas marinhas e macroalgas (Bjorndal 1997, James & Seminoff 2013), mas também podem ingerir esponjas, poliquetas, gastrópodes, entre outros, como foi observado no México através de câmeras integradas (Seminoff et al. 2006). Evidências de seletividade na dieta em algumas regiões também

existem, como na Austrália e no Brasil (e.g. Brand-Gardner et al. 1999, Reisser et al. 2013), com preferências por algas com grande quantidade energética, proteínas e carboidratos solúveis.

A análise do conteúdo gastrointestinal oferece resultados sobre a dieta recente (últimos dias ou semanas) e contribui para revelar o comportamento alimentar e a ecologia trófica (e.g. Bjorndal 1997). Entretanto, a identificação dos itens alimentares depende do grau de digestão dos itens alimentares. O grau de digestão também depende do item ingerido, ou seja, itens alimentares com fácil digestão, como animais gelatinosos, são dificilmente identificados, contrário dos itens difíceis de serem digeridos, como queratina e celulose (Dehn et al. 2007). Finalmente, nem todo o alimento ingerido é assimilado e incorporado da mesma forma ao tecido do animal (Jepsen & Winemiller 2002).

O uso de isótopos estáveis na reconstrução da dieta de animais tem permitido avanços na caracterização das relações tróficas, na elucidação de padrões de alocação de recursos e no uso do hábitat (Peterson & Fry 1987, Dodge et al. 2011). Estudos envolvendo diversos aspectos da biologia e ecologia de tartarugas marinhas tem aplicado a análise de isótopos estáveis (AIE) com sucesso (Arthur & Malazs 2008, Lemons et al. 2011, Thomson et al. 2012, Carman et al. 2014). A metodologia foi aplicada, por exemplo, para o melhor entendimento da fase conhecida como “anos perdidos” (Reich et al. 2007), na ecologia alimentar (Dodge et al. 2011, Cardona et al. 2009), entre outros. Na Argentina, Carman et al. (2014) estudaram a dieta de juvenis de *C. mydas* (CCC 31,3-52.,2 cm) por meio da análise de conteúdos gastrointestinais e a AIE, reportando uma dieta baseada principalmente em cnidários. Assim,

abordagens múltiplas utilizando métodos convencionais em conjunto com métodos como AIE oferecem uma visão mais ampla e completa da dieta de organismos de difícil estudo como é o caso das tartarugas marinhas, sendo que, dentre os mais utilizados estão os isótopos de carbono (C) e nitrogênio (N).

Os isótopos de determinado elemento possuem comportamento químico semelhante, porém devido ao número diferenciado de nêutrons, a massa molecular difere (Fry 2006). Essa diferença de massa irá refletir no comportamento físico do elemento, ou seja, a reatividade dos isótopos mais leves será mais rápida do que a reatividade dos isótopos mais pesados devido à força de ligação ser mais fraca (Fry 2006). Essas diferenças entre o isótopo mais leve e mais pesado levam ao fracionamento isotópico, ou seja, o sinal isotópico do consumidor será enriquecido no isótopo mais pesado (e.g. ^{13}C e ^{15}N) em relação à presa. Devido a esta discriminação isotópica, os tecidos são enriquecidos de ^{13}C e ^{15}N a cada nível trófico (Fry 2006) em torno de 0 a 1‰ e de 3 a 5‰, respectivamente (DeNiro & Epstein 1981; Peterson & Fry 1987). O mínimo fracionamento que ocorre entre níveis tróficos é a razão pela qual o $\delta^{13}\text{C}$ é, em geral, utilizado para inferir a composição isotópica dos produtores que sustentam a rede trófica (DeNiro & Epstein 1978) enquanto o $\delta^{15}\text{N}$ encontrado nos consumidores é, geralmente, utilizado como indicador da posição trófica que os mesmos têm na teia alimentar (DeNiro & Epstein 1981, Minagawa & Wada 1984, Kelly 2000, Post 2002).

Nos produtores primários, a composição isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) varia de acordo com a via metabólica de fixação de carbono pela fotossíntese,

resultando em diferentes fracionamentos isotópicos entre plantas de via C₃ e C₄. As plantas C₄ são enriquecidas em ¹³C em relação às plantas com via fotossintética C₃ (Peterson & Fry 1987). Desta forma, a variação na composição dos produtores primários (i.e. entre ambientes costeiros e oceânicos) resulta numa variação nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ nos diferentes componentes da rede trófica (Clementz et al. 2007), pois o ambiente costeiro é mais enriquecido devido à presença de detritos e plantas com ambas vias fotossintéticas, enquanto a base da fotossíntese do ambiente oceânico é o fitoplâncton (Post 2002). Os valores isotópicos de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) na base da rede trófica, por outro lado, são influenciados, principalmente pelas taxas e vias da fixação de N₂, além do escoamento continental e precipitação (Sigman et al. 2009). Processos antropogênicos, como liberação de efluentes industriais e/ou domésticos, ricos em compostos nitrogenados, também podem alterar os valores isotópicos de nitrogênio, uma vez que com o aumento dos processos de desnitrificação (transformação de nitrato a nitrogênio atmosférico N₂ por bactérias) ocorre o aumento de ¹⁵N no substrato (Peterson 1999, Sigman et al. 2009).

A taxa de reposição ou renovação (*turnover*) varia entre tecidos, de forma que a informação sobre a dieta de um indivíduo, que pode ser obtida através da análise de isótopos estáveis, pode integrar períodos de tempo distintos dependendo do tecido analisado (Phillips & Eldridge 2006). Tecidos com altas taxas de reposição como o plasma, integram períodos curtos de tempo (i.e. dias) enquanto outros como o músculo podem integrar os últimos meses de alimentação (Carman et al. 2014). Tecidos considerados inertes (i.e. dentes) ou de baixa taxa de renovação (i.e. osso) ainda podem oferecer informação de

longos períodos (i.e. anos) ou até da vida toda do indivíduo (Best & Schell 1996, Hobson 1999, McClellan et al. 2010). A ecologia trófica dos diferentes estágios de vida das tartarugas marinhas, por exemplo, foi evidenciada por meio da análise de isótopos estáveis da pele, para classes etárias diferentes (Arthur & Malasz 2008), ou de subsequentes camadas de crescimento do tecido ósseo, as quais representam diferentes etapas da vida do animal (Avens et al. 2013). Porém, a presença de quantidades significativas de lipídeos pode influenciar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ uma vez que estes possuem baixas quantidades relativas de ^{13}C em comparação com outros constituintes bioquímicos como proteínas e carboidratos (DeNiro & Epstein 1977).

O LITORAL DO RIO GRANDE DO SUL COMO ÁREA PARA TARTARUGAS MARINHAS

Chelonia mydas utiliza áreas para alimentação e descanso por toda a costa brasileira, principalmente sobre fundos vegetados (Proietti et al. 2012, Santos et al. 2014). No Rio Grande do Sul (RS), *C. mydas* é avistada ao longo de todo o litoral, concentrando-se próximo a regiões estuarinas e lagunas costeiras (Monteiro 2004). A região é, portanto, uma importante rota migratória e área de alimentação de *C. mydas* durante sua fase juvenil, em transição para adulto (Monteiro et al. 2005). Com base nos estudos sobre dieta das tartarugas na região (a partir de animais encalhados e mortos), o hábito alimentar de *C. mydas* é considerado onívoro e oportunista, com predomínio de algas, plantas

e invertebrados, além de uma alta variabilidade entre anos na composição da dieta (Pinedo et al. 1996, Bugoni et al. 2003, Barros 2007).

O litoral do Rio Grande do Sul- Brasil possui dominâncias sazonais de massas de água, condicionando a composição e abundância de espécies, distribuição das comunidades, interações tróficas e produção biológica. A região sofre grande influência do Rio da Prata, importante fonte de nutrientes para o Atlântico Sudoeste, e da Lagoa dos Patos (Campos et al. 2008, Pivel 2009). A plataforma continental e o litoral da região sofrem do encontro de massas de água subantártica de plataforma (Sub-Antarctic Shelf Water- SASW), da Patagônia, com massas de águas subtropicais de plataforma (Subtropical Shelf Water- STSW), que são derivadas da Corrente do Brasil (Piola et al. 2000).

O litoral do Rio Grande do Sul é quase retilíneo, caracterizado por extensas praias expostas e arenosas, com poucas reentrâncias, baixa declividade e uma escassez de substratos rochosos (Baptista 1974). A linha de costa e a planície costeira são interrompidas por algumas lagoas costeiras e seus estuários, os principais sendo o Complexo Estuarino Tramandaí-Armazém, Lagoa do Peixe, Lagoa dos Patos e Arroio Chuí. A Lagoa dos Patos é classificada como a maior lagoa do tipo “estrangulado” do mundo, onde de conecta com o Oceano Atlântico através de um estreito canal (Kjerfve 1986). O estuário da Lagoa dos Patos abriga pradarias temporárias de vegetação aquática submersa, dominadas pelas fanerógamas *Ruppia maritima*, *Zannichellia palustris* e massas de macroalgas de deriva (e.g. espécies de *Cladophora*, *Rhizoclonium* e *Ulva*), de origem marinha e/ou estuarina

(Copertino & Seeliger 2010). Cerca de 90 espécies de macroalgas bentônicas foram registradas no estuário da Lagoa dos Patos, fixas nos Molhes da Barra de Rio Grande ou formando massas flutuantes dentro da laguna (Coutinho 1982).

Costões e recifes rochosos são importantes locais para o crescimento das macroalgas e, portanto, possíveis áreas de alimentação e descanso de *C. mydas*. No Rio Grande do Sul, há poucos substratos rochosos sendo os costões rochosos da praia de Torres o único local com substrato natural, situado ao norte do Estado, e representando o limite sul de ocorrência dos costões rochosos no Brasil (Coutinho & Zalmon 2009). Ainda na região norte do Rio Grande do Sul, encontram-se os Molhes da Barra de Tramandaí e Imbé (Baptista 1974, Steigleder 2015). Ao sul do Estado estão os Molhes da Barra de Rio Grande e os Molhes da Barra do Chuí, sendo este o limite, na divisa com o Uruguai. Esses dois substratos artificiais representam importantes áreas para *C. mydas* principalmente no verão, devido à aproximação de ramos costeiros da Corrente do Brasil (Monteiro 2004). Na plataforma continental, ainda temos a presença do Parcel do Carpinteiro, substrato rígido localizado a cerca de 30 km da costa de Rio Grande entre 15 e 25 m de profundidade, o qual é um importante hábitat para a colonização de organismos marinhos bentônicos, incluindo macroalgas (Capitoli 1998).

Dentre as atividades antrópicas que vulnerabilizam as tartarugas marinhas, a atividade pesqueira é a principal (National Research Council 1990, Oravetz 1999). No litoral sul do RS, uma das principais causas de mortalidade das tartarugas marinhas é a captura incidental por artes de pesca, como redes de

arrasto, emalhe e espinhéis (Pinedo et al. 1996, Pinedo & Polacheck 2004). Além disso, também há uma alta incidência de encalhes de tartarugas marinhas ao longo do litoral do Rio Grande do Sul. No litoral norte do estado, com uma área de monitoramento de aproximadamente 270 km que corresponde desde a barra da Lagoa do Peixe- Tavares até Torres foram coletados 146 exemplares de *C. mydas* em um período correspondente a 12 anos (de 1994 a 2006) (Nakashima 2008). Entretanto no litoral sul, são encontrados aproximadamente 200-300 indivíduos por ano, dentre os quais 35% a 61% correspondem a indivíduos juvenis de *C. mydas* (Gandra 2005). A superposição espaço-temporal de redes de pesca e de tartarugas resulta numa alta incidência de capturas acidentais, sendo provavelmente o principal problema de conservação para *C. mydas* na região (Pinedo et al. 1996, Pinedo & Polacheck 2004). Portanto, compreender a ecologia trófica da espécie e a importância da região como área de alimentação é fundamental para delinear estratégias de conservação para a espécie.

OBJETIVOS

O presente estudo objetivou investigar a ecologia trófica de juvenis de *Chelonia mydas* na região sul do Rio Grande do Sul, entre a Lagoa do Peixe e o Chuí. A Dissertação foi estruturada em dois capítulos. O primeiro capítulo objetiva analisar os valores de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio dos tecidos de pele e de músculo, visando avaliar a importância relativa de plantas e macroalgas na dieta de *C. mydas*. O segundo capítulo objetiva avaliar o

efeito da extração de lipídeos sobre os valores isotópicos de carbono e nitrogênio do músculo e da pele de *C. mydas*, visando o estabelecimento de um protocolo para os futuros estudos.

CAPÍTULO 1

Ecologia alimentar da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no sul do Rio Grande do Sul, Brasil

INTRODUÇÃO

A tartaruga-verde, *Chelonia mydas*, possui ampla distribuição em habitats costeiros de regiões tropicais a temperadas (Lemons et al. 2011). Indivíduos dessa espécie são migradores e frequentemente retornam para as mesmas áreas de alimentação nas mesmas épocas do ano, exercendo pressão de pastagem sobre certas espécies de macroalgas (Bjorndal 1997, Reisser et al. 2013).

No Brasil, *C. mydas* utiliza áreas para alimentação e descanso ao longo da costa, principalmente sobre fundos vegetados (Proietti et al. 2012, Reisser et al. 2013). No Rio Grande do Sul (RS), *C. mydas* é avistada ao longo de toda a costa, concentrando-se em torno de regiões estuarinas, lagunas costeiras e de substratos rochosos (Monteiro 2004).

Variações no padrão da alimentação da espécie são observadas de acordo com o tamanho da carapaça e com a abundância e disponibilidade de alimento no ambiente (Bjorndal 1997, Arthur et al. 2009, Guebert-Bartholo et al. 2011), embora haja evidências de seletividade em algumas regiões (e.g. Reisser et al. 2013, Santos et al. 2015).

Nos primeiros anos, *Chelonia mydas* se alimenta em ambiente nerítico passando para ambiente pelágico entre os três e cinco anos de idade (aproximadamente 20-35 cm de comprimento curvilíneo de carapaça- CCC)

(Bjorndal 1997, Bolten 2003). Essa fase inicial ainda é pouco compreendida devido à dificuldade de estudo, mas alguns trabalhos envolvendo técnicas diferentes tem permitido revelar mais sobre a dieta de *C. mydas* no seu estágio inicial (Salmon et al. 2004, Boyle & Limpus 2008, Reich et al. 2007). Sua alimentação pode variar de restos de fanerógamas marinhas e macroalgas flutuantes para a ingestão de gastrópodes, crustáceos e insetos (Salmon et al. 2004, Reich et al. 2007, Boyle & Limpus 2008).

Após o recrutamento para o ambiente nerítico, a dieta é primariamente de organismos bentônicos, como fanerógamas marinhas e macroalgas (Bjorndal 1997), como foi observado através da análise do trato na Península da Baixa Califórnia (Lopez-Mendilaharsu et al 2005, Seminoff 2002), Uruguai (Lopez-Mendilaharsu et al 2006) e Brasil (Reisser et al. 2013). Porém também se encontrou a presença de conteúdo animal incluindo esponjas, poliquetas, gastrópodes (Seminoff 2002) e gelatinosos (Carman et al. 2014). Em alguns locais, pode-se observar certo grau de seletividade, como nas ilhas Galápagos onde a pastagem de *C. mydas* era predominante sobre a espécie de alga verde *Ulva lactuca* (Carrión-Cortez et al. 2010) e por algas com baixo conteúdo de fibras e alto teor de nitrogênio na Austrália (Brand-Gardner et al. 1999). Evidências da seletividade por certas algas também foram reportadas no Brasil, como na Ilha do Arvoredo- Santa Catarina (SC), através da observação direta e da análise de regurgitados (Reisser et al. 2013). Nesse local, *C. mydas* consome preferencialmente algas vermelhas (e.g. *Pterocladia capillacea*), possivelmente por apresentar maior valor nutricional e energético (McDermid et al. 2007, Reisser et al. 2013). No nordeste do Brasil foi observado que os

juvenis e adultos (CCC 31-120 cm) possuem dieta composta principalmente por matéria vegetal e em menor proporção por invertebrados, muitas vezes associados à vegetação (Ferreira 1968, Santos et al. 2015). Também foi observada maior ingestão de plantas em juvenis do sudeste brasileiro, por exemplo, estados do Espírito Santo e São Paulo (Sazima & Sazima 1983, Santos et al. 2011, Nagaoka et al. 2012). Assim como nos exemplos anteriores, no Paraná a dieta também foi predominantemente herbívora, com variação sazonal devido à disponibilidade das plantas (Guebert-Bartholo et al. 2011). No litoral do Rio Grande do Sul, o hábito alimentar foi caracterizado como onívoro e oportunista (Bugoni et al. 2003, Barros 2007, Nakashima 2008) com alta diversidade de itens, além de grande variabilidade sazonal e interanual nas proporções de matéria animal e vegetal (Barros 2007). Entretanto, poucos estudos foram realizados com a espécie para essa região. Dentre os trabalhos, a análise da dieta foi realizada com o conteúdo gastrointestinal, não utilizando métodos que possam examinar quais itens alimentares são importantes nutricionalmente para a tartaruga-verde.

A análise do conteúdo gastrointestinal oferece resultados sobre a dieta ingerida nos últimos dias ou semanas e contribui para revelar o comportamento alimentar e a ecologia trófica (e.g. Bugoni et al. 2003). Essas análises, porém, podem subestimar ou superestimar a ingestão de certas presas dependendo da facilidade ou dificuldade da digestão (Dehn et al. 2007). Além disso, a identificação dos itens alimentares pode ser dificultada devido ao grau de digestão dos restos encontrados. Adicionalmente, a análise de conteúdo

estomacal não permite a identificação do alimento com importância nutricional, apenas oferecendo informação dos itens ingeridos (Jepsen & Winemiller 2002).

A análise de isótopos estáveis (AIE) vem complementando o uso de técnicas convencionais em todo mundo (James & Seminoff 2013), como a análise gastrointestinal. Na Argentina, através da combinação dessas duas técnicas, encontrou-se maior proporção de matéria animal na dieta de *C. mydas*, principalmente de animais gelatinosos, em comparação com itens de uma alimentação herbívora, como macroalgas e plantas terrestres (Carman et al. 2014). Lemons et al. (2011) revelaram que *C. mydas* da Baía de San Diego-Califórnia possui dieta onívora, onde os principais itens alimentares foram representados por invertebrados seguidos por fanerógamas marinhas. Vander Zanden et al. (2010) demonstraram que podem haver diferenças dentro população de tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*), onde os indivíduos possuem alimentação especialista em uma mesma região.

Devido às diferenças dos valores isotópicos entre as fontes, principalmente entre os produtores primários devido à rota da fotossíntese (vias C3 e C4) (DeNiro & Epstein 1981, Peterson & Fry 1987), os valores de $\delta^{13}\text{C}$ permitem identificar a principal fonte de recurso alimentar, bem como a origem ambiental do alimento (DeNiro & Epstein 1981, Peterson & Fry 1987) enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ revelam a posição trófica devido ao alto fator de enriquecimento (DeNiro & Epstein 1981, Post 2002).

Diferentes tecidos possuem assinaturas isotópicas distintas em razão de suas taxas metabólicas e de renovação (*turnover*), podendo refletir uma dieta mais recente através de tecidos com taxas metabólicas maiores (e.g. sangue e

fígado) ou refletir uma dieta de longo prazo (últimos dias até alguns meses) quando tecidos com taxas metabólicas menores são analisados (e.g. tecidos queratinizados, córneos e ósseos) (Dalerum & Angerbjörn 2005, Revelles et al. 2007).

A compreensão da ecologia trófica de *C. mydas* e a importância da região costeira e de seus recursos para a alimentação destes animais é fundamental para delinear estratégias de conservação para a espécie. Devido ao número escasso de estudos realizados sobre a espécie no sul do RS, o presente estudo se torna fundamental para o melhor entendimento da ecologia trófica de *C. mydas* na região. Dessa maneira, o presente estudo avaliou a importância relativa de plantas e macroalgas em relação a outros itens alimentares na dieta de *C. mydas* através da análise de isótopos estáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

A área estudada está localizada no litoral sul do Rio Grande do Sul, desde a Lagoa do Peixe (31°20'S; 51°05'W) até o Arroio Chuí (33°45'S; 53°22'W) abrangendo aproximadamente 355 km de extensão (Figura 1). A costa é caracterizada por longas praias arenosas cortadas por lagunas costeiras e arroios. O maior corpo d'água da região é a Lagoa dos Patos, a qual é conectada com o Oceano Atlântico através de um canal estreito (Kjerfve 1986). O estuário da Lagoa dos Patos abriga pradarias temporárias de *Ruppia maritima* e cerca de 40 espécies de macroalgas bentônicas flutuantes e fixas

nos Molhes da Barra de Rio Grande (Copertino & Seeliger 2010). Outros locais importantes para o crescimento das macroalgas e, portanto, possíveis áreas de importância para a alimentação de *C. mydas*, se encontram na praia em Torres, molhes de Tramandaí e Imbé, norte do RS e os molhes da Barra do Chuí (divisa do Brasil com o Uruguai) (Baptista 1974, Steigleder 2015).

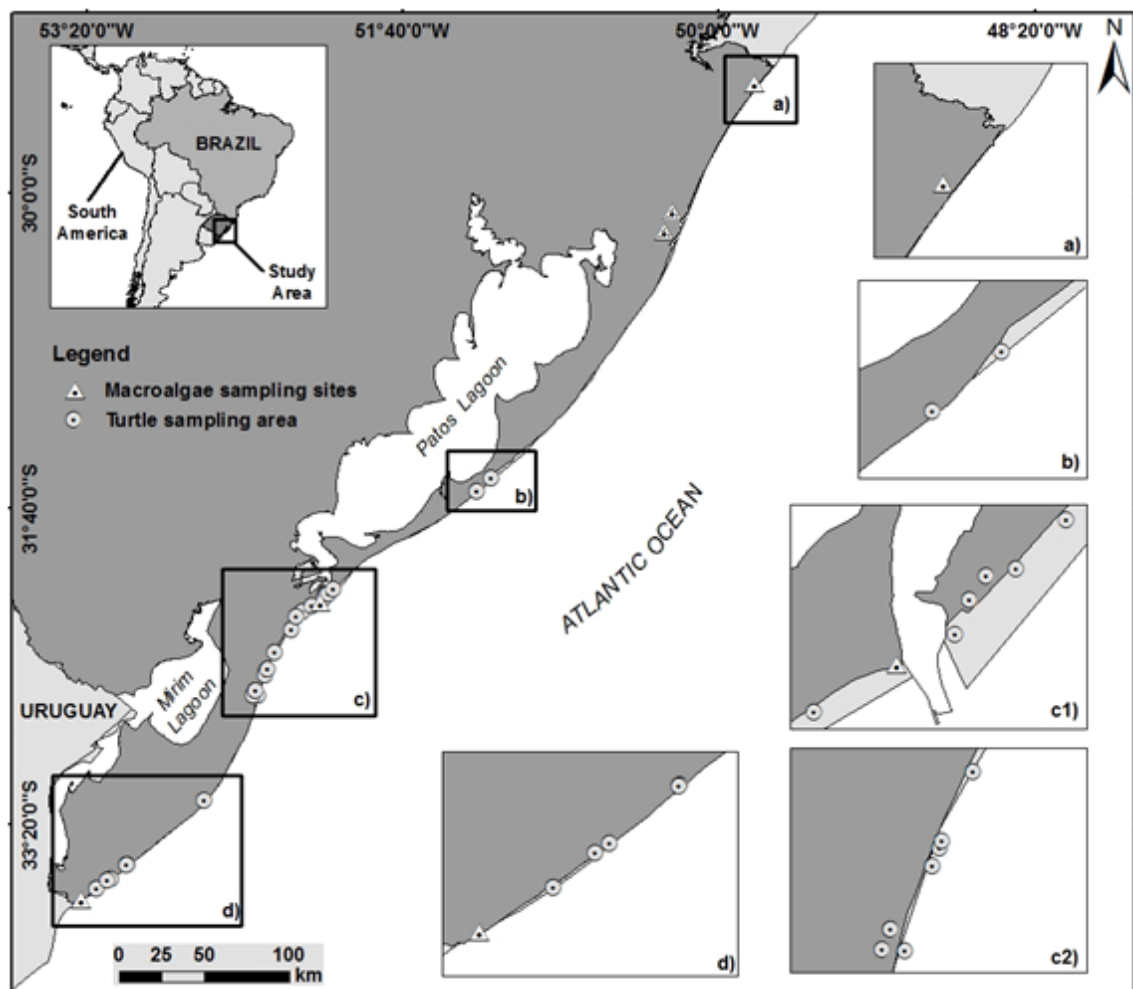


Figura 1.1. Localização da área de estudo mostrando em detalhe os encalhes de *Chelonia mydas* (círculos) e os locais de amostragem das macroalgas (triângulos) em Torres (a), Molhes da Barra de Imbé, de Tramandaí, de Rio Grande (c) e do Chuí (d).

Amostragens

Os exemplares de tartarugas-verdes utilizados foram animais encalhados ao longo da região de estudo, encontrados entre maio de 2013 e junho de 2014. O monitoramento da praia e dos animais foi realizado quinzenalmente pelo Núcleo de Educação e Monitoramento Ambiental de Rio Grande (NEMA) e pelo Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha (ECOMEGA) do Instituto de Oceanografia da FURG.

De cada exemplar coletado (n=48) foi registrada a posição geográfica por meio de um GPS e medido o comprimento curvilíneo de carapaça (CCC) de acordo com Bolten (1999). Amostras de músculo e pele da nadadeira superior direita (Lemons et al. 2011) foram retiradas com auxílio de bisturi e em seguida armazenadas em sacos plásticos e congeladas até o seu processamento para análise de isótopos estáveis. Estes tecidos foram escolhidos devido à facilidade de coleta em exemplares mortos e que estes refletem a dieta de *C. mydas* em diferentes escalas de tempo. Segundo Reich et al. (2008) a pele integraria a dieta de aproximadamente 2-3 meses. Até o momento não existem estimativas do tempo de integração para o músculo de tartarugas-marinhas, porém em mamíferos terrestres foi calculado um tempo de integração de aproximadamente um mês (Caut 2013).

Entre setembro de 2014 e março de 2015 foram coletados exemplares de macroalgas reportados como parte da dieta de *C. mydas* na região (Pinedo et al. 1996, Bugoni et al. 2003, Barros 2007, Nakashima 2008) nos seguintes substratos consolidados: 1) Costão da praia da Cal e a Laje das Furnas (Torres), 2) Molhes da Barra de Imbé, 3) Tramandaí, 4) Molhes da Barra de Rio

Grande e 5) Molhes da Barra do Chuí (Figura 1). A escolha dos locais de coleta baseou-se na ocorrência das macroalgas (Baptista 1974, Coutinho 1982, Steigleder 2015).

Os exemplares de macroalgas foram coletados de forma aleatória, por todo o costão, removidas dos substratos rochosos com o auxílio de espátulas, armazenadas em sacos plásticos identificados, transportadas resfriadas e congeladas até processamento e análise.

Análises isotópicas

As amostras de pele e músculo para análise isotópica foram preparadas de acordo com o protocolo de Revelles et al. (2007). Um teste preliminar mostrou que a extração de lipídeos não é necessária para ambos os tecidos analisados devido aos seus baixos teores de lipídeos (C:N <3,5 Post et al. 2007). As amostras de tecidos e das macroalgas foram limpas com água destilada, secas em estufa a 60°C por 48 h, homogeneizadas e maceradas com gral e pistilo até se transformarem em um pó fino. Foram retiradas alíquotas das amostras dos tecidos, pesadas (entre 0,5 e 0,9 mg e aprox. 1mg para os tecidos das tartarugas e as macroalgas, respectivamente) e inseridas em cápsulas de estanho (5x9 mm) para análise.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis da Washington State University (EUA) para a determinação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, por meio de um espectrômetro de massas de razão isotópica de fluxo contínuo (Delta PlusXP, Thermofinnigan, EUA). A razão (R) de dois isótopos estáveis, um pesado e um leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foi quantificada nas

amostras e expressa em relação àquela encontrada em um padrão internacionalmente aceito, com a notação delta (δ):

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ou } \delta^{15}\text{N} = ((R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1) \times 1000,$$

onde:

$$X = {}^{13}\text{C} \text{ ou } {}^{15}\text{N},$$

R é a razão ${}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ ou ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$ na amostra (R_{amostra}) ou no padrão ($R_{\text{padrão}}$).

O padrão para o carbono é o Vienna Pee Dee Belemnite e o N_2 atmosférico para o nitrogênio. A precisão analítica, com base no desvio padrão de réplicas de padrões internos do laboratório foi $\leq 0,1\text{‰}$, tanto para $\delta^{13}\text{C}$ como para $\delta^{15}\text{N}$.

Análise dos dados

A normalidade e a homocedasticidade dos dados isotópicos foram testados utilizando os testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os valores isotópicos de carbono em músculo e de nitrogênio em pele foram transformados matematicamente utilizando-se a transformação Box-Cox, pois não seguiram uma distribuição normal. Para as análises envolvendo os dados de $\delta^{13}\text{C}$ em pele, testes não paramétricos foram utilizados devido ao pressuposto da normalidade não ter sido atingido, mesmo após ser realizada uma série de transformações. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ entre músculo e pele. O nível de significância (α) utilizado para o teste foi de 0,05.

Para verificar se existiam variações sazonais nos valores isotópicos, os dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de pele e músculo de exemplares coletados durante os meses quentes (e.g. setembro de 2013 a fevereiro de 2014) e frios (e.g. maio a

agosto de 2013 e março a junho de 2014) foram comparados por meio do teste t de Student e do teste Mann-Whitney, no caso do $\delta^{13}\text{C}$ da pele.

Modelos de mistura

Para avaliar a contribuição das macroalgas e presas animais na dieta de *C. mydas* foram construídos modelos de mistura isotópica Bayesianos através do pacote SIAR (*Stable Isotope Analysis in R*) (Parnell et al. 2010) dentro do ambiente estatístico R (R 3.0.1, R Development Core Team 2013). No total, 4 modelos foram calculados: utilizando os dados isotópicos da pele e do músculo para as amostras coletadas nos períodos quente e frio. Os modelos são construídos a partir das composições isotópicas dos consumidores, dos valores médios das presas potenciais e de fatores de discriminação específicos, levando em conta a variação em todos estes parâmetros (Parnell et al. 2010, Phillips 2012). As presas foram escolhidas de acordo com estudos prévios baseados na análise de conteúdos estomacais (Pinedo et al. 1996, Bugoni et al. 2003, Barros 2007, Nakashima 2008). Assim, 5 grupos de presas foram definidos: (1) algas verdes (*Ulva* sp., *Ulva fasciata* e *Ulva linza*); (2) algas vermelhas (*Gelidium crinale* e *Gelidium floridanum*); (3) moluscos (*Macra* sp., *Mytilus edulis platensis*, *Mesoderma mactroides*, *Amiantis purpurata*, *Collisella subrugosa*, *Littorina ziczac*, *Olivancillaria vesica vesica* e *Stramonita haemastoma*); (4) águas-vivas (*Scyphozoa*) e (5) anêmonas (*Bunodosoma* sp.). Os valores médios para os grupos (1) e (2) foram obtidos sem levar em conta o local de coleta. O valor médio do grupo (3) foi obtido a partir de valores publicados em Condini et al. (2014) e dados isotópicos de *Macra* sp. (A.M.

Garcia, dados não publicados). Por último os valores para o grupo (4 e 5) foram obtidos de Condini et al. (2015) e L. Medeiros, dados não publicados. Os valores de discriminação isotópica entre os tecidos das presas e do predador utilizados (*Trophic Enrichment Factors* ou TEFs) foram obtidos da literatura. Assim, para as análises envolvendo os valores isotópicos em pele foram utilizados os valores de TEF reportados por Vander Zanden et al. (2012) para epiderme de juvenis de *C. mydas* ($\Delta^{13}\text{C} = 1,87 \pm 0,56 \text{ ‰}$, $\Delta^{15}\text{N} = 3,77 \pm 0,4 \text{ ‰}$). Devido aos valores deplecionados em ^{13}C encontrados no músculo (ver Resultados) a utilização deste TEF levou a resultados pouco prováveis respeito das fontes utilizadas. Assim, outro valor de TEF, também desenvolvido para a espécie (Seminoff et al. 2006), foi escolhido para os modelos envolvendo os dados deste tecido ($\Delta^{13}\text{C} = 0,17 \pm 0,03 \text{ ‰}$, $\Delta^{15}\text{N} = 2,8 \pm 0,11 \text{ ‰}$). Os resultados dos modelos de mistura foram apresentados como os intervalos de credibilidade de 95, 75 e 50 % de cada grupo de presa para cada tecido/estação. Finalmente, as matrizes de correlação entre as distribuições posteriores de cada grupo de presa foram produzidas como uma forma de avaliar a performance dos modelos (Inger et al. 2010).

RESULTADOS

O comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) dos exemplares de *C. mydas* variou entre 30 e 50 cm (média \pm DP: 38,4 \pm 5,5 cm). Cerca de 30 exemplares (56 % do total) foram encontrados nas proximidades dos molhes da Barra de Rio Grande. Um total de 41 indivíduos foi encontrado ao sul dos molhes (Praia do Cassino). Apenas 7 animais foram coletados nas proximidades da Lagoa do Peixe (Figura 1).

Valores extremos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram identificados a través de gráficos de dispersão e foram eliminados das análises (4 amostras de pele e 3 amostras de músculo). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ nas amostras de pele foram significativamente mais altos do que nas amostras de músculo (teste U de Mann-Whitney, $U = 54,0$; $p < 0,0001$). Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ do músculo e da pele não tiveram diferenças significativas (teste U de Mann-Whitney, $U = 914,5$; $p = 0,54$) (Tabela 1.1, Figura 2).

Ao comparar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ entre os períodos frio e quente não foram encontradas diferenças significativas (teste U de Mann-Whitney para $\delta^{13}\text{C}$ em pele e testes t de Student para o restante das comparações; $p > 0,05$). A única exceção foram os valores de $\delta^{15}\text{N}$ em pele que tiveram valores mais altos no período frio (Teste t de Student, $t = 2,18$; $p = 0,035$) (Tabela 1.1, Figura 2).

Tabela 1.1 Valores isotópicos de carbono e nitrogênio do músculo e da pele de *C mydas* e razão C:N dos tecidos das tartarugas-verdes (Mín: mínimo; Máx: máximo; M ± DP: média ± desvio padrão).

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			N
	M±DP	Min	Max	M±DP	Min	Max	
<i>C. mydas</i>							
Músculo	-17,6±1,1	-18,7	-12,7	10,6±1,7	7,1	15,8	
Frio	-17,8±0,7	-18,7	-16,2	10,6±1,5	8,4	13,5	21
Quente	-17,7±0,5	-18,5	-16,1	10,3±1,5	8,1	13,6	24
Pele	-15,6±1,1	-19,7	-12,2	10,5±2	4,8	13,3	
Frio	-15,4±0,6	-16,5	-14,2	11,4±1,7	7,9	13,2	20
Quente	-15,6±1,1	-18,5	-12,2	10,3±1,6	7,8	13,3	24
Clorófitas	-16,2±0,8						
Torres							
<i>Ulva fasciata</i>	-15±1	-16,8	-14,3	8,6±0,1	8,4	8,7	5
Imbé							
<i>Ulva fasciata</i>	-15,5±0,7	-6,3	-14,7	8,5±0,9	7,3	9,6	5
Tramandai							
<i>Ulva linza</i>	-15,9±0,2	-16,2	15,7	8,8±0,2	8,4	8,9	5
Rio Grande							
<i>Ulva linza</i>	-16,3±0,5	-17,1	-15,2	6,4±2,2	3,4	8,6	10

Chuí								
	<i>Ulva linza</i>	-16,8±0,4	-17,9	-16,3	11,1±1,9	8,3	12,9	15
Rodófitas		-18,5±1,3						
Imbé								
	<i>Gelidium crinale</i>	-18,8±0,9	-20,2	-17,6	8,9±0,5	8,2	9,5	5
Rio Grande								
	<i>Gelidium floridanum</i>	-18,4±1,5	-21	-16,2	7,2±1,8	5,2	9,4	10
	<i>Gelidium crinale</i>	-18,5±1,2	-19,9	-17,2	7,9±0,9	6,6	8,8	5
Moluscos^a								
	<i>Mactra isabelleana</i>	-15,5±0,5	-16,1	-14,5	9,1±0,2	8,5	9,6	7
	<i>Mytilus edulis platensis</i>	-16,9±0,7			9,4±0,3			2
	<i>Mesoderma mactroides</i>	-17,7±0,6			9,9±0			2
	<i>Collisella subrugosa</i>	-14,7±0,2			12,6±0,04			2
	<i>Littorina ziczac</i>	-12,3±0,1			10,4±0,02			2
	<i>Olivancillaria vesica vesica</i>	-16,05±0,52			13,70±0,26			2
	<i>Stramonita haemastoma</i>	-13,10±0,05			14,05±0,45			2

Medusas^b

<i>Schyphozoa</i>	-16,2±1,3	-18,1	-15,3	13,9±0,1	13,7	14,1	4
-------------------	-----------	-------	-------	----------	------	------	---

Anêmonas^c

<i>Bunodosoma</i> sp.	-11,5±0,5			10,4±0,1			2
-----------------------	-----------	--	--	----------	--	--	---

a) Condini et al. 2014 e A. M. Garcia, dados não publicados; b) Condini et al. 2014 e L. Medeiros, dados não publicados; c) Condini et al. 2014.

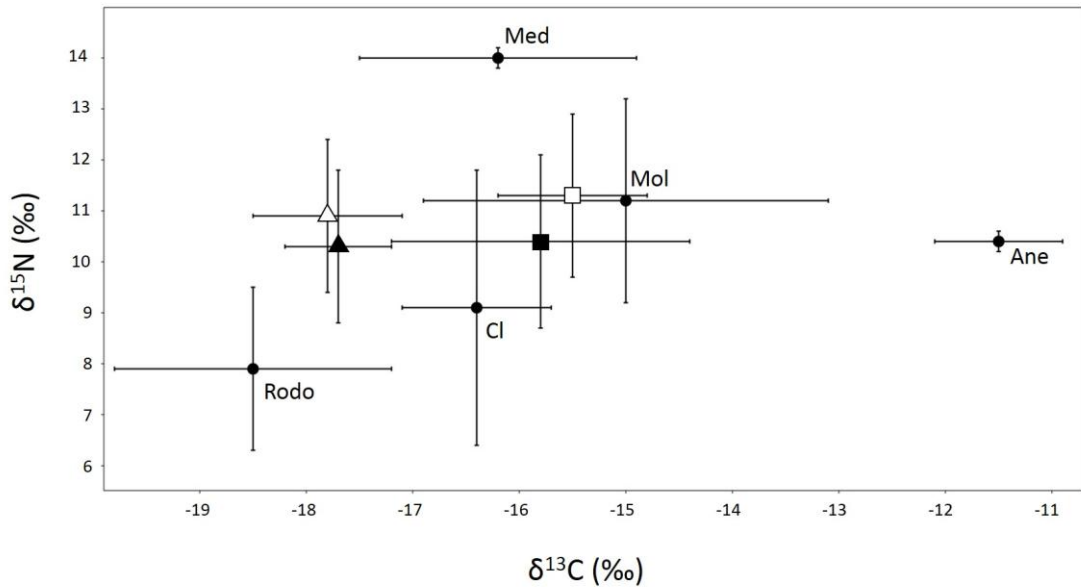


Figura 1.2. Biplot dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio no músculo e pele de *C. mydas* coletadas no sul do Rio Grande do Sul, durante os meses frios (Δ músculo e □ pele) e quentes (▲ músculo e ■ pele). Os valores isotópicos das potenciais presas também são apresentados: Cl, Clorófitas; Rodo, Rodófitas; Mol, Moluscos; Ane, Anêmonas; Med, Medusas. Os valores médios do grupo Mol e Ane foram reportados em Condini et al. (2015). Os símbolos representam o valor médio e as barras o desvio padrão dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Modelos de mistura isotópica

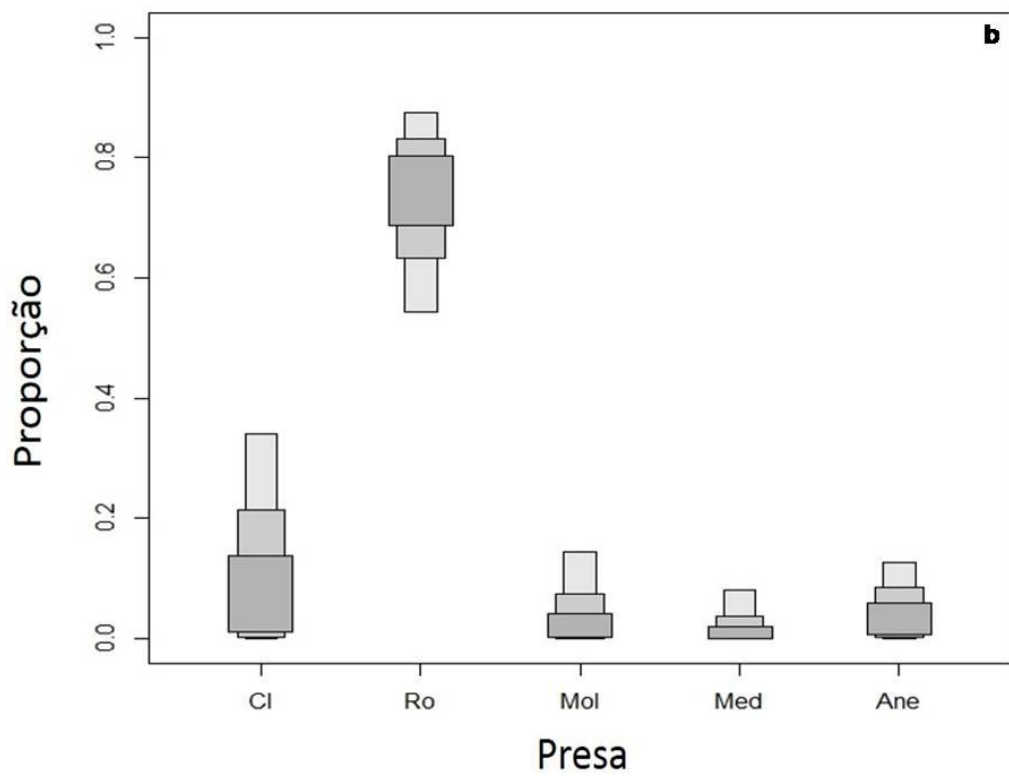
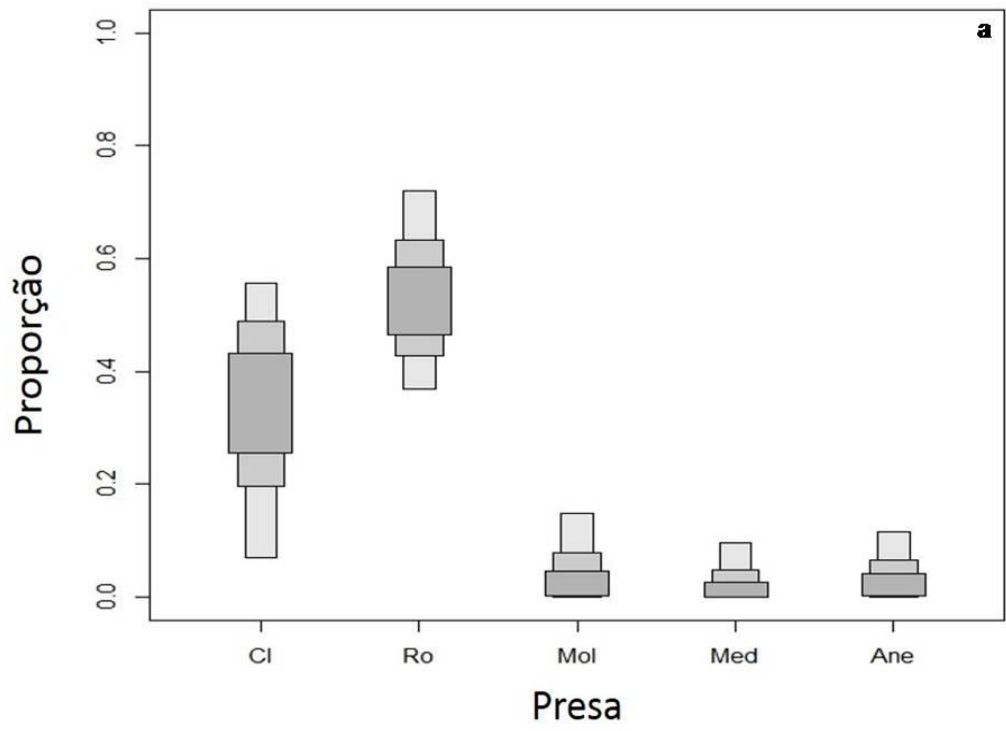
De um modo geral, as análises do SIAR indicaram uma contribuição significativa das macroalgas para a dieta de *C. mydas*, particularmente de macroalgas vermelhas. As algas vermelhas apresentaram uma contribuição significativamente maior que todos os demais itens alimentares, respondendo aproximadamente, de 53 a 74% do valor de mistura isotópica, quando considerado clorófitas, rodófitas, moluscos, medusas e anêmonas (Tabela 1.2). A contribuição das algas vermelhas ficou mais evidente para os valores isotópicos de carbono do músculo dos animais coletados nas estações frias

(73,6%), seguido pelos valores isotópicos da pele (71,8%) e músculo das estações quentes (69,8%). O grupo das clorófitas considerado no modelo apresentou contribuições de 14,5% até 32,7% da dieta. O modelo de mistura evidenciou que as macroalgas sempre estiveram presentes, ou seja, sempre houve contribuição na dieta. Dentre os animais considerados, as anêmonas tiveram as maiores contribuições para pele das estações quentes (5,7%), seguido de moluscos para pele e músculo dos meses frios (5,5 e 4,7%, respectivamente), porém há muitos valores nulos, mostrando que a contribuição foi inexistente em muitos casos (Figura 3).

A matriz de correlação evidenciou que as distribuições posteriores de rodófitas e clorófitas estavam negativamente correlacionadas em todos os modelos construídos (r entre -0,84 e -0,90).

Tabela 1.2. Composição da dieta modelada através do SIAR para *C. mydas* coletadas no sul do Rio Grande do Sul. Os modelos foram construídos para os dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de pele e músculo de exemplares coletados durante os meses quentes e frios. As presas utilizadas no modelo foram agrupadas em Clorófitas (Cl), Rodófitas (Rod), Moluscos (Mol), Medusas (Med) e Anêmonas (Ane). Os resultados são mostrados como a proporção média (%) de cada grupo de presa na dieta com um intervalo de confiança de 95 % (IC_{95}).

Presa	Pele				Músculo			
	Frio		Quente		Frio		Quente	
	Média	IC_{95}	Média	IC_{95}	Média	IC_{95}	Média	IC_{95}
Cl	32,7	7,0 - 55,7	14,5	0 - 34,0	15,2	0 - 31,2	21,5	2,6 - 38,2
Rod	53,8	36,9 - 72,0	71,8	54,3 - 87,5	73,6	59,9 - 87,1	69,8	56,0 - 84,3
Mol	5,5	0 - 14,9	5,2	0 - 14,5	4,7	0 - 12,5	3,7	0 - 10,0
Med	3,4	0 - 9,7	2,7	0 - 8,0	3,7	0 - 9,9	2,6	0 - 7,5
Ane	4,6	0 - 11,5	5,7	0 - 12,6	2,8	0 - 7,6	2,5	0 - 6,8



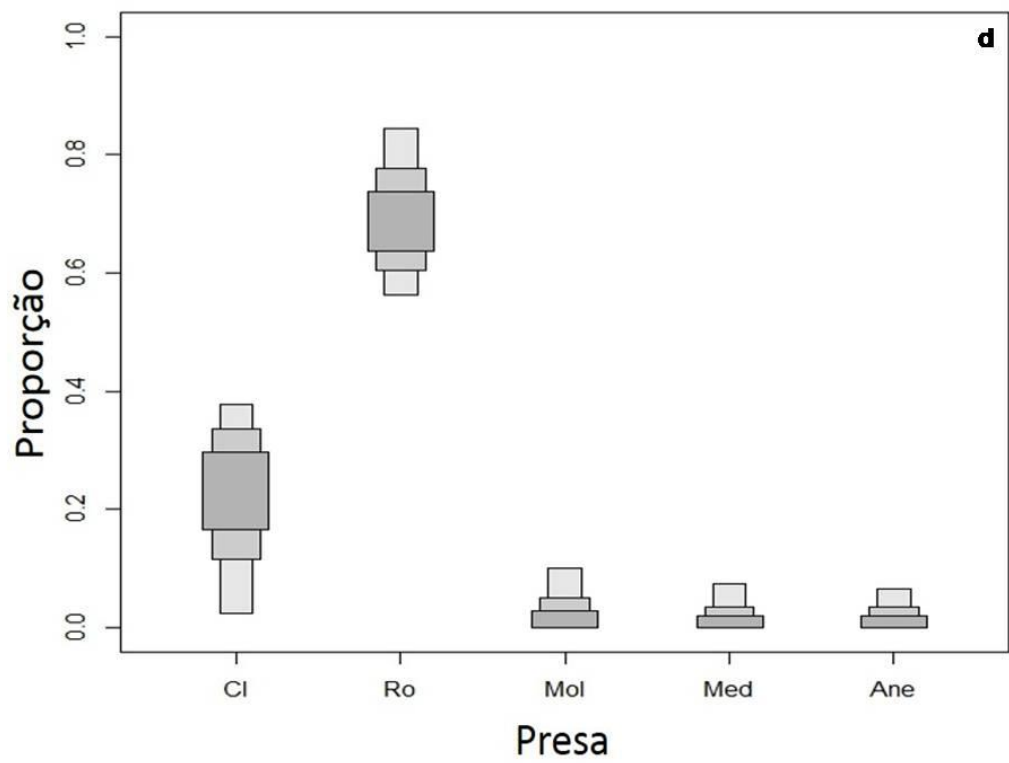
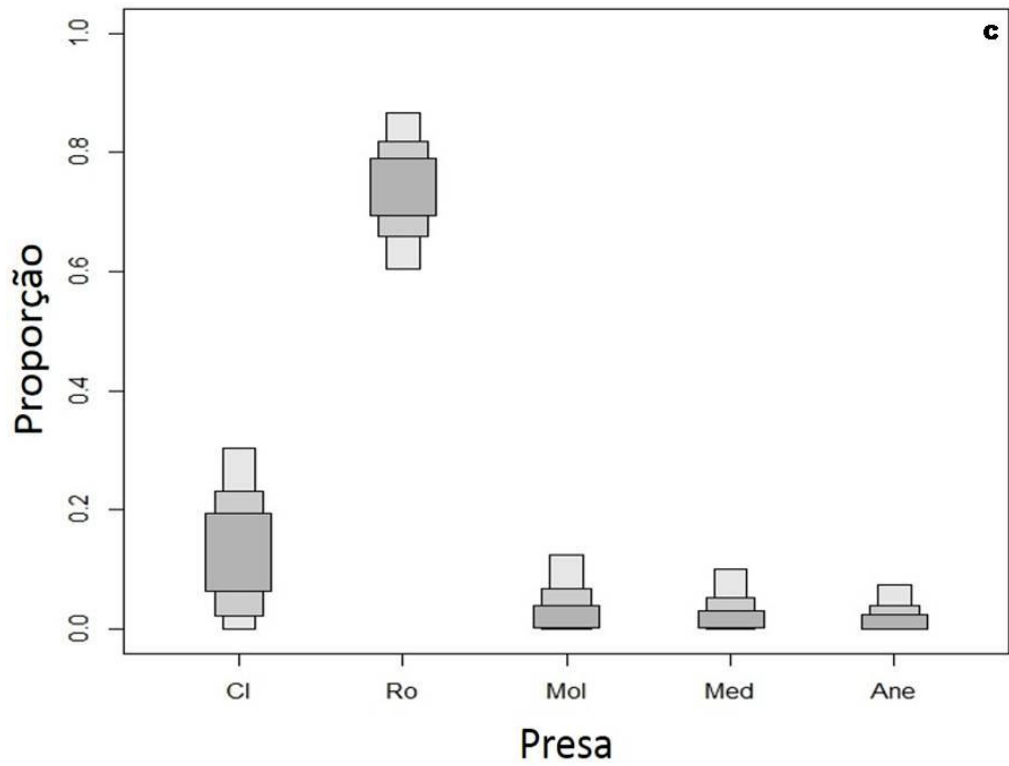


Figura 1.3. Contribuição relativa das presas para a dieta de *C. mydas* do sul do Rio Grande do Sul. A proporção de cada presa é apresentada como caixas mostrando os

intervalos de confiança de 50 %, 75 % e 95 %: IC50 = cinza escuro, IC75 = cinza médio, IC95 = cinza claro. Os resultados de quatro modelos são apresentados: modelo construído a partir de dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em pele de indivíduos coletados em meses frios (a) e quentes (b) e modelos construídos a partir de dados de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em músculo de indivíduos coletados em meses frios (c) e quentes (d). As presas utilizadas no modelo foram agrupadas em Clorófitas (Cl), Rodófitas (Rod), Moluscos (Mol), Medusas (Med) e Anemonas (Ane).

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, a dieta assimilada de juvenis de *Chelonia mydas* da região do sul do RS, Brasil é composta principalmente por conteúdo vegetal. Em comparação aos itens de origem animal, as macroalgas apresentaram maior contribuição nutricional aos tecidos do músculo e da pele.

A comparação entre os componentes isotópicos da pele e do músculo (que refletem períodos diferentes da dieta) permitem entender melhor a ecologia alimentar de *C. mydas*. Em virtude do enriquecimento trófico apresentado pelo carbono, este elemento usualmente é utilizado para caracterizar a dieta dos consumidores (Peterson & Fry 1987). Os valores enriquecidos de ^{13}C da pele sugerem uma diferença temporal no hábito de forrageio dos indivíduos expressa em tecidos de maior (i.e. pele) e menor (i.e. músculo) taxa de renovação (Hobson 2005, Reich et al. 2008, Carman et al. 2014). Assim, os valores mais enriquecidos em ^{13}C refletem uma alimentação em ambiente costeiro/bentônico, enquanto valores mais empobrecidos indicariam um forrageio em ambiente pelágico (Fry 2006). Estas diferenças também podem ser o reflexo de uma alimentação baseada em produtores que possuem

diferentes vias metabólicas como plantas C_4 vs C_3 ou associadas a outros fatores como forma de captação de nutrientes das macroalgas (Peterson & Fry 1987). Todavia, esses não são os únicos fatores que podem explicar as diferenças isotópicas de carbono entre os tecidos. Diferentes tecidos possuem distintas propriedades fisiológicas (rotas metabólicas de cada tecido originam diferentes proteínas), resultando em diferentes valores isotópicos para os dois tecidos analisados (Cherel et al. 2014).

Tanto para o período frio quanto para o quente, o grupo das rodófitas foi o que teve maior contribuição para a dieta de *C. mydas* devido à maior assimilação deste grupo nos tecidos analisados, evidenciando a importância desse grupo através dos modelos de mistura isotópica desenvolvidos em comparação com os itens animais. Outros estudos utilizando a análise de conteúdo gastrointestinal também observaram a preferência alimentar de *C. mydas* por algas vermelhas (Arthur & Malazs 2008, López-Mendilaharsu et al. 2006). Na região sul do Brasil, na Ilha do Arvoredo- Santa Catarina, as rodófitas também tiveram destaque na dieta da tartaruga-verde (Reisser et al. 2013). A importância alimentar das algas vermelhas deve estar relacionada com sua qualidade nutricional, em razão dos altos valores de proteínas e carboidratos solúveis (McDermid et al. 2007, Reisser et al. 2013). As algas de maior importância na dieta são representadas por espécies de algas vermelhas agarófitas ou carragenófilas (produtoras de ágar ou carragena, respectivamente). Estas substâncias são hidrocolóides, galactanos sulfatados, presentes nas paredes celulares destas algas vermelhas e abundantes em espécies de *Gelidium*, *Gracilaria*, *Grateloupia* etc (Hurd et al. 2014), sendo

estes gêneros comumente encontrados na dieta de *C. mydas* (Barros 2007, Reisser et al. 2013). Na região do Rio da Prata, Argentina, o conteúdo de organismos gelatinosos e bivalves foi importante na dieta de *C. mydas* de acordo com análises isotópicas e do trato digestivo (Carman et al. 2014). Alguns fatores podem induzir a maior ingestão da matéria animal por *C. mydas* como as menores abundâncias e diversidade de macroalgas (Horta et al. 2008, Santos et al. 2015), a diminuição da eficiência da digestão da tartaruga com a temperatura baixa (Bjorndal 1980) e a maior facilidade de digerir animais, como os gelatinosos, em relação às macroalgas (Bjorndal 1980, Carman et al. 2014). Contudo, os animais gelatinosos possuem baixo valor nutricional (Doyle et al. 2007), enquanto que as macroalgas são mais nutritivas (Dermid et al. 2007, Reisser et al. 2013). Em relação aos moluscos, a menor assimilação pode estar relacionada à dificuldade na digestão de presas protegidas por conchas e outros materiais refratários, aparecendo na análise gastrointestinal simplesmente por não ser digerido facilmente.

Diversos autores, baseados em estudos de conteúdo gastrointestinal (e.g. Bugoni et al. 2003, Williams et al. 2014) ou análises isotópicas (e.g. Cardona et al. 2009, Cardona et al. 2010, Williams et al. 2014), observaram que juvenis de *C. mydas* são onívoros. Nesses animais, há uma mistura do sinal das presas, que podem estar presentes em um mesmo nível trófico ou em níveis tróficos diferentes, porém com médias semelhantes, isso gera uma dificuldade na separação das presas e menor confiabilidade nas inferências sobre as contribuições. Além disso, o consumo prolongado de macroalgas pode resultar na ausência de variação no sinal isotópico em animais onívoros (Cardona et al.

2009), resultando na grande importância das algas vermelhas no presente estudo.

A diversidade de macroalgas no sul do Rio Grande do Sul aumentou a partir do século XX devido à construção dos molhes na cidade de Rio Grande, no baixo estuário da Lagoa dos Patos. Esse aumento se deu devido à disponibilidade de um substrato consolidado para o assentamento e crescimento das macroalgas (Coutinho 1982, Coutinho & Seelinger 1986, Copertino & Seelinger 2010). Esse fato provavelmente influenciou na alimentação de *C. mydas* devido às mudanças na disponibilidade de alimento, aumentando o consumo de macroalgas pela espécie na região, possuindo consequências diretas na importância da tartaruga-verde.

CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que no sul do RS, as macroalgas são os itens mais importantes da dieta de juvenis de *Chelonia mydas*, de acordo com as análises isótopos estáveis em detrimento presas animais. Os resultados obtidos através da AIE mostraram as macroalgas como item mais importante nutricionalmente para *C. mydas* devido à maior assimilação desse grupo em detrimento dos itens animais. Entretanto, devido aos resultados divergentes em comparação aos outros trabalhos, estudos a longo prazo com análises dos tratos em conjunto com AIE são necessários para o melhor entendimento da ecologia alimentar e as assimilações na dieta de *Chelonia mydas* do sul do Brasil.

CAPÍTULO 2

Efeitos da extração de lipídeos sobre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ do músculo e da pele de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*)

INTRODUÇÃO

A análise de isótopos estáveis (AIE) de carbono (valores de $\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio (valores de $\delta^{15}\text{N}$) de tecidos animais tem sido muito utilizado em estudos de ecologia trófica e uso do hábitat em diversos taxas, inclusive da megafauna marinha (e.g. aves marinhas, Cherel et al. 2005, tartarugas marinhas, Arthur et al. 2008, tubarões, Carlisle et al. 2014 e mamíferos marinhos, Drago et al. 2015). A metodologia se baseia no princípio de que a composição isotópica dos tecidos dos consumidores reflete a mistura da composição isotópica presente nos diferentes itens consumidos na dieta (DeNiro & Epstein 1978, 1981). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ values sofre um aumento significativo com a elevação dos níveis tróficos (DeNiro & Epstein 1981, Minagawa & Wada 1984) e conseqüentemente, são comumente utilizados como indicadores da posição trófica do consumidor (Postt 2002, McCutchan et al. 2003, Vanderklift & Ponsard 2003). Por outro lado, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ variam pouco ao longo da cadeia alimentar e normalmente são utilizados pra inferir as fontes primárias na cadeia trófica (McCutchan et al. 2003).

Nos últimos anos, vários estudos utilizando AIE tem abordado a questão dos efeitos dos lipídios sobre a composição isotópica de carbono nos tecidos (e.g. Bodin et al. 2007, Kojadinovic et al. 2008, Hussey et al. 2012). Devido às diferenças nas vias bioquímicas durante a síntese, os lipídios são conhecidos

por serem empobrecidos em ^{13}C e relação a outros componentes importantes (DeNiro & Epstein 1977). As diferentes rotas das proteínas e lipídios (Martinez del Rio et al. 2009) devem provocar um viés na reconstrução da dieta baseada a AIE dos tecidos com uma quantidade significativa de lipídios (Ricca et al. 2007). Portanto, os lipídios são geralmente removidos dos tecidos através da extração química ou por correções matemáticas por meio de equações específicas para espécies e tecidos (e.g. Kelly 2000, Phillips & Gregg 2001, Logan et al. 2008). A extração química de lipídios é geralmente eficaz, resultando em valores isotópicos de carbon que podem ser considerados livres da influência dessas biomoléculas (Post et al. 2007, Logan et al. 2008, Medeiros et al. 2015), resultando no aumento dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ comparados às amostras sem extração. No entanto, muitos estudos tem reportado que alterações inesperadas nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ após a extração (Sotiropoulos et al. 2004, Ricca et al. 2007, Logan et al. 2008), onde se acredita que pode ser consequência da perda de proteínas associadas com estruturas lipídicas, como as membranas lipoproteicas (Sweeting et al. 2006). Entretanto, é importante testar os efeitos dessa remoção em nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ antes de utilizar a AIE para abordar questões sobre a ecologia trófica de organismos.

Devido à alta correlação entre os valores da razão de carbono e nitrogênio (C:N) e a porcentagem de lipídios, a própria razão C:N tem sido usada como indicador do teor de lipídio para diversos tecidos e organismos (e.g. Post et al. 2007). Por esse motivo, amostras com valores de C:N > 3,5 são consideradas com alto teor de lipídios (Post et al. 2007), indicando a necessidade da extração química ou a utilização de equações de normalização (Sweeting et al.

2006, Post et al. 2007). Todavia, alguns estudos não encontraram suporte para a relação entre C:N e a porcentagem de lipídios em organismos como peixe (Fagan et al. 2011), mamíferos marinhos (Wilson et al. 2013, Yurkowski et al. 2015), tartarugas marinhas (Medeiros et al. 2015) e invertebrados (Kiljunen et al. 2006). Portanto, a necessidade da extração deve ser testada antes de considerar os tecidos livres da influencia da interferência pelos lipídios, mesmo para tecidos com razão C:N < 3,5 (Fagan et al. 2011, Yurkowski et al. 2015).

Diversos estudos envolvendo aspectos da biologia e ecologia das tartarugas marinhas tem aplicado a AIE com sucesso (Arthur et al. 2008, Lemons et al. 2011, Thomson et al. 2012, Carman et al. 2014). Em muitos desses estudos, a extração lipídica dos tecidos das tartarugas marinhas tem sido utilizados como protocolo padrão, muitas vezes sem testar a eficiência da extração e a interferência no valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Revelles et al. 2007, Cardona et al. 2009). Considerando que a metodologia utilizada na preparação das amostras pode influenciar nos resultados e, conseqüentemente, na interpretação dos dados isotópicos, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da extração de lipídios nos valores isotópicos de carbono e nitrogênio nos tecidos de pele e de músculo em juvenis de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparação das amostras

Os exemplares de tartarugas-verdes (n=15) utilizados foram animais encalhados ao longo da costa do sul do Rio Grande do Sul, Brasil, coletados entre a Lagoa do Peixe (31°20'S; 51°05'W) e o Arroio Chuí (33°45'S; 53°22'W), de maio de 2013 a junho de 2014. Para cada exemplar, foi medido o comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) desde a nuca até a placa posterior da carapaça utilizando uma fita métrica (Bolten 1999). Amostras de pele e músculo foram coletadas da nadadeira superior direita (Revelles et al. 2007) e em seguida armazenadas em sacos plásticos identificados, transportadas e armazenadas congeladas a -20°C. O monitoramento da praia e dos animais foi realizado quinzenalmente pelo Núcleo de Monitoramento e Educação Ambiental de Rio Grande (NEMA) e pelo Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha (ECOMEGA) do Instituto de Oceanografia da FURG.

Em laboratório, as amostras foram descongeladas, lavadas com água destilada e secas em estufa a 60°C por 24 horas. Cada amostra de tecido (15 de pele e 15 de músculo) foi subdividida em duas, e submetidas a dois tratamentos: com e sem extração de lipídios.

Em um primeiro momento, as amostras que foram submetidas à extração de lipídios foram colocadas em envelopes de papel filtro. A extração foi realizada utilizando uma solução 2:1 de clorofórmio/metanol em um *Soxhlet* realizando dois ciclos de lavagens de 8 horas cada um (Folch 1957, Revelles et

al. 2007). Em um segundo processo, as amostras foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 60°C por 48 horas.

Todas as amostras (com e sem extração) foram maceradas com gral e pistilo até se transformarem em um pó fino, pesadas (entre 0,5 e 0,9 mg) e armazenadas em cápsulas de estanho de 5x9 mm. As amostras sem extração passaram apenas pelo segundo processo descrito para as subamostras com extração de lipídio.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis de Washington State University(EUA) para a determinação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, por meio de um espectrômetro de massas de razão isotópica de fluxo contínuo (Delta PlusXP, Thermofinnigan, EUA). A razão (R) de dois isótopos estáveis, um pesado e um leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) foi quantificada nas amostras e expressa em relação àquela encontrada em um padrão internacionalmente aceito, com a notação delta (δ):

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ou } \delta^{15}\text{N} = ((R_{\text{amostra}} / R_{\text{padrão}}) - 1) \times 1000,$$

onde:

$X = ^{13}\text{C}$ ou ^{15}N e R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na amostra (R_{amostra}) ou no padrão ($R_{\text{padrão}}$). O padrão para o carbono é o Vienna Pee Dee Belemnite e o N_2 atmosférico para o nitrogênio. A precisão analítica, com base no desvio padrão de réplicas de padrões internos do laboratório foi $\leq 0,1\%$, tanto para $\delta^{13}\text{C}$ como para $\delta^{15}\text{N}$.

Análise estatística

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificados usando-se os testes Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para testar se houve diferença significativa nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e a razão C:N entre as amostras do mesmo tecido, com e sem extração de lipídio, os dados foram analisados através do teste t pareado, como nível de significância (α) de 0,05. Modelos de regressão linear simples foram utilizados para testar a relação entre $\Delta^{13}\text{C}$ (diferença entre valores de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras com e sem extração) e a razão C:N das amostras controle para músculo e pele. Todas as análises foram realizadas no ambiente estatístico R versão 3.1.3 (R Development Team 2013).

RESULTADOS

O CCC das tartarugas-verdes analisadas variaram entre 35 a 47 cm (média \pm DP: $34,7 \pm 20,9$ cm). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ no músculo foram significativamente maiores nas amostras controles do que nas com extração de lipídio (teste t pareado, $t = 6,2$, $p < 0,0001$). As diferenças da média de $\delta^{13}\text{C}$ entre as amostras controle e com extração lipídica ($\Delta^{13}\text{C}$) foi de $0,51\text{‰}$. Entretanto, essa diferença ocorreu devido a três amostras que mostraram um aumento de $>0,5\text{‰}$ após a extração de lipídio, enquanto o restante obteve alterações menores (i.e. $\Delta^{13}\text{C} < 0,5\text{‰}$) (Figura 1). As amostras de pele não mostraram diferenças entre os tratamentos (teste t pareado, $t = 0,88$, $p = 0,39$), com $\Delta^{13}\text{C}$ de $0,09\text{‰}$ (Figura 1, Tabela 1). Nenhuma regressão entre a razão C:N das

amostras controle e $\Delta^{13}\text{C}$ para o músculo e para a pele foram significantes ($R_1 = 0,06$, $p = 0,38$; $R_2 = 0,05$, $p=0,40$, para músculo e pele, respectivamente).

A extração de lipídeos não possuiu efeito significativo nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de ambos os tecidos (teste t pareado, $t= 1,7$; $p = 0,11$ e, $t= 1,05$; $p = 0,31$ para músculo e pele, respectivamente) (Tabela 1). A diferença média entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das amostras controle e com tratamento ($\Delta^{15}\text{N}$) foi $0,38\text{‰}$ e $0,16\text{‰}$ para músculo e pele, respectivamente. A extração de lipídios modificou significativamente os valores da razão C:N para as amostras de músculo (teste t pareado, $t = 3,46$, $p < 0,05$) mas não houve alteração para os valores de C:N para a pele (teste t pareado, $t = 2,09$, $p = 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 2.1. Valores isotópicos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$ em ‰) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$ em ‰) e razão C:N de músculo e pele das tartarugas-verdes, *Chelonia mydas*. São indicados a média \pm DP e valores mínimos e máximos para as amostras controle (sem extração lipídica) e com extração de lipídios.

Tratamento	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			C:N		
	Média \pm DP	Mín	Máx	Média \pm DP	Min	Máx	Média \pm DP	Mín	Máx
Com extração									
Músculo	-17,2 \pm 0,9	-18,4	-15,5	11,7 \pm 1,2	9,2	14,3	3,1 \pm 0,1	2,7	3,2
Pele	-15,2 \pm 0,6	-16,2	-14,4	12,0 \pm 0,9	10,3	13,6	2,8 \pm 0,1	2,6	3,0
Controle									
Músculo	-17,7 \pm 0,8	-18,7	-16,2	11,3 \pm 1,4	8,4	13,5	3,2 \pm 0,1	3,2	3,5
Pele	-15,3 \pm 0,6	-16,1	-14,2	11,9 \pm 1,1	9,4	13,2	2,9 \pm 0,1	2,8	3,2

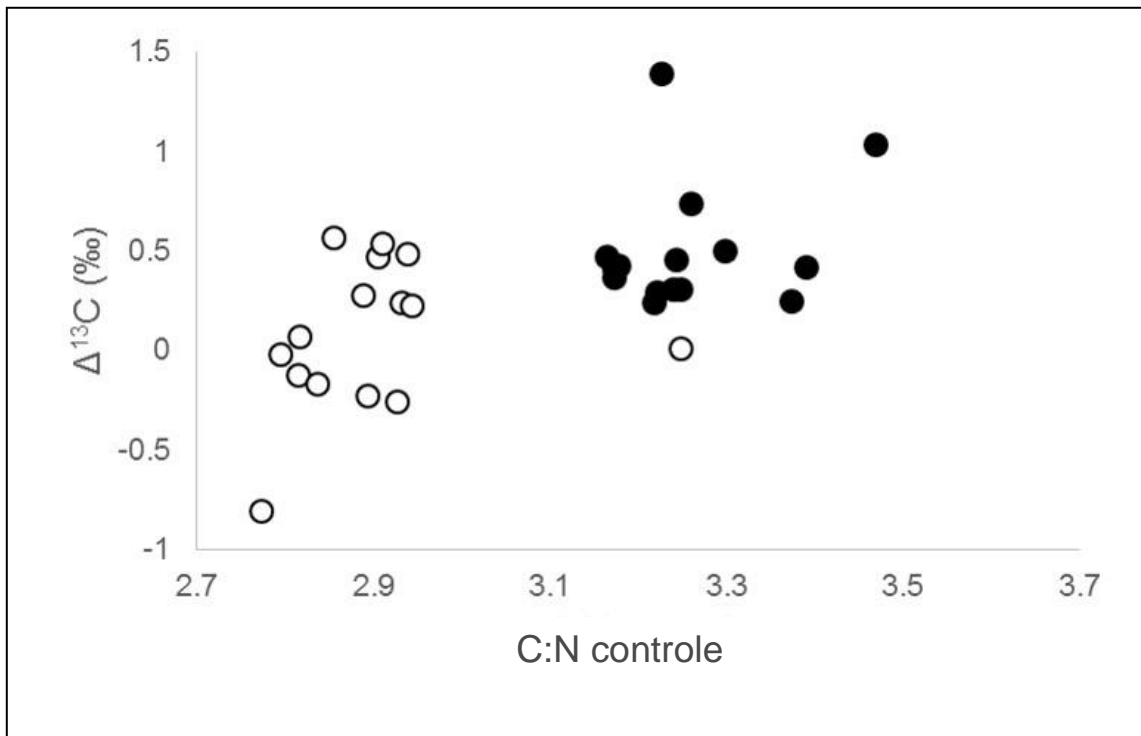


Figura 2.1. Relação entre a diferença entre os valores isotópicos de carbono ($\Delta^{13}\text{C}$) das amostras controle e com extração de lipídios para a pele (círculos abertos) e músculo (círculos pretos) e a razão C:N das amostras controle.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a extração de lipídios com a solução clorofórmio-metanol (2:1) não causou enriquecimento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ na pele de juvenis de tartaruga-verde. Por outro lado, um pequeno, mas significativo aumento de aproximadamente 0,5‰ foi encontrado entre as amostras com e sem extração de lipídios de músculo. Embora a extração de lipídios tenha reduzido significativamente a razão C:N de músculo, nenhuma relação foi encontrada entre os valores de $\Delta^{13}\text{C}$ e C:N das amostras controle.

A diferença entre os valores isotópicos dos consumidores e das presas, chamado de fator de discriminação isotópica (Martinez del Rio et al. 2009), é geralmente de ~1‰ para valores de $\delta^{13}\text{C}$ no músculo (DeNiro & Epstein 1978, Tieszen et al. 1983, Hobson et al. 1996, Roth & Hobson 2015). Dessa forma, a diferença de ~0,5‰ nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados no presente trabalho pode não ser biologicamente significativo. No entanto, algumas amostras (ver Figura 2.1) mostraram aumento nos valores isotópicos de carbono superior a 0,5‰ após a extração de lipídios, assim, é necessária atenção na decisão sobre a necessidade de extração de lipídios, principalmente quando o número amostral é baixo, podendo incluir alguns *outliers*. Lesage et al. (2010) calculou o erro predito da contribuição da presa através de modelos de mistura bayesianos para isótopos estáveis, descobrindo que um erro de 0,5‰ devido ao tratamento dos tecidos dos consumidores pode resultar em um considerável viés dependendo do grau de distinção dos membros finais do modelo de mistura. Assim, embora pequenos valores de $\Delta^{13}\text{C}$ foram encontrados no

músculo de juvenis de *C. mydas*, recomenda-se testar o efeito da extração de lipídios ao usar $\delta^{13}\text{C}$ para estimar a proporção da dieta através de modelos de mistura bayesiano.

Um método amplamente utilizado para prever a necessidade de extração de lipídios é através da razão C:N (e.g. e.g. Sweeting et al. 2006, Ehrich et al. 2011), onde valores $> 3,5$ são indicadores de níveis de conteúdo lipídico que podem alterar significativamente os valores dos isótopos de carbono (Post et al. 2007). No presente estudo, embora as médias de C:N da pele e do músculo foram $< 3,5$, a extração lipídica aumentou significativamente os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e diminuiu a razão C:N para o músculo. Resultados similares foram encontrados para úmero da tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) onde as amostras mostraram que a média da razão C:N de 3,1‰ alterou para $\sim 1,5$ ‰ após o tratamento da amostra com a extração, concluindo que os valores da razão C:N pode não ser preciso para prever o conteúdo de lipídio da amostras (Medeiros et al. 2015). Do mesmo modo, o motivo para utilizar a razão C:N como indicador de lipídios tem sido discutido por diversos estudos onde os tecidos com diferentes proporções de lipídios mostraram uma razão C:N similar (Kiljunen et al. 2006, Ruiz-Cooley et al. 2011, Fagan et al. 2011, Ryan et al. 2012). Esta conclusão também tem importância para a maioria dos modelos de normalização dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (e.g. McConnaughey & McRoy 1979, Post et al. 2007). Portanto, é necessário atenção para a utilização dos modelos matemáticos que utilizam a razão C:N como parâmetro para calcular os valores de $\delta^{13}\text{C}$ livres de lipídios.

Valores isotópicos de nitrogênio não mostraram diferença significativa após a extração lipídica. Esse resultado encontrado foi semelhante para o osso da tartaruga-cabeçuda (Medeiros et al. 2015), uma variedade de outros consumidores aquáticos (Ingram et al. 2007, Ricca et al. 2007). No entanto, em outros estudos, uma alteração nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ foi observada (Bodin et al. 2007, Logan et al. 2008, Lesage et al. 2010, Ruiz-Cooley et al. 2011), sendo associada à extração de componentes lipoproteicos que possuem baixa quantidade de nitrogênio e ligação das proteínas com componentes estruturais lipídicos polares (Bodin et al. 2007, Ruiz-Cooley et al. 2011). Devido a estes inconsistentes efeitos da extração de lipídios nos valores de $\delta^{15}\text{N}$, é recomendada a preparação separada de amostras para a análise isotópica de carbono e nitrogênio (e.g. Post et al. 2007, Kojadinovic et al. 2008), dobrando, infelizmente, o tempo de processamento e o custo laboratorial. Todavia, os nossos resultados mostraram que não há necessidade de preocupação com os efeitos indesejados sobre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ quando são analisados a pele e o músculo de tartarugas-verdes juvenis utilizando o solvente clorofórmio-metanol.

Tanto os baixos valores da razão C:N quanto a ausência da extração de lipídios nos valores isotópicos de carbono relatados por este estudo, mostraram que não há a necessidade de extração de lipídios na pele das tartarugas-verdes juvenis. Entretanto, esta recomendação pode não ser válida para outras fases do ciclo de vida de *C. mydas*. O conteúdo de lipídio em fêmeas de tartarugas-verdes adultas durante a fase reprodutiva sofre um aumento nas camadas subcutâneas e nos órgãos para a manutenção do metabolismo durante a vitelogênese e cortejo (Hamann et al. 2002). Esses autores

observaram que a concentração de triglicerídeos no plasma diminui na idade não reprodutiva e aumenta no início da vitelogênese e cortejo. Assim, os resultados aqui apresentados podem não ser aplicáveis para a análise de isótopos estáveis de pele das tartarugas marinhas em outras fases de desenvolvimento, sendo recomendáveis testes de extração de lipídios para esses grupos.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a razão C:N de músculos de *C. mydas* juvenis não são preditores acurados para o conteúdo lipídico. Além disso, as diferenças encontradas nos valores de...entre as amostras controle e com tratamento podem ser biologicamente significativas. Por outro lado, a extração de lipídios para amostras de pele não é necessária no caso de juvenis da espécie, porém este procedimento precisa ser testado em outras fases de desenvolvimento da tartaruga-verde.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da ausência de substratos natural para o crescimento de macroalgas, o substrato artificial molhes da barra de Rio Grande fornece substrato para o assentamento das macroalgas e conseqüentemente, torna-se um local importante para a alimentação de *C. mydas*. As algas vermelhas tiveram grandes contribuições nutritivas para a dieta da espécie, como observamos através dos resultados da análise isotópica e do conteúdo dos tratos gastrointestinais.

Todavia, devido ao reduzido número amostral dos tratos analisados no presente trabalho, os resultados podem ser enviesados, levando-se em conta trabalhos anteriores onde *C. mydas* foi tida como generalista. Dessa maneira, um maior número amostral se faz necessário para entender a ecologia alimentar da tartaruga-verde do extremo sul do Brasil.

Em relação ao que foi observado através das extrações de lipídeos, esse passo não se faz necessário para os dois tecidos analisados (pele e músculo) de *Chelonia mydas*, já que não houve alterações nos valores isotópicos de carbono e de nitrogênio após a extração dos lipídeos. Isso se deu, provavelmente, devido ao baixo conteúdo lipídico encontrados nesses dois tecidos em indivíduos juvenis da espécie, porém a metodologia precisa ser testada em outras fases de vida da tartaruga-verde.

REFERÊNCIAS

- AMOROCHO, DF & RD REINA. 2008. Intake passage time, digesta composition and digestibility in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*) at Gorgona National Park, Colombian Pacific. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360: 117-124.
- ARTHUR, KE & GH BALAZS. 2008. A comparison of immature green turtle (*Chelonia mydas*) diets among seven sites in the main Hawaiian Islands. *Pacific Science*, 62: 205–217.
- ARTHUR, KE, MC BOYLE & CJ LIMPUS. 2008. Ontogenetic changes in diet and habitat use in green sea turtle (*Chelonia mydas*) life history. *Marine Ecology Progress Series*, 362: 303–311.
- ARTHUR, KE, MC BOYLE & CJ LIMPUS. 2008. Ontogenetic changes in green sea turtle (*Chelonia mydas*) foraging behaviour as demonstrated by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 362: 303–311.
- AVENS, L, GOSHE LR, PAJUELO M, BJORNDAL KA, MACDONALD BD, LEMONS GE, BOLTEN AB & SEMINOFF JA. 2013. Complementary skeletochronology and stable isotope analyses offer new insight into juvenile loggerhead sea turtle oceanic stage duration and growth dynamics. *Marine Ecology Progress Series*, 491: 235.
- BAPTISTA, LRM. 1974. Flora Marinha de Torres. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pp. 277.

- BARROS, JA. 2007. Ecologia alimentar da tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) no extremo sul do Brasil. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 67pp.
- BEST, PB & SCHELL DM. 1996. Stable isotopes in southern right whale (*Eubalaena australis*) baleen as indicators of seasonal movements, feeding and growth. *Marine Biology*, 124: 483-494.
- BJORNDAL, KA. 1980. Nutritional and grazing behavior of the green turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*, 56: 147-154.
- BJORNDAL, KA. 1997. Foraging Ecology and Nutricional of sea turtles. In: Kennish, M J, Lutz PL. *The Biology of Sea Turtles*, pp. 199-215.
- BODIN, F, LE LOC'H & C HILY. 2007. Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustacean tissues. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 341: 168-175.
- BOLTEN, AB. 1999. Techniques for measuring sea turtles. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds) Research and management techniques for the conservation of sea turtles. Publication No. 4. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, Washington, DC, p 1-5
- BOYLE, MC & CJ LIMPUS. 2008. The stomach contents of post-hatchling green and loggerhead sea turtles in the southwest Pacific: An insight into habitat association. *Marine Biology*, 155: 233-241.
- BRAND-GARDNER, SJ, JM LANYON & CJ LIMPUS. 1999. Diet selection by immature green turtles, *Chelonia mydas*, in subtropical Moreton Bay, south-east Queensland. *Australian Journal of Zoology*, 47: 181-191.

- BUGONI, L, L KRAUSE & MV PETRY. 2003. Diet of Sea Turtles in Southern Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, 4: 685-688.
- CAMPOS, EJD, AR PIOLA, RP MATANO & JL MILLER. 2008. Plata: A synoptic characterization the southwest Atlantic shelf under influence of the Plata River and Patos Lagoon outflows. *Continental shelf Research*, 28: 1551-1555.
- CAPITOLI, R. 1998. Substratos consolidados. In: U. Seeliger, C. Odebrecht e J.P. Castello (Eds.). Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil. Ecoscientia, Rio Grande, pp. 96-101.
- CARDONA, L, A AGUILAR & L PAZOS. 2009. Delayed ontogenic dietary shift and high levels of omnivory in green turtles (*Chelonia mydas*) from the NW coast of Africa. *Marine Biology*, 156: 1487–1495.
- CARDONA, L, P CAMPOS, Y LEVY, A DEMETROPOULOS & D MARGARITOUULIS. 2010. Asynchrony between dietary and nutritional shifts during the ontogeny of green turtles (*Chelonia mydas*) in the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 393: 83–89.
- CARLISLE, AB, KJ GOLDMAN, SY LITVIN, DJ MADIGAN, JS BIGMAN, AM SWITHEBANK, JR KLINE & BA BLOCK. 2015. Stable isotope analysis of vertebrae reveals ontogenetic changes in habitat in an endothermic pelagic shark. *The Royal Society*. Disponível em: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1799/20141446>.
- CARMAN, VG, F BOTTO, E GAITÁN, D ALBAREDA, C CAMPAGNA & H MIANZAN. 2014. A jellyfish diet for the herbivorous green turtle

- Chelonia mydas* in the temperate SW Atlantic. *Marine Biology*, 161: 339-349.
- CARMAN, VG, V FALABELLA, S MAXWELL, D ALBAREDA, C CAMPAGNA & H MIANZAN. 2012. Revisiting the ontogenetic shift paradigm: The case of juvenile green turtles in the SW Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 429: 64–72.
- CARRIÓN-CORTEZ, JA, P ZÁRATE & JA SEMINOFF. 2010. Feeding ecology of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in the Galapagos Islands. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90: 1005–1013.
- CAUT, S, E GUIRLET, E ÂNGULO, K DAS & M GIRONDOT. 2008. Isotope Analysis Reveals Foraging Area Dichotomy for Atlantic Leatherback Turtles. *Plos One*, 3: e1845
- CAUT, S. 2013. Isotope incorporation in broad-snouted caimans (crocodilians). *Biology Open*. 1-6.
- CEPERG/IBAMA. 2001. Desembarque de pescados no Rio Grande do Sul, ano 2000. CEPERG/IBAMA, Rio Grande.
- CHEREL, Y, KA HOBSON & H WEIMERSKIRCH. 2005. Using stable isotopes to study resource acquisition and allocation in procellariiform seabirds. *Oecologia*, 145: 533–540.
- CHEREL, Y, S JAQUEMET, A MAGLIO & A JAEGER. 2014. Differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values between feathers and blood of seabird chicks: implications for non-invasive isotopic investigations. *Marine Biology*. 161: 229-237.

- CLEMENTZ, MT, PL KOCH, & CA BECK. 2007. Diet induced differences in carbon isotope fractionation between sirenians and terrestrial ungulates. *Marine Biology*, 151: 1773-1784.
- COPERTINO, MS & U SEELIGER. 2010. Hábitats de *Ruppia maritima* e de Macroalgas. Em: O Estuário da Lagoa dos Patos. Um século de Transformações, Cap. 8: 91-100.
- COUTINHO, R & IR ZALMON. 2009. Os bentos de costões rochosos. In: PEREIRA, RC & A SOARES-GOMES (org.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro, Interciência, Cap. 11: 281-297.
- COUTINHO, R & U SEELIGER. 1986. Seasonal occurrence and growth of benthic algae in the Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 23: 889-900.
- COUTINHO, R. 1982. Taxonomia, distribuição, crescimento temporal, reprodução e biomassa de algas bentônicas no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 232 p.
- D'AMBRA, I., RH CARMICHAEL & WM GRAHAM. 2014. Determination of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ and trophic fractionation in jellyfish: implications for food web ecology. *Marine Biology*, 161: 473-480.
- DALERUM, F & A ANGERBJÖRN. 2005. Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia*, 144: 647–658.
- DEHN, LA, GG SHEFFIELD, EH FOLLMANN, LK DUFFY, DL THOMAS & TM O'HARA. 2007. Feeding ecology of phocid seals and some walrus in

- the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30: 167-181.
- DENIRO, MJ & S EPSTEIN. 1977. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197: 261-263.
- DENIRO, MJ & S EPSTEIN. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 42: 495-506.
- DENIRO, MJ & S EPSTEIN. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 341-351.
- DODGE, KL, JM LOGAN & ME LUTCAVAGE. 2011. Foraging ecology of leatherback sea turtles in the Western North Atlantic determined through multi-tissue stable isotope analyses. *Marine Biology*, 158: 2813–2824
- DOYLE, TK, JDR HOUGHTON, R MCDEVITT, J DAVENPORT & GC HAYS. 2007. The energy density of jellyfish: estimates from bomb-calorimetry and proximate-composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343: 239–252.
- DRAGO, M, V FRANCO-TRECU, L ZENTENO, D SZTEREN, EA CRESPO, FG RIET SAPRIZA, R MACHADO, P INCHAUSTI & PL CARDONA. 2015. Sexual foraging segregation in South American sea lions increases during the pre-breeding period in the La Plata River plume. *Marine Ecology Progress Sereries*, 525: 261-272.
- EHRICH, D, A TARROUX, J STIEN, N LECOMTE, S KILLENGREEN, D BERTEAUX & NG YOCCOZ. 2011. Stable isotope analysis: modelling

- lipid normalization for muscle and eggs from arctic mammals and birds. *Methods Ecol Evol* 2: 66-76.
- ELLIOTT, KH, M DAVIS & JE ELLIOTT. 2014. Equations for lipid normalization of carbon stable isotope ratios in aquatic bird eggs. *Plos One*, 9: e83597.
- FAGAN, KA, MA KOOPS, MT ARTS & M POWER. 2011. Assessing the utility of C:N ratios for predicting lipid content in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 68: 734-385.
- FAGAN, KA, MA KOOPS, MT ARTS, M POWER. 2011. Assessing the utility of C: N ratios for predicting lipid content in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 68: 374–385.
- FARAWAY, JJ. 2006. Extending the Linear Model with R: Generalized Linear, Mixed Effects and Nonparametric Regression Models. Chapman & Hall/ CRC.
- FERREIRA, MM. 1968. Sobre a alimentação da Aruanã, *Chelonia mydas* (Linnaeus), ao longo da costa do Estado do Ceará. *Arq Est Biol Mar Universidade Federal do Ceará.*, 8: 83–86
- FOLCH, J, M LEES & GHS STANLEY. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–50.
- FRICK, MG, KL WILLIAMS, DX VELJACIC, JA JACKSON & SE KNIGHT. 2002. Epibiont Community Succession on Nesting Loggerhead Sea Turtles, *Caretta caretta* from Georgia, USA. *Science*, 64: 280-282.
- FRY, B. 2006. Stable isotope ecology. *Springer.*, New York, NY.

- GANDRA, TBR. 2005. Elaboração de um SIG (SITARS) para os encalhes e capturas incidentais de tartarugas marinhas no Rio Grande do Sul. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande. 26-28 pp.
- GANNES, L, DM O'BRIEN, C MARTÍNEZ-DEL-RIO. 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, 78: 1271–1276.
- GUEBERT-BARTHOLO, FM, M BARLETTA, MF COSTA & ELA MONTEIRO-FILHO. 2011. Using gut contents to assess foraging patterns of juvenile green turtles *Chelonia mydas* in the Paranaguá Estuary, Brazil. *Endangered Species Research*, 13: 131–143.
- HAHN, S., BJ HOYE, H KORTHALS & M KLAASSEN. 2012. From food to offspring down: tissue-specific discrimination and turn-over of stable isotopes in herbivorous waterbirds and other avian foraging guilds. *Plos One*, 7: e30242.
- HAMANN, M, CJ LIMPUS & JM WHITTIER. 2002. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Journal of Comparative Physiology B*, 172: 485–493.
- HOBSON, KA, DM SCHELL, D RENOUF & E NOSEWORTHY. 1996. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissues of captive seals: implications for dietary reconstructions involving marine mammals. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 53: 528-533.
- HOBSON, KA. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314–326

- HOBSON, KA. 2005. Using stable isotopes to trace long distance dispersal in birds and other taxa. *Diversity Distribution*. 11: 157–164.
- HORTA, PA, F BUCCHMANN, AT DE SOUZA & EC OLIVEIRAS. 2008. Macroalgas do Parcel do Carpinteiro- com a adição de *Rhodymenia delicatula* (Rhodophyta) à flora. *Revista de Botânica*, 37- 53.
- HUGHES, GR. 1974. The sea turtles of south-east Africa II. The biology of the Tongaland loggerhead turtle *Caretta caretta* L. with comments on the leatherback turtle *Dermochelys coriacea* L. and the green turtle *Chelonia mydas* L. in the study region. Oceanography Research Institute, Durban, South Africa, *Investigative Report*. 36: 1–96.
- HURD, CL, PJ HARRISON, K BISHOF & CS LOBBAN. 2014. *Seaweed Ecology and Physiology*. Second Edition. Cambridge, Cambridge University Press.
- HUSSEY, NE, JA OLIN, MJ KINNEY, BC McMEANS & AT, FISK. 2012. Lipid extraction effects on stable isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of elasmobranch muscle tissue. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 7-15.
- ICMBIO, 2014. Lista de espécies ameaçadas. Instituto Chico Mendes. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>, acessado em 07/07/2015.
- INGRAM, T, B MATTHEWS, C HARROD, T STEPHENS, J GREY, R MARKE & A MAZUMDER. 2007. Lipid extraction has little effect on the $\delta^{15}\text{N}$ of aquatic consumers. *Limnology Oceanograph-Meth*, 5: 338-342.

- IUCN. 2004. Red list of threatened animals. International Union for Conservation of Nature. <http://www.redlist.org>, acessado em 07/07/2015.
- JAMES, TT & JA SEMINOFF. 2013. Feeding Biology: Advances from Field-Based Observations, Physiological Studies, and Molecular Techniques. In: *The Biology of Sea Turtles*. Vol 3. pp. 132- 237.
- JEPSEN, DM & KO WINEMILLER. 2002. Structure of tropical river food webs revealed by stable isotope ratios. *Oikos*, 96: 46–55.
- KELLY, JF. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 78: 1–27.
- KILJUNEN, M, J GREY, T SINISALO, C HARROD, H IMMONEN & RI JONES. 2006. A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models. *Journal of Applied Ecology*, 43: 1213-1222.
- KILJUNEN, M, J GREY, T SINISALO, C HARROD, H IMMONEN, RI JONES. 2006. A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models. *Journal of Applied Ecology*, 43: 1213–1222.
- KJERFVE, B. 1986. Comparative oceanography of coastal lagoons. In: Wolfe DA. *Estuarine variability*. Academic Press, pp. 63-81
- KOJADINOVIC J, P RICJARD, M LE CORRE & P BUSTAMANTE. 2008. Effects of lipid extraction on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in seabirds muscle, liver and feathers. *Waterbirds*. 31: 169–178.

- LAZAR, B, R GRACAN, J KATIC, D ZAVODNIK, A JAKLIN & N TVRTKOVIC. 2010. Loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) as bioturbators in neritic habitats: an insight through the analysis of benthic molluscs in the diet. *Marine Ecology*, 32: 65-74.
- LEMONS, G, R LEWISON, L KOMOROSKE, A GAOS, C LAI, P DUTTON, T EGUCHI, R LEROUX & JA SEMINOFF. 2011. Trophic ecology of green sea turtles in a highly urbanized bay: Insights from stable isotopes and mixing models. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405: 25–32.
- LESAGE, V, Y MORIN, E RIOUX, C POMERLEAU, SH FERGUSON & E PELLETIER. 2010. Stable isotopes and trace elements as indicators of diet and habitat use in cetaceans: predicting errors related to preservation, lipid extraction, and lipid normalization. *Marine Ecology Progress Series*, 419: 249–26.
- LOGAN, JM, TD JARDINE, TJ MILLER, SE BUNN, RA CUNJAK & ME LUTCAVAGE. 2008. Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: comparison of chemical extraction and modelling methods. *Journal Animal Ecology*, 77: 838–846.
- LÓPEZ-MENDILAHARSU, M, A ESTRADES, MN CARACCIO, V CALVO, M HERNÁNDEZ & V QUIRICI. 2006. Biología, ecología y etología de las tortugas marinas en la zona costera uruguaya. In: Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, Conde D (eds) Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Vida Silvestre Uruguay, Montevideo, pp 247–257.

- LOPEZ-MENDILAHARSU, M, SC GARDNER, JA SEMINOFF & R RIOSMENA-RODRIGUEZ. 2005. Identifying critical foraging habitats of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific coast of the Baja California peninsula, Mexico. *Aquatic Conservation*, 15: 259–269.
- MÁRQUEZ, R. 1990. FAO Species Catalogue. Vol. 11: Sea turtles of the world, an annotated and illustrated catalogue of sea turtles known to date. FAO, Rome. Meylan, A. B., e P. A. Meylan. 1999. Introduction to the evolution, life history, and biology of sea turtles. Páginas 3-5 in K. L. Eckert, K. A. Bjorndal, F. A. Abreugrobois e M. Donnelly (Eds.). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication.
- MARTÍNEZ DEL RIO, C, N WOLF, SA CARLETON & LZ GANNES. 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biology Review*, 84: 91-111.
- MCCLELLAN, CM, BRAUN-MCNEILL J, AVENS L, WALLACE BP& READ AJ. 2010. Stable isotopes confirm a foraging dichotomy in juvenile loggerhead sea turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 387: 44–51.
- MCCONNAUGHEY, T & CP MCROY. 1979. Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Marine Biology*, 53: 257–262.
- MCCUTCHAN, JH, WM LEWIS, C KENDALL & CC MCGRATH. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos*, 102: 378–390.

- MCDERMID, KJ, B STUERCKE & GH BALAZS. 2007. Nutritional composition of marine plants in the diet of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in the Hawaiian Islands. *Bulletin of Marine Science*, 81: 55–71.
- MEDEIROS, L, DS MONTEIRO, R PETITET & L BUGONI. 2015. Effects of lipid extraction on the isotope values of sea turtle bone collagen. *Aquatic Biology*, 23: 191-199.
- MEYLAN, AB & PA MEYLAN. 1999. Introduction to the evolution, life history and biology of sea turtles. In: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois e M. Donnelly (eds.). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4., p. 3- 5.
- MINAGAWA, M, E, WADA. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 48: 1135-1140.
- MONTEIRO, DS, SC ESTIMA, SP JUNQUEIRA, L BUGONI & TBR GANDRA. 2005. Ocorrência de *Chelonia mydas* e interação com a pesca artesanal no interior do estuário da Lagoa dos Patos–RS. Livro de resumos da II Jornada de Conservação e Pesquisa de Tartarugas Marinhas do Atlântico Sul Ocidental. p.68–71.
- MONTEIRO, DS. 2004. Encalhes e Interação de Tartarugas Marinhas com a Pesca no Litoral Sul do Rio Grande do Sul. Monografia de Ciências Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG.
- NAGAOKA, SM, AS MARTINS, RG DOS SANTOS, MMP TOGNELLA, EC DE OLIVEIRA FILHO & JA SEMINOFF. 2012. Diet of juvenile green turtles

- (*Chelonia mydas*) associating with artisanal fishing traps in a subtropical estuary in Brazil. *Marine Biology*, 159: 573-581.
- NAKASHIMA SB. 2008. Dieta da tartaruga-verde *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758 (Testudines, Cheloniidae) no litoral norte do Rio Grande do Sul. Tese de mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1990. Decline of sea turtles: causes and prevention. National Research Council. *Academy Press*, pp. 259.
- ORAVETZ, CA. 1999. Reducing incidental catch in fisheries. Research and management techniques for the conservation of sea turtles. IUCN/SSC *Marine Turtle Specialist Group Publication*, 4: 189-193.
- PARNELL, A & A JACKSON. 2013. siar: Stable Isotope Analysis in R. R package version 4.2. <http://CRAN.R-project.org/package=siar>.
- PARNELL, AC, R INGER, S BEARHOP & AL JACKSON. 2010. Source Partitioning Using Stable Isotopes: Coping with too much variation. *Plos One*, 5: e9672.
- PETERSON, BJ & FRY B. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18:2 93–320.
- PETERSON, BJ. 1999. Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: a review. *Acta Oecologica*, 20: 479-487.
- PHILLIPS, DL & PM ELDRIDGE. 2006. Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia*, 147: 195-203.

- PHILLIPS, DL. & JW GREGG. 2001. Uncertainty in source partitioning using stable isotopes. *Oecologia*, 127: 171–179.
- PHILLIPS, DL. 2012. Converting isotope values to diet composition: the use of mixing models. *Journal of Mammalogy*. 93:342–352.
- PINEDO, MC & T POLACHECK. 2004. Sea turtle by-catch in pelagic longline sets off southern Brazil. *Biological Conservation*. 119: 335-339.
- PINEDO, MC., RR CAPITOLI, AS BARRETO & A ANDRADE. 1996. Occurrence and feeding of sea turtles in southern Brazil. Sea Turtle Symposium pg 51, Hilton Head, SC, EUA.
- PIOLA, AR, EJD CAMPOS, OO MÖLLER Jr., M CHARO & CM MARTINEZ. 2000. Subtropical shelf front off eastern South America. *Journal of Geophysical Research*, 105: 6566-6578.
- PIVEL, MAG. 2009. Reconstrução da hidrografia superficial do Atlântico Sul Ocidental desde o Último Máximo Glacial a partir do estudo de foraminíferos planctônicos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 162p.
- POST, DM, CA LAYMAN, DA ARRINGTON, G TAKIMOTO, J QUATTROCHI & CG MONTAÑA. 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152: 179–189.
- POST, DM. 2002. Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position: Models, Methods, and Assumptions. *Ecology*, 83: 703–718.
- PROIETTI, MC, JW REISSER, PG KINAS, R KERR, DS MONTEIRO, LF MARINS & ER SECCHI. 2012. Green turtle *Chelonia mydas* mixed

- stocks in the western South Atlantic, as revealed by mtDNA haplotypes and drifter trajectories. *Marine Ecology Progress Series*, 447: 195-209.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. www.R-project.org/
- REICH, KJ, KA BJORN DAL & AB BOLTEN. 2007. The “lost years” of green turtles: using stable isotopes to study cryptic lifestages. *Biology Letters*, 3: 712-714.
- REICH, KJ, KA BJORN DAL & CM DEL RIO. 2008. Effects of growth and tissue type on the kinetics of ¹³C and ¹⁵N incorporation in a rapidly growing ectotherm. *Oecologia*, 155: 651-663.
- REISSER, J, M PROIETTI, I SAZIMA, P KINAS, P HORTA & E SECCHI. 2013. Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. *Marine Biology*, 160: 3169-3179.
- REVELLES, M, L CARDONA, A AGUILAR, A BORRELL, F GLORIA & M SAN FÉLIX. 2007. Stable C and N isotope concentration in several tissues of the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* from the western Mediterranean and dietary implications. *Scientia Marina*, 71: 87-93.
- RICCA, MA, AK MILES, RG ANTHONY, X DENG & SSO HUNG. 2007. Effect of lipid extraction on analyses of stable carbon and stable nitrogen isotopes in coastal organisms of the Aleutian archipelago. *Canadian Journal of Zoology*, 85: 40-48.
- ROTH, JD & KA HOBSON. 2000. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 848-852.

- RUIZ-COOLEY, RI, KY GARCIA & ED HETHERINGTON. 2011. Effects of lipid removal and preservatives on carbon and nitrogen isotope ratios on squid tissues: Implications for ecological studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407: 101-107.
- RYAN, C, B MCHUGH, CN TRUEMAN, C HARROD, SD BERROW & I O'CONNOR. 2012. Accounting for the effects of lipids in stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) analysis of skin and blubber of balaenopterid whales. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 26: 2745-2754.
- SALMON, M, TT. JONES & K HORCH. 2004. Ontogeny of diving and feeding behavior in juvenile sea turtles: A comparison study of green turtles (*Chelonia mydas* L.) and leatherbacks (*Dermochelys coriacea* L.) in the Florida current. *Journal of Herpetology*, 38: 36–43.
- SANTOS, RG, AS MARTINS, J DA NOBREGA FARIAS, PA HORTA, HT PINHEIRO, E TOREZANI, C BAPTISTOTTE, JA SEMINOFF, GH BALAZS & TM WORK. 2011. Coastal habitat degradation and green sea turtle diets in Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1297-1302.
- SANTOS, RG, AS MARTINS, MB BATISTA & PA HORTA, 2015. Regional and local factors determining green turtle *Chelonia mydas* foraging relationships with the environment. *Marine Ecology Progress Series*, 529: 265-277.
- SAZIMA, I & M SAZIMA. 1983. Aspectos de comportamento alimentar e dieta da tartaruga marinha, *Chelonia mydas*, no Litoral Norte Paulista. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 32: 199-203.

- SEMINOFF, JA, A RESENDIZ & WJ NICHOLS. 2002. Diet of East Pacific Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Central Gulf of California, México. *Journal of Herpetology*, 36: 447–453.
- SEMINOFF, JA, KA BJORNDAL & AB BOLTEN. 2007. Stable Carbon and Nitrogen Isotope Discrimination and Turnover in Pond Sliders *Trachemys scripta*: Insights for Trophic Study of Freshwater Turtles. *Copeia*, 3: 534-542.
- SEMINOFF, JA, TT JONES & GJ MARSHALL. 2006. Underwater behavior of green turtles monitored with video-time-depth recorders: What's missing from dive profiles? *Marine Ecology Progress Series*. 322:269–280.
- SIGMAN, DM, KL KARSH & KL CASCIOTTI. 2009. Ocean process tracers: nitrogen isotopes in the ocean. *Encyclopedia of ocean science, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam*.
- SOTIROPOULOS, MA, WN TONN & LI WASSENAAR. 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for foodweb studies. *Ecology of Freshwater. Fish*, 13: 155–160.
- STEIGLEDER, KM. 2015. Estrutura das Comunidades de Macroalgas no Mesolitoral Rochoso do Atlântico Sudoeste Central (26° S – 34° S). Tese. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande.
- SWEETING, CJ, NVC POLUNIN & S JENNINGS. 2006. Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. *Rapid Communication Mass Spectrometry*, 20: 595–601.

- THOMSON, JA, MR HEITHAUS, DA BURKHOLDER, JJ VAUDO, AJ WIRSING & LM DILL. 2012. Site specialists, diet generalists? Isotopic variation, site fidelity, and foraging by loggerhead turtles in Shark Bay, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 453: 84-96.
- TIESZEN, LL, TW BOUTTON, KG TESDAHL & NA SLADE. 1893. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*. 57: 32-37
- VANDER ZANDEN, HB, KA BJORNDAL & AB BOLTEN. 2013. Temporal consistency and individual specialization in resource use by green turtles in successive life stages. *Oecologia*, 173: 767-777.
- VANDER ZANDEN, HB, KA BJORNDAL, W MUSTIN, JM PONCIANO & AB BOLTEN. 2012. Inherent variation in stable isotope values and discrimination factors in two life stages of green turtles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 85: 431-441.
- VANDERKLIFT, A, S PONSARD. 2003. Sources of variation in consumer-diet ^{15}N enrichments: a meta-analysis. *Oecologia*, 136: 169–182
- WARD, AL. 1970. Stomach content and fecal analysis: methods of forage identification. *Range and Wildlife Habitat Evaluation*. 1147- 146.
- WILLIAMS, NC, KA BJORNDAL, MM LAMONT & RR CARTHY. 2014. Winter diets of immature green turtles (*Chelonia mydas*) on a northern feeding ground: integrating stomach contents and stable isotope analyses. *Estuaries and coasts*, 37: 986-994.
- WILSON, RM, JP CHANTON, BC BALMER & DP NOWACEK. 2014. An evaluation of lipid extraction techniques for interpretation of carbon and

nitrogen isotope values in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) skin tissue. *Marine Mammal Science*, 30: 85-103.

YURKOWSKI, DJ, NE HUSSEY, C SEMENIUK, SH FERGUSON & AT FISK.
2015. Effects of lipid extraction and the utility of lipid normalization models on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in Arctic marine mammal tissues. *Polar Biology*, 38: 131-143.