

**BIANCA DE SOUSA RANGEL**

**Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas histotróficas**

**Lipids and stable isotopes as indicators of maternal investment and neonatal nutritional strategies in histotrophic stingrays**

São Paulo

2018

BIANCA DE SOUSA RANGEL

**Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas histotróficas**

**Lipids and stable isotopes as indicators of maternal investment and neonatal nutritional strategies in histotrophic stingrays**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Coorientadora: Dra. Aline Dal'Olio Gomes

São Paulo

2018

## Ficha Catalográfica

---

Rangel, Bianca de Sousa

Lipídios e isótopos estáveis como indicadores de investimento materno e estratégias nutricionais neonatais em raias vivíparas histotróficas / Bianca de Sousa Rangel; Orientadora Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton; Coorientadora Dra. Aline Dal'Olio Gomes – São Paulo, 2018.

74 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Biomarcadores tróficos. 2. Rhinopterae. 3. Viviparidade. 4. Histotrofia lipídica. 5. Área de berçário. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

### Comissão Julgadora:

---

Profa. Dra. Carolina Arruda Freire

---

Profa. Dra. Gisele Akemi Oda

---

Profa. Dra. Cristiéle da Silva Ribeiro

---

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton  
Orientadora

À minha mãe Claudia,  
pelo amor e todo apoio e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai Mauro pelo sempre incentivo.

Aos elasmobrânquios, minha inspiração.

E a todos aos que se dedicam a fazer a diferença por eles.

Dedico.

*Cada sonho que você deixa para trás,  
é um pedaço do seu futuro que deixa de existir.*

Steve Jobs  
- Tradução livre -

## Agradecimentos

---

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora, profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton, por toda confiança depositada em mim e neste projeto desafiador, e pela oportunidade em desenvolvê-lo. Obrigada pela orientação, dedicação e paciência em todos os momentos. Por me mostrar como a fisiologia é ainda mais encantadora e apaixonante do que eu imaginava inicialmente. Agradeço imensamente por todo carinho, conhecimento compartilhado, pelas conversas, reuniões, comemorações e por você ser essa pessoa tão querida. Me sinto honrada e privilegiada em tê-la como orientadora (e amiga).

À minha coorientadora Dra. Aline Dal'Olio Gomes, por toda ajuda neste processo de 'ajuste' ao laboratório e aos ácidos graxos. Pelas horas de dedicação no laboratório e conhecimento compartilhado. Por todas as revisões, conversas e paciência nestes momentos. Obrigada pela sempre alegria e alto astral, orientação e por compartilhar comigo momentos de muitas risadas e de muito amor e fofurice com a Gio.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho através da bolsa de mestrado (2016/09095-2) e projeto Temático (2014/16320-7). Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral e ao Instituto de Biociências, e a todos os funcionários pela colaboração e ajuda. Em especial ao técnico Vagner Alberto, por toda ajuda no laboratório e auxílio nas entregas de amostras. Muito obrigada pela sempre disposição e ajuda. À secretária Roseli Santos, por ser sempre tão solícita em tirar todas as dúvidas.

Ao Prof. Dr. Luiz Martinelli do laboratório CENA na ESALQ-USP, pela parceria neste trabalho e pelas análises de isótopos estáveis. Agradeço também ao Prof. Dr. Plinio Barbosa de Camargo pela disposição e rapidez nas respostas e envio dos resultados, à técnica Fabiana Adorno por tirar dúvidas e ajuda na realização das análises de isótopos. À Profa. Dra. Rosalinda Carmela Montone e a amiga Daniela Maia, do IO-USP pela ajuda nas pesagens das amostras de isótopos.

Ao Prof. Dr. Nigel Hussey, da Universidade de Windsor, pela confiança, paciência, sempre atenção e pela parceria neste trabalho. Sinto-me muito honrada em tê-lo como colaborador neste e espero que em muitos outros trabalhos.

Aos professores do Departamento de Fisiologia do IB-USP pelos conhecimentos compartilhados, pelas disciplinas ministradas e inspiração para o estudo da fisiologia. Um agradecimento em especial ao Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes, que desde o início do

projeto auxiliou muito com conselhos e sugestões, aos professores doutores Gisele Akemi Oda, Carlos Navas e Silvia Cristina Ribeiro Souza.

Ao pescador Wesley Shkola pela grande parceria desde o início. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente pela confiança, por todo conhecimento compartilhado, pela ajuda em campo e pela oportunidade de vivenciar essa experiência incrível, que é a pesca artesanal. Obrigada ainda por todas as informações essenciais e muito preciosas das capturas diárias de raias e tubarões. Estendo este agradecimento a todos pescadores que participam da pesca, pela sempre ajuda e disposição, e muitas risadas, e ao mergulhador Jayson Huss, por nos apresentar ao Wesley.

Ao querido amigo e grande parceiro Alexandre Rodrigues. Obrigada por toda ajuda neste projeto, pelas muitas horas de discussões acadêmicas e conversas sobre a vida. Por estar sempre disposto a encarar os desafios e as ideias malucas. Por compartilhar momentos de alegria, de raiva, de angústias, chororôs, de horas de sol, calor, pelas jantãs e almoços com mijos e areia em alguns momentos. Obrigada pela sua participação e ajuda fundamental neste trabalho (e nos vários outros) e pela amizade nestes anos.

À família LAMEROA, Bruno Araujo, Bruno Marotta, Carlos Tolussi (Kadu), Cecília Bertacini, Diego Brito (Fraldinha), Ethiene Fernandes, Filipe Godoi, Gabriela Brambila (Gabi), Giovana Branco, Kainã Fagundes, João Paulo Silva, Joseane Silva, Marcela Muñoz, Maria Rojas, Raphaela Ribeiro, Renato Honji, Victor Marques, Victor Spandri, Victoria Frachetta, por terem me recebido desde o começo com muita dedicação e carinho, e terem contribuído de alguma forma para a concretização deste trabalho. Pelos momentos felizes e de muita alegria, pelos paredões, reuniões e conversas. Obrigada por tudo!

À prof. Dra. Cristiële Ribeiro da UNESP-Ilha Solteira, pela oportunidade de trabalhar paralelamente com as raias de água doce, pela parceria e por toda ajuda desde o início do mestrado. À Jumma Miranda e Douglas Ribeiro, pela parceria e coletas muito produtivas e divertidas. Agradeço imensamente todo conhecimento adquirido com vocês.

À amiga e grande parceira Dra. Vanessa Paes, pelas horas de discussões acadêmicas e conversas informações, por todo carinho, paciência e dedicação. Pela parceria nas coletas, pelas viagens, e trabalhos. Ao prof. Dr. Fausto Foresti pela confiança, carinho e parceria, por nos receber de braços abertos. À Giovana Ribeiro, Aisni Adachi, Bruno Campos e Pablo Oliveira pela parceria nos trabalhos e momentos de diversão. À Érica Serrano e Fabilene Paim pela ajuda nas coletas e conversas divertidas. E aos demais do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes. Obrigada a todos pela oportunidade da parceria com vocês.

À Dra. Cynthia Awruch e à Profa. Dra. Fabiana Lo Nostro, por toda dedicação, paciência, carinho e amizade. Pelas horas divertidas e por serem essas ‘ticas’ tão queridas que vocês são. Obrigada Cynthia pelos seus trabalhos inspiradores, que contribuíram muito para linha de pesquisa escolhida neste trabalho. À Dra. Heidi Pethybridge da Universidade da Tasmânia, pela ajuda com dúvidas sobre coletas, auxílio e atenção nos e-mails.

À Dra. Maria Lucia Góes Araujo, pela ajuda essencial no início deste trabalho, pela disposição, atenção e parceria. Estendo estes agradecimentos à Andressa Melo, minha querida Dra. Mariana Rêgo, Priscila Rocha, Leandro Augusto, da UFRPE, pela ajuda nas coletas de amostras em Pernambuco, pela parceria e amizade.

À amiga Andrielli Medeiros da UFPR, por todo conhecimento compartilhado, ajuda e parceria. Pela oportunidade de conhecer a maravilhosa Ilha das Peças e suas riquezas, incluindo as grandonas raias mantas. Ao pescador Neco da Ilha das Peças, pela ajuda nas coletas, hospedagem e todo conhecimento compartilhado.

Aos professores doutores da SBEEL Otto Gadig da UNESP-São Vicente, Fabio Hazin da UFRPE, Alberto Ferreira de Amorim do Instituto de Pesca, Claudio Sampaio da UFAL e Ricardo Rosa da UFPB, pela ajuda em diversos momentos. Aos colegas também da SBEEL, Ana Rita Onodera da UFPB, Dr. Tiego Costa da UFRN, Sibeles Mendonça da UFRPE e prof. Dr. Jones Santander da IFES. À minha querida amiga Aline Poscai da UNESP-São Vicente, pela sempre parceria, torcida e amizade, em todos os momentos.

Aos parceiros em trabalhos paralelos, à Dra. Rose Eli Grassi Rici e prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr da FMVZ-USP, à Dra. Natascha Wosnick e profa. Dra. Carolina Freire e Dr. Hugo Bornatowski da UFPR, à Dra. Paola Palacios-Barreto e aos professores Dr. Manuel Uribe-Alcocer e Dr. Píndaro Díaz-Jaimes da *Universidad Nacional Autónoma de México*, obrigada a todos pela confiança e parceria.

Ao prof. Dr. Neil Hammerschlag, do *Predator Ecology Lab* da Universidade de Miami pela parceria e confiança em trabalhos paralelos, e agora para o doutorado. Pela dedicação, orientação e atenção em todos os momentos. Obrigada pela inspiração com seus trabalhos e pesquisas desenvolvidas, eles tiveram uma contribuição enorme na escolha das metodologias deste trabalho, que foi a realização de um sonho.

À minha mãe e amiga Claudia Rangel, pelo amor, apoio e dedicação. Por sempre acreditar e incentivar as minhas ideias doidas, e pelos muitos momentos felizes. Não importa o tanto que eu escreva, será muito pouco para expressar o que você representa na minha vida. Amo muito você. MUITO OBRIGADA!



# Índice

---

<b>Lista de abreviações .....</b>	<b>09</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>10</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1. Lipídios e aspectos do metabolismo energético em elasmobrânquios ..	13
1.2. Isótopos estáveis e aplicação em estudos tróficos .....	17
1.3. Fase neonatal em elasmobrânquios .....	18
1.4. Aspectos gerais das raias <i>Rhinoptera bonasus</i> e <i>R. brasiliensis</i> .....	21
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>25</b>
2.1. Objetivos específicos .....	25
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>26</b>
3.1. Amostragem dos animais .....	26
3.2. Classificação dos filhotes e fator de condição.....	29
3.3. Análises metabólicas .....	29
3.4. Análise de isótopos estáveis .....	30
3.5. Análise estatística .....	31
<b>4. Resultados</b>	
4.1. Dados morfométricos e de captura .....	32
4.2. Lipídios plasmáticos e teciduais .....	35
4.3. Ácidos graxos plasmáticos e teciduais.....	37
4.4. Isótopos estáveis .....	42
<b>5. Discussão</b>	
5.1. Uso da área de berçário .....	45
5.2. Lipídios e índice de condição corpórea .....	47
5.3. Perfil de ácidos graxos e mudanças ontogenéticas .....	50
5.4. Índices de relações tróficas: ácidos graxos e isótopos estáveis.....	53
<b>6. Conclusões e Considerações Finais .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Apêndices .....</b>	<b>70</b>

## *Lista de abreviações*

---

- ARA - ácido araquidônico do inglês "arachidonic acid"
- BFA - ácido graxo de cadeia ramificada do inglês "branched fatty acid"
- CHOL - colesterol do inglês "cholesterol"
- CF – fator de condição do inglês "condition factor"
- C18 - 18 carbonos (ácidos graxos de cadeia curta)
- DHA - ácido docosahexaenoico do inglês "docosahenoic acid"
- DP - desvio padrão
- EFA - ácido graxo essencial do inglês "essential fatty acid"
- EPA - ácido eicosapentaenoico do inglês "eicosapentaenoic acid"
- FA - ácido graxo do inglês "fatty acid"
- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- HUFA - ácido graxo altamente insaturado do inglês "highly unsaturated fatty acid"
- IB-USP – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo
- IUCN - do inglês "International Union for Conservation of Nature and Natural Resources"
- LAMEROA – Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos
- LC-PUFA - ácido graxo polinsaturado de cadeia longa do inglês "long chain polyunsaturated fatty acid"
- MUFA - ácido graxo monoinsaturado do inglês "monounsaturated fatty acid"
- n3 - ômega 3
- n6 - ômega 6
- OFA - ácido graxo ímpar do inglês "odd fatty acid"
- PUFA - ácido graxo polinsaturado do inglês "polyunsaturated fatty acid"
- SBEEL – Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios
- SFA - ácido graxo saturado do inglês "saturated fatty acid"
- TAG – triacilglicerol
- UNESP – Universidade Estadual Paulista
- $\delta^{13}\text{C}$  - isótopo estável de carbono
- $\delta^{15}\text{N}$  - isótopo estável de nitrogênio

## Resumo

---

O objetivo do presente estudo foi investigar a estratégia nutricional neonatal das raias *Rhinoptera bonasus* e *Rhinoptera brasiliensis*, analisando suas interações tróficas e dependência do recurso materno durante as fases iniciais da vida. Lipídios, ácidos graxos (FA) e isótopos estáveis (SI) foram analisados em diferentes tecidos, como ferramentas para avaliar as alterações durante o crescimento em raias jovens-de-ano (YOY), divididas em dois grupos, YOY I ( $\leq 50$  cm largura de disco, LD) e YOY II (50-70 cm LD). O registro de YOY em três anos consecutivos (2015, 2016 e 2017) e a permanência dos filhotes durante o ano, confirmam que a região de Bertioga é uma área de berçário para as espécies *R. bonasus* e possivelmente para *R. brasiliensis*. Nossos resultados do perfil de FA teciduais suportam a hipótese de que a estratégia histotrófica lipídica, juntamente com maiores períodos de gestação e o grande tamanho ao nascimento da raia *R. bonasus* confere um maior investimento energético aos filhotes. Filhotes de *R. bonasus* nascem enriquecidos em DHA (ácido docosahexaenoico), ARA (ácido araquidônico) e  $\delta^{15}\text{N}$  e demonstram perda gradual do sinal isotópico e de FA materno, assim como uma diminuição do fator de condição, colesterol e  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB) com o crescimento, provavelmente como resultado do uso dos estoques energéticos provisionados pela mãe durante a gestação e redução das taxas de crescimento. O perfil de FA essenciais (EFA) teciduais e plasmático encontrado sugere que os filhotes não apresentaram deficiência destes FA, como é observado em tubarões placentários, indicando grande demanda de EFA durante o início do crescimento. Além disso, YOY II parecem ter melhores habilidades de forrageio, demonstrado pelo aumento de EFA e diminuição de FA saturados (SFA) plasmático, assim como diminuição nas concentrações de  $\beta$ -HB. Comparando-se as duas espécies, foram encontradas diferenças na composição de FA do fígado e músculo, principalmente na somatória de SFA, FA monoinsaturados (MUFA) e FA polinsaturados (PUFA), sugerindo que as espécies apresentam diferentes dietas ou diferentes períodos de nascimento. Estes resultados corroboram com as diferenças encontradas nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  entre as duas espécies, revelando que as duas espécies partilham recursos alimentares, uma estratégia que é geralmente adotada pelas espécies que utilizam a mesma área como berçário. Deste modo, a combinação de biomarcadores permitiu analisar os aspectos nutricionais e interações tróficas de YOY em uma área de berçário, demonstrando que estas raias investem significativamente nos jovens e, conseqüentemente, em melhores condições nutricionais no nascimento. Foi possível assim, compreender como o

maior investimento materno afeta tais aspectos durante o início da história de vida das raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis*.

## *Abstract*

---

The aim of the present study was to investigate the neonatal nutritional strategy adopted by species *Rhinoptera bonasus* and *R. brasiliensis*, related to its trophic interactions and maternal resource dependency during the early stages of life. Lipids, fatty acids (FA) and stable isotope (SI) were assessed in different tissues, as tools to evaluate biomarkers changes during growth in young-of-the-year (YOY) rays, divided into two stages, YOY I ( $\leq 50$  cm disc width, DW) and YOY II (50 - 70 cm DW). The registration of YOY in three consecutive years (2015, 2016 and 2017) and the permanence of the YOY during the year, confirms that the region of Bertioga is a nursery area for *R. bonasus* and possibly to *R. brasiliensis*. Our FA profile results support the hypothesis that the lipid histotrophic strategy, along with greater periods of pregnancy and the large size at birth of *R. bonasus* confers a greater energy investment to the pups. *R. bonasus* pups born enriched in DHA (docosahexaenoic acid), ARA (arachidonic acid) and  $\delta^{15}\text{N}$ , and showed gradual loss of isotopic signal and FA, as well as a decrease in condition factor, cholesterol and  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -HB) with the growth, probably as a result of the use of energy stocks provided by the mother during pregnancy and reduction of growth rates. The plasma and tissues essential FA (EFA) profile found suggests that the pups did not show EFA deficiency, as is observed in placental sharks, indicating high demand for EFA during early growth. In addition, data indicate larger animals have improved foraging skills, demonstrated by increased plasma levels of EFA and a decrease of saturated FA (SFA) and plasma  $\beta$ -HB in YOY II rays. Comparing the two species, differences were found in the FA composition of liver and muscle, especially in the SFA, monounsaturated FA (MUFA) and polyunsaturated FA (PUFA), suggesting that the species have different diets or different periods of birth. These results corroborate with differences in the  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values between the two species, revealing that the two species partition food resources, a strategy that is usually adopted by the species that use the same area as nursery. Thus, the combination of biomarkers has allowed analyzing the nutritional aspects and trophic interactions of YOY in a nursery area, demonstrating that these rays investing significantly in young and, consequently, in better conditions nutritional facts at birth. It was possible understand how the greater maternal investment affects such aspects during the early life history of *R. bonasus* and *R. brasiliensis*.

# 1. Introdução

---

Os elasmobrânquios (tubarões e raias) juntamente com as quimeras, formam a classe monofilética dos Chondrichthyes, que compõe uma das mais antigas e diversificadas radiações existentes de vertebrados (Dulvy *et al.*, 2017). Muitas espécies apresentam uma complexa história de vida, com crescimento lento, maturidade tardia, expectativas de vida relativamente longa, baixa fecundidade e frequência reprodutiva, além de exibirem os mais longos períodos de gestação e alguns dos mais altos níveis de investimento materno entre os vertebrados (Cortés, 2004). Tais aspectos biológicos atrelados à sobrepesca, poluição, a degradação do habitat e alterações climáticas (Chin *et al.*, 2010), torna-os mais sensíveis à mortalidade elevada, com estimados 24% das 1041 espécies sob algum grau de risco de extinção (Frisk *et al.*, 2001; Dulvy *et al.*, 2014).

Ecologicamente, os elasmobrânquios participam da transferência de energia através de interações ecológicas diretas, como predação, e indiretas como competição e modificação do comportamento de níveis tróficos inferiores (Heithaus *et al.*, 2008). A maioria das espécies, sendo elas predadores ou mesopredadores, desempenha destacado papel funcional na dinâmica dos ecossistemas marinhos, estuarinos e dulcícolas (Ferretti *et al.*, 2010; Heithaus *et al.*, 2012). Nesse sentido, reduções populacionais, podem levar a efeitos de cascata trófica e consequente modificação da comunidade (Ferretti *et al.*, 2010). Além disso, os elasmobrânquios contam com uma história evolutiva de mais de 400 milhões de anos, e são particularmente interessantes do ponto de vista fisiológico, principalmente devido à sua estratégia osmorregulatória por meio da retenção de ureia e organização do metabolismo energético incomum dentre os vertebrados, caracterizada por uma grande dependência de corpos cetônicos e aminoácidos como combustíveis energéticos (Speers-Roesch e Treberg, 2010), que será abordada melhor a seguir.

## 1.1. Lipídios e aspectos do metabolismo energético em elasmobrânquios

Os vertebrados apresentam diferentes estratégias para armazenamento e utilização dos estoques lipídicos, que podem variar com a história de vida de cada espécie (Sheridan, 1994; Speake e Thompson, 2000). Em mamíferos, os lipídios são estocados no tecido adiposo, principalmente nas cavidades torácica e abdominal. No entanto, os animais ectotérmicos apresentam maior variação nos padrões de armazenamento, como em teleósteos e anfíbios,

por exemplo, que dividem o estoque de gordura entre o fígado, músculo e gordura mesentérica (Birsoy *et al.*, 2013), e elasmobrânquios que utilizam o fígado como local principal de estoque de lipídios (Ballantyne, 2016).

Estes estoques energéticos são geralmente avaliados através de índices de condição corpórea (CF), que estimam quantitativamente os depósitos de gordura e indiretamente um índice de ‘saúde’ ou estado energético do animal (Stevenson e Woods, 2006). Estes índices normalmente são calculados a partir de medidas morfológicas (por exemplo, comprimento e massa do animal) e medidas bioquímicas plasmáticas ou teciduais (por exemplo, conteúdo de proteínas e lipídios) (Stevenson e Woods, 2006; Sardenne *et al.*, 2016). Em tubarões, a relação entre a massa corpórea e o comprimento total ou comprimento pré-caudal, são mais utilizadas, e tem sido positivamente relacionada com a concentração de metabólitos energéticos (Hussey *et al.*, 2009; Gallagher *et al.*, 2014). No entanto, poucos estudos têm explorado o CF em raias (utilizando a largura de disco e a massa corpórea) (Oddone *et al.*, 2007).

Os lipídios constituem um grupo diverso de compostos ricos em carbono, e são a forma mais concentrada de energia nos animais, funcionando como moléculas de armazenamento de energia e como componentes estruturais das células, principalmente devido às suas características bioquímicas de serem combustíveis quimicamente reduzidos, de maior rendimento energético ( $\sim 38 \text{ kJ g}^{-1}$ ) quando comparados aos carboidratos e proteínas ( $\sim 18 \text{ kJ g}^{-1}$ ), e armazenados sem a necessidade de água (Nelson e Cox, 2014). Estas características permitem que os lipídios sejam bons indicadores para estudar as alterações na qualidade do alimento e fluxo de energia através das teias alimentares (Pethybridge *et al.*, 2018).

Elasmobrânquios de forma geral apresentam uma organização metabólica incomum dentre os vertebrados, caracterizada pela limitada ou ausente oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e cardíaco e uma grande dependência de corpos cetônicos, principalmente o  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -HB), e aminoácidos como combustíveis oxidativos nestes tecidos (Speers-Roesch *et al.*, 2006). A ausência de albumina nestes animais, impede o transporte rápido de ácidos graxos não-esterificados, e conseqüentemente, altos níveis plasmáticos de corpos cetônicos são encontrados (Speers-Roesch *et al.*, 2006; Ballantyne, 2016). Além de serem considerados como a principal fonte de energia metabólica, os lipídios estão estreitamente ligados às condições ambientais, como quantidade e qualidade de presas, ciclos biológicos da reprodução e migração (Speers-Roesch e Treberg, 2010; Pethybridge *et al.*, 2014; Valls *et al.*, 2016; Gallagher *et al.*, 2017).

Dentre as classes de lipídios neutros, os triacilgliceróis (TAG), compostos formados por três cadeias de ácidos graxos (FA, do inglês *fatty acids*), ligados a uma molécula de glicerol, são a principal fonte de energia metabólica e o componente principal de estoques energéticos. Estudos tem revelado a positiva correlação entre as concentrações de TAG e a deposição de gordura em vertebrados (Williams *et al.*, 1999; Gallagher *et al.*, 2014), e acúmulo deste substrato durante o preparo para eventos energeticamente desgastantes, tais como migração e reprodução (Jenni-Eiermann *et al.*, 2002; McWilliams *et al.*, 2004). Em tubarões, o TAG plasmático tem sido positivamente associado com a condição corpórea (Gallagher *et al.*, 2014) e parecem seguir padrões sazonais, com maiores valores encontrados em tubarões durante a primavera e verão (Gallagher *et al.*, 2017). Além disso, foi observado, neste mesmo estudo, que os tubarões com dieta generalista, tais como *Carcharhinus leucas* e *Galeocerdo cuvier*, apresentaram menores concentrações de TAG do que tubarões *Ginglymostoma cirratum* e *C. limbatus* que são mais especialistas.

O colesterol (CHOL, do inglês *cholesterol*), o principal esteroide sintetizado pelos animais, é um álcool policíclico de cadeia longa, essencial na composição das membranas celulares, além de atuar como precursor na biossíntese de hormônios esteroides, sais biliares e vitamina D (Nelson e Cox, 2014). A concentração do CHOL em animais tem sido relacionada com a dieta, estado nutricional e crescimento, e também com fatores ambientais como salinidade e temperatura (Larsson e Fänge, 1977). Em tubarões, as concentrações de CHOL foram positivamente correlacionadas ao tamanho corporal, indicando que animais maiores aumentam o acesso a presas maiores, comparado a animais menores (Gallagher *et al.*, 2017). Além disso, maiores valores de CHOL durante o verão tem sido relacionado à maior disponibilidade de alimento durante esta estação (Valls *et al.*, 2016).

Cerca de 65% de todos os lipídios são constituídos por FA, que são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, que contem de 4 a 36 átomos de carbonos. Os FA são classificados de acordo com o número de carbonos na cadeia, o grau de insaturação e a posição da primeira insaturação (Nelson e Cox, 2014). Os FA podem apresentar a cadeia de carbonos saturada (ácidos graxos saturados, SFA), podem apresentar uma insaturação (ácidos graxos monoinsaturados, MUFA), duas ou mais insaturações (ácidos graxos polinsaturados, PUFA) ou ainda FA com cadeias entre 20 e 22 carbonos contendo mais de três insaturações (ácidos graxos altamente insaturados, HUFA) (Arts *et al.*, 2009; Nelson e Cox, 2014). Os FA são comumente apresentados usando-se a seguinte notação abreviada: A:Bn-X, onde A indica o número de átomos de carbono, B é o número de insaturações e X indica a posição da primeira dupla ligação em relação ao grupo metil terminal (Nelson e Cox, 2014).



O perfil de FA de um consumidor pode refletir, em grande parte, os FAs obtidos da dieta, desta forma permitindo o uso destas moléculas como biomarcador dietético, refletindo o *status* fisiológico do animal e, portanto, índices de saúde da população (Budge *et al.*, 2006; Arts *et al.*, 2009; Iverson, 2009). Embora capazes de sintetizar os SFA e MUFA de fontes não lipídicas, ou modificados através do encurtamento da cadeia (por exemplo, C20:1n-9 para C18:1n-9) ou alongados (por exemplo, C16:1n7 para C18:1n-7), os vertebrados são incapazes de sintetizar *de novo* os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) com 18 carbonos da série n3 (ômega 3) e n6 (ômega 6) (Hulbert e Abbott, 2011), precursores de PUFA de cadeia longa fisiologicamente importantes. Nos sistemas aquáticos marinho, os PUFA com 20-22 carbonos são sintetizados por produtores primários, tais como diatomáceas e dinoflagelados e macroalgas, os quais produzem altas quantias do ácido eicosapentaenoico (EPA; C20:5n3), ácido docosahexaenoico (DHA; C22:6n3), respectivamente (Parrish 2013). Estes FA essenciais (EFA) e outros, tais como o ácido araquidônico (ARA; C20:4n6), estão envolvidos diretamente na manutenção da estrutura e fluidez das membranas celulares, função neurológica, cardiovascular, acuidade visual, crescimento, reprodução e sistema imunológico (Dalsgaard *et al.*, 2003; Parrish, 2009; Colombo *et al.*, 2016).

Estudos com elasmobrânquios incluem análises comparativas entre o perfil de FA em diferentes tecidos e nas presas, detectando relações tróficas, diferenças interespecíficas nos padrões de uso de recursos geral (dieta e habitat) e graus de especialização alimentar (Pethybridge *et al.*, 2011a). No tubarão da Groenlândia (*Somniosus microcephalus*) o perfil de FAs do músculo e do plasma correspondia ao das presas, destacando-se os FAs C18:1n7 para gordura de foca e C22:1n11 para o peixe alabote (McMeans *et al.*, 2012). Em combinação com os isótopos estáveis (SI, do inglês *stable isotope*), o perfil de FA também tem sido utilizado para delinear as diferenças espaciais e temporais de dieta em tubarões simpátricos (Every *et al.*, 2017), mudanças ontogenéticas e dependência do recurso materno durante o início da vida em filhotes (Belicka *et al.*, 2012). No tubarão cabeça-chata (*Carcharhinus leucas*) foi observado que filhotes mudam gradualmente o perfil de FA e SI com o crescimento, e tornam-se independentes do recurso materno quanto atingem > 100 cm de comprimento total (Belicka *et al.*, 2012).

## 1.2. Isótopos estáveis e aplicação em estudos tróficos

Tradicionalmente, estudos de dieta de elasmobrânquios têm utilizado a análise do conteúdo estomacal por meio de dissecação letal, que fornece um dado quantitativo e instantâneo da dieta (Cortés, 1999; Bornatowski *et al.*, 2014). Devido às limitações deste método, como a necessidade de grande número de indivíduos e a rápida digestão do alimento, métodos alternativos através do rastreamento bioquímico por marcadores tróficos, principalmente por SI, têm sido bem estabelecidos para investigar a ecologia trófica dos consumidores (Budge *et al.*, 2006; Iverson, 2009; Hussey *et al.*, 2012).

A assinatura de SI em tecidos animais pode ser empregada como uma técnica minimamente invasiva, não-letal, que fornece informações sobre a dieta, interações tróficas, origem nutricional e local de forrageamento, permitindo diferenciar padrões populacionais e comportamentos migratórios (Shiffman *et al.*, 2012; Hussey *et al.*, 2017). A Análise de SI é baseada no princípio de que os isótopos de nitrogênio ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) são transferidos da fonte ao consumidor de forma previsível (Shiffman *et al.*, 2012). Valores de isótopos de nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ), por exemplo, demonstram enriquecimento gradual na média de  $\sim 3,4\%$  por nível trófico, através do consumo de proteínas (presa > predador), indicando a posição e as relações tróficas do consumidor dentro da cadeia alimentar (Hussey *et al.*, 2012). Estudos com estes marcadores são particularmente interessantes na detecção da partilha de recursos entre espécies simpátricas e mudanças ontogenéticas (Kinney *et al.*, 2011).

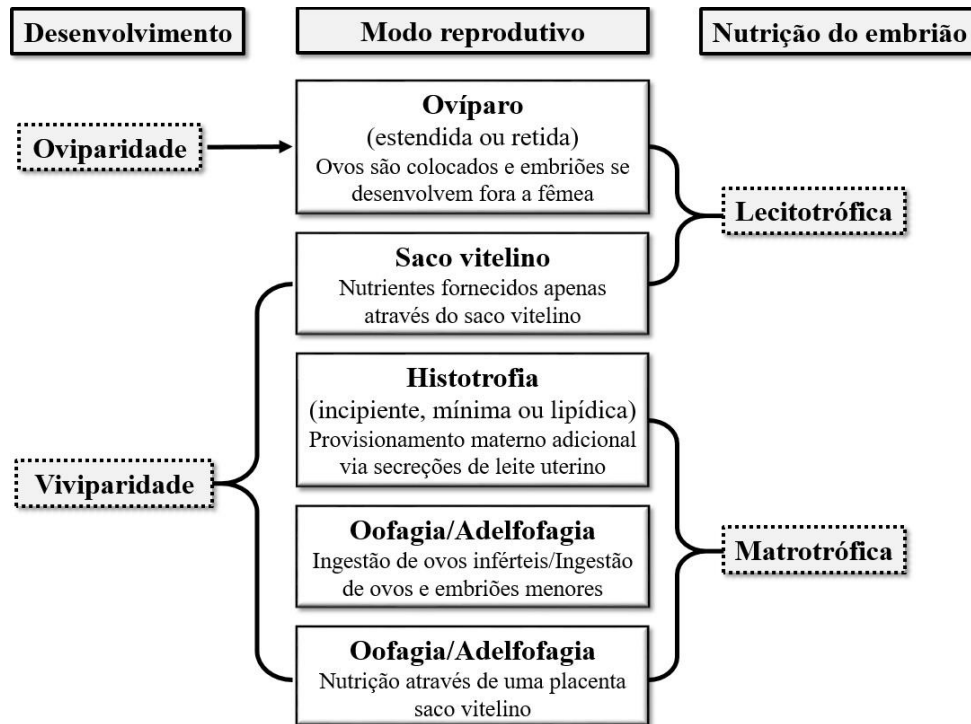
Os isótopos de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ), por sua vez, fornecem uma medida da localização de forrageio, uma vez que são influenciados diretamente pelos processos bioquímicos durante a fixação em plantas, permitindo a determinação da origem do carbono no consumidor e distinção dos produtores primários da base da cadeia alimentar (Hobson, 1999; Rubenstein e Hobson 2004). Por exemplo, valores mais enriquecidos são utilizados como marcadores de ambientes costeiros, enquanto os menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  são encontrados em ambientes pelágicos (Shiffman *et al.*, 2012). Mudanças no uso do habitat em decorrência de variações ontogenéticas foram detectadas por alterações na assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  em tubarões-baleia *Rhincodon typus* (Borrell *et al.*, 2011) e em grandes tubarões brancos *Carcharodon carcharias* (Carlisle *et al.*, 2012). Hussey *et al.* (2017), utilizando isótopos de  $\delta^{13}\text{C}$  e enxofre ( $\delta^{34}\text{S}$ ) verificaram que o uso diferenciado de habitats para forrageamento em filhotes de uma mesma população de *Negaprion brevirostris* está relacionada com a taxa de crescimento dos indivíduos, revelando uma seleção direcional no sentido de favorecer o menor tamanho e uma taxa de crescimento mais lenta.

Além disso, analisando a composição isotópica em diferentes tecidos, é possível obter informações sobre as variações temporais na dieta e no local de forrageio, isso porque a taxa de *turnover* dos SI varia em função do *turnover* metabólico, ou seja, o equilíbrio entre o catabolismo e o anabolismo e as taxas de crescimento (Fry e Arnold, 1982). Por exemplo, a composição isotópica em tecidos metabolicamente mais ativos, tais como o fígado e sangue, tendem a ter maiores taxas de *turnover*, refletindo a dieta de dias a semanas, enquanto que tecidos como músculo e dérmico, apresentam taxas de *turnover* menores, refletindo a dieta de longos períodos (meses a anos) (MacNeil *et al.*, 2005; Kinney *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2011).

### 1.3. Fase neonatal em elasmobrânquios

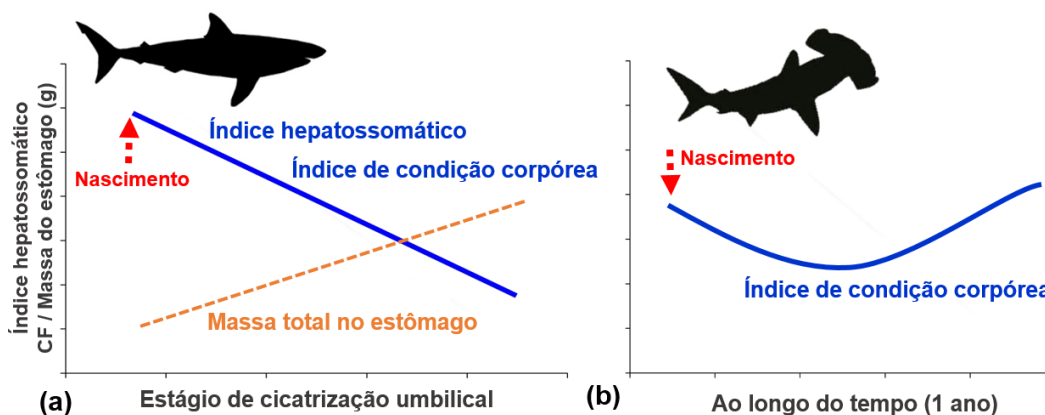
Informações da história de vida mostram que alguns organismos apresentam investimento parental e energético de forma a aumentar o sucesso reprodutivo e sobrevivência da prole (Kölliker, 2012). Para muitos organismos, incluindo os elasmobrânquios (tubarões e raias), os machos não contribuem no cuidado parental, consequentemente o tamanho, crescimento e aptidão dos filhotes são determinados pela alocação de recursos maternos (Hamlett *et al.*, 2005; Hussey *et al.*, 2010).

Ao longo do processo evolutivo, estes animais desenvolveram uma série de estratégias de história de vida, que inclui uma grande variedade de especializações morfológicas e fisiológicas nos modos reprodutivos e investimento energético materno-fetal (Hamlett *et al.*, 2005). A estratégia reprodutiva é classificada quanto ao desenvolvimento (vivíparo ou ovíparo) e tipo de nutrição do embrião (lecitotrófica ou matrotrófica) (Figura 1). A viviparidade é uma característica plesiomórfica no grupo, sendo as formas mais ancestrais a lecitotrófica saco-vitelino e a oofágica, enquanto as formas mais derivadas são a placentotrófica e a histotrófica, na qual as relações materno-fetais são maiores (Hamlett *et al.*, 2005; Awruch, 2016).



**Figura 1-** Classificação dos modos reprodutivos em fêmeas de elasmobrânquios quanto ao desenvolvimento e nutrição do embrião. Modificado de Awruch (2016) e Adams *et al.* (2017).

Os elasmobrânquios não apresentam cuidado parental após o nascimento como visto em outros vertebrados, contudo, ao nascerem os filhotes contam com reservas energéticas de fontes de investimento materno pré-natal, que são estocadas na forma de saco vitelínico interno ou no fígado (Hussey *et al.*, 2010). Tais aspectos nutricionais têm sido investigados de forma mais ampla, considerando as diferentes estratégias e possíveis consequências em estudos ecológicos (Hussey *et al.*, 2010; 2017; Belicka *et al.*, 2012). Tubarões placentários mostram um declínio na massa total do fígado, no índice hepatossomático e no CF com o crescimento corporal (verificado muitas vezes através da cicatrização umbilical; Figura 2a), decorrentes do uso do estoque energético, provisionado pela mãe durante a fase pré-natal (Hussey *et al.*, 2009; 2010). Antes destes estudos, o declínio no CF de filhotes de tubarões-martelo *Sphyrna lewini* era considerado como um estado nutricional deficiente, devido à redução de presas ou pouca habilidade de forrageamento, e atribuído como causa da alta taxa de mortalidade dentro do berçário (Figura 2b; Duncan e Holanda, 2006). No entanto, esta parece ser a estratégia adotada pelos tubarões placentários (Hussey *et al.*, 2010).



**Figura 2-** Relações entre biometrias e índices de condição corporal. (a) entre os índices e massa do estômago com o estágio de cicatrização umbilical em filhotes de tubarões *Carcharhinus obscurus*, modificado de Hussey *et al.* (2010). (b) entre índice de condição corpórea ao longo do tempo em tubarões *Sphyrna lewini*, modificado de Duncan e Holanda (2006).

Filhotes de tubarões, assim como outros vertebrados, passam por mudanças significativas na utilização dos recursos energéticos durante seus primeiros meses de vida, desde a transição da dependência do recurso materno até a alimentação independente, seguida de algumas mudanças na dieta em decorrência de variações ontogenéticas (Hussey *et al.* 2010; Olin *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2015). Nas fases neonatais iniciais, os tecidos dos filhotes refletem o sinal materno, que pode variar com a estratégia reprodutiva. Em espécies vivíparas lecitotróficas os filhotes têm valores isotópicos semelhantes ao materno (Bourg *et al.*, 2014), já em espécies placentárias os SI podem ser mais enriquecidos (McMeans *et al.*, 2009; Vaudo *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2011) ou então como em espécies lecitotróficas, não mostrar enriquecimento (Olin *et al.*, 2018).

Desta forma, entender as estratégias nutricionais utilizadas pelos filhotes ao nascerem e quais as energéticas que necessitam durante essa fase inicial, é fundamental para compreender a escala temporal necessária para o desenvolvimento de habilidades de forrageamento (Belicka *et al.*, 2012; Matich *et al.*, 2015). Além disso, estas informações permitem avaliar o grau de investimento, que são aspectos importantes na dinâmica populacional da espécie, e a utilização de recursos em área de berçário (Hussey *et al.*, 2010). As raias Myliobatiformes representam um modelo interessante para tais estudos, principalmente por apresentarem distintas histórias de vida e alto grau de investimento materno (Hamlett *et al.*, 2005; Fisher *et al.*, 2013). Apesar de tais características e de sua posição trófica em sistemas marinhos como importantes mesopredadores onívoros, as raias têm recebido pouca atenção em tais estudos (Tilley *et al.*, 2013).

#### 1.4. Aspectos gerais das raias *Rhinoptera bonasus* e *R. brasiliensis*

As raias do gênero *Rhinoptera* (Myliobatiformes; Rhinopteridae) estão distribuídas em áreas costeiras nas regiões temperadas e tropicais, geralmente habitando em profundidades entre 1 e 22 m (McEachran e Carvalho, 2002). São raias bentopelágicas, passando grande parte do tempo na superfície, geralmente em grandes agregações (< 10.000 raias), mas alimentam-se no fundo (Blaylock 1993; Ajemian e Powers, 2016). No Brasil, são registradas duas espécies, a *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, popularmente conhecidas como raias ticonha (Gomes *et al.*, 2010).

*Rhinoptera bonasus* (Mitchill, 1815) apresenta distribuição desde a Nova Inglaterra (EUA) até o norte da Argentina, incluindo Golfo do México e Cuba (Bigelow e Schroeder 1953; McEachran e Carvalho, 2002; Palacios-Barreto *et al.*, 2017). Esta espécie é altamente migratória, com formação de agregações sexuais e particionamento ontogenético de habitat (Smith e Merriner, 1985; Schwartz, 1990; Ajemian e Powers, 2016). Na costa leste dos Estados Unidos, onde são mais estudadas, habitam estuários sazonalmente, com uma parcela das populações migrando para a Baía de Chesapeake durante o final da primavera e verão, para acasalamento e uso da área como berçário (Smith e Merriner 1987; Fisher 2010). São eurialinas, podendo ser encontradas em águas salobras com salinidades de 17 a 37 ‰ (Neer *et al.*, 2007). Atualmente está classificada como "Quase Ameaçada" na Lista Vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (do inglês, *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) (Barker, 2015) e listada no apêndice II da lista de espécies ameaçadas da fauna selvagem no estado de São Paulo, como uma espécie que requer cuidado na gestão da pesca e conservação (ALESP, 2014).

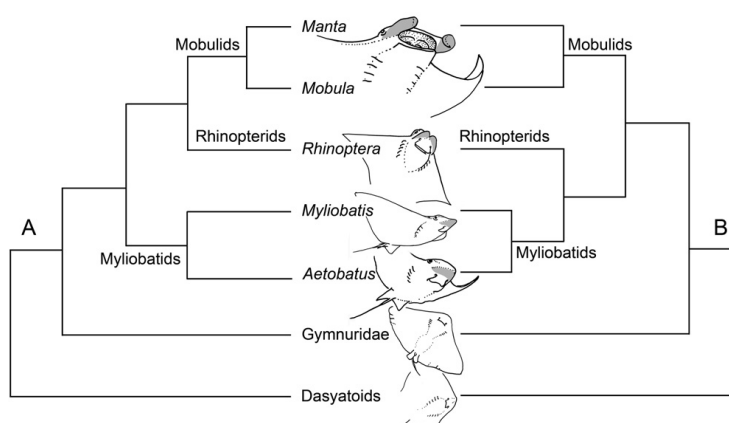
*Rhinoptera brasiliensis* apresenta uma distribuição um pouco mais restrita, com indivíduos observados desde a Carolina do Norte (EUA), Golfo do México, Colômbia (Costa do Caribe), Venezuela, até o sul do Brasil (Grijalba-Bendeck *et al.*, 2007; Palacios-Barreto *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2017). Alguns relatos sugerem que *R. brasiliensis* tem uma história de vida semelhante a de *R. bonasus* (Vooren *et al.*, 2005; McEachran e Carvalho, 2002; Domingues *et al.*, 2009) e está classificada como "Em Perigo" pela IUCN (Vooren e Lamónaca 2004) e "Criticamente em Perigo" pelo ICMBio (ICMBio, 2016).

A morfologia externa de ambas as espécies é muito similar e de difícil distinção visual, sendo a conformação dentária e a contagem dos dentes pavimentosos, o meio de identificação mais utilizado para diferenciar as formas existentes (Gomes *et al.*, 2010). O conhecimento atual sobre o gênero *Rhinoptera* em águas brasileiras está restrito a poucos

estudos realizados na região Sudeste/Sul do país, que tiveram como foco a sua ocorrência na pesca (Vooren *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2017).

As Rhinopteridae apresentam a viviparidade histotrófica lipídica, uma estratégia reprodutiva altamente especializada, caracterizada pela produção e secreção do histotrofo ("leite uterino") no lúmen uterino, substância rica em lipídios, proteínas e carboidratos, ingeridos e/ou absorvidos pelo embrião (Wourms, 1977; Hamlett *et al.*, 1996; 2005). Durante a gestação, o útero desenvolve projeções vilosas, os trofonemas, responsáveis pelo aumento da superfície de secreção do histotrofo e relacionadas a demandas nutricionais do embrião e trocas gasosas (Hamlett *et al.*, 1985; 1996; 2005).

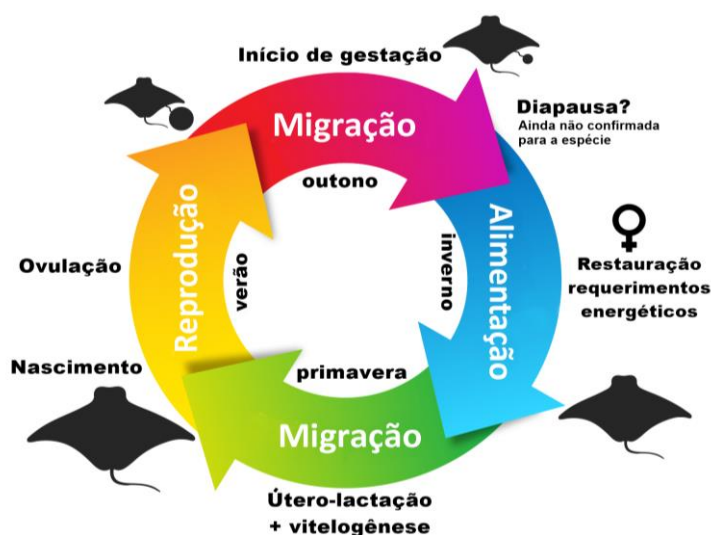
A nutrição do embrião nesta estratégia ocorre de 2 formas: (1) dependente da reserva vitelínica e (2) do suprimento do histotrofo (fase de útero-lactação) (Wourms, 1981; Hamlett *et al.*, 2005). Filogeneticamente, dentre as Myliobatiformes (Figura 3), as espécies mais basais possuem o histotrofo consideravelmente mais diluído e com menor concentração de lipídios e proteínas do que o encontrado em espécies derivadas (Hamlett *et al.*, 2005). Tal estratégia confere um alto grau de investimento materno nas raias Rhinopteridae. O termo útero-lactação foi introduzido para referir-se as similaridades estruturais da lactação em mamíferos (Hamlett *et al.*, 1996), presumindo que a produção de histotrofo rico em lipídios tenha evoluído em resposta às pressões seletivas que favoreceram o aumento do investimento parental em sua prole (Oftedal, 2002).



**Figura 3-** Filogenia de Myliobatiformes. (A) relações filogenéticas baseadas em evidências genéticas e (B) morfológicas. Retirado de Adnet *et al.* (2012).

Durante o ciclo de vida, a *R. bonasus* usa diferentes áreas para berçário, reprodução e alimentação. As fêmeas, quando grávidas, acessam áreas de berçário para o parto, com o acasalamento ocorrendo na sequência (Figura 4). Após entrarem em fase reprodutiva, as fêmeas apresentam ciclos anuais contínuos e são mais suscetíveis à pressão da pesca durante a residência nos berçários, que são geralmente em áreas estuarinas ou costeiras (Omori e

Fisher, 2017; Rangel *et al.*, 2018). Estudos sobre a migração de *R. bonasus* no hemisfério norte, revelam que as fêmeas migraram no início do outono da Baía de Chesapeake (área de berçário e reprodução) para o sul da Flórida (área de alimentação), diferentes dos machos, que migraram para o norte e para o sul da Nova Inglaterra, EUA (Omori e Fisher, 2017). Observações durante o desenvolvimento embrionário sugerem que ocorre o processo denominado diapausa embrionária para esta espécie (Figura 4), uma vez que, quando as fêmeas migram, elas estão na primeira fase da gestação, na qual são observados embriões com média de 21.4 cm largura de disco (LD), e quando retornam, 7 meses depois, os embriões estão com média de 28.3 cm LD (Fisher, 2010). No entanto, não se sabe sobre a rota migratória ou aspectos reprodutivos destas raias na costa do Brasil.



**Figura 4-** Diagrama do ciclo reprodutivo proposto para *R. bonasus*, para ilustrar a estratégia reprodutiva de raias da ordem Myliobatiformes. Informações retiradas de: Fisher (2010); Goodman *et al.* (2010); Fisher *et al.* (2013); Ajemian e Powers (2016). Retirado de Rangel *et al.* (2018).

Devido principalmente ao longo período de gestação (11-12 meses) e baixo potencial reprodutivo (1 embrião/fêmea/ano), *R. bonasus* é classificada como a espécie com a menor taxa de fertilidade (< 14) entre os elasmobrânquios (Neer e Thompson, 2005; Fisher *et al.*, 2013; Poulakis, 2013; Grubbs *et al.*, 2016). Tais características indicam que o investimento materno na nutrição dos embriões destas raias é ainda maior do que o observado em espécies de tubarões placentários (Wourms, 1981). As vantagens evolutivas da produção de um número reduzido de filhotes, mas de maior tamanho, incluem maiores chances de sobrevivência, obtenção de presas e menor susceptibilidade aos predadores no nascimento. Além disso, permite o desenvolvimento mais complexo de estruturas neurais e cognição (Elliot e Crespi 2008). No entanto, requer da fêmea a obtenção de grande quantidade de energia do ambiente, para nutrir os embriões (Wourms, 1981; Castro *et al.*, 2016).



Considerando-se a importância do conhecimento da dinâmica nutricional neonatal nos elasmobrânquios, o presente estudo investigou o metabolismo energético neonatal e as interações tróficas de *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, utilizando lipídios, FA e SI. Foram testadas as seguintes hipóteses: **(1)** *Rhinoptera bonasus* utiliza a região de Bertioga como área de berçário durante as fases iniciais da vida; **(2)** o grande tamanho ao nascimento (1/3 da mãe), maiores períodos de gestação (11-12 meses) e transferência de nutrientes ricos em lipídios e proteínas através do histotrofo, confere a *R. bonasus* um alto grau de investimento energético aos filhotes; **(3)** jovens do ano I (YOY I, do inglês *young-of-the-year*) serão mais enriquecidos em EFA e  $\delta^{15}\text{N}$  que YOY II (mais velhos), refletindo o sinal materno; **(4)** em YOY II, os FA e SI vão refletir a composição da dieta, mudando progressivamente com o aumento do tamanho corporal; **(5)** TAG em YOY I será menor que em YOY II, enquanto que CHOL será maior em YOY II; sendo que os EFA e TAG serão positivamente correlacionados com a condição corpórea (Fulton).

## 2. Objetivos

---

O objetivo do presente estudo foi investigar a estratégia nutricional neonatal adotada pelas espécies *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, relacionando suas interações tróficas e a dependência do recurso materno durante as fases iniciais da vida, utilizando marcadores nutricionais e tróficos.

### 2.1. Objetivos específicos

1) Avaliar o uso da área de berçário pelas raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis* durante as fases iniciais de vida, através da captura incidental na pesca de arrasto de praia na região costeira de Bertioga, São Paulo;

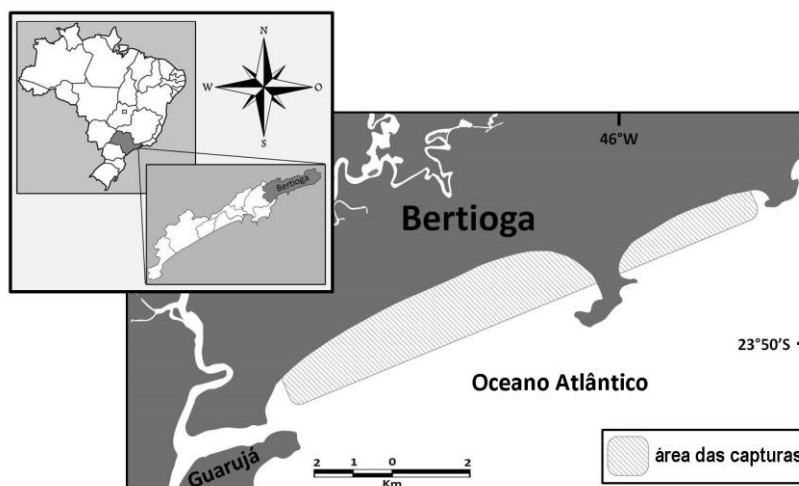
2) Identificar a estratégia nutricional neonatal adotada pelas raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis* comparando os filhotes recém nascidos com filhotes de até 1 ano de idade por meio de mudanças ontogenéticas nos biomarcadores nutricionais e tróficos;

3) Comparar o perfil dos biomarcadores nutricionais e tróficos entre as espécies simpátricas *R. bonasus* e *R. brasiliensis*, avaliando as diferenças na dieta e na partição de recursos na área de berçário;

4) Verificar quais biomarcadores melhor respondem às mudanças ontogenéticas na dieta e condição nutricional dos indivíduos.

### 3. Materiais e Métodos

Foram obtidas amostras de ambas as espécies de raias na localidade de Bertioga-SP ( $23^{\circ}49' S$ ,  $46^{\circ}5' W$ ), Setor Guaíbe da Área de Proteção Ambiental Marinha Litoral Centro (Figura 5) mediante autorização de pesquisa nº 48572-1 (IBAMA – SISBIO). Foram acompanhadas despescas do arrasto-de-praia durante o período de dezembro de 2015 a maio de 2017. A pesca de arrasto-de-praia utilizou uma rede de  $350 \times 11$  m, com malha de 70 mm entre malhas e 80 mm no ensacador, lançada entre 400 e 600 m da praia e recolhida por tração manual. Devido à baixa frequência de pesca durante o outono e o inverno, não foram realizadas coletas nestas estações, em decorrência de frequentes variações no clima.



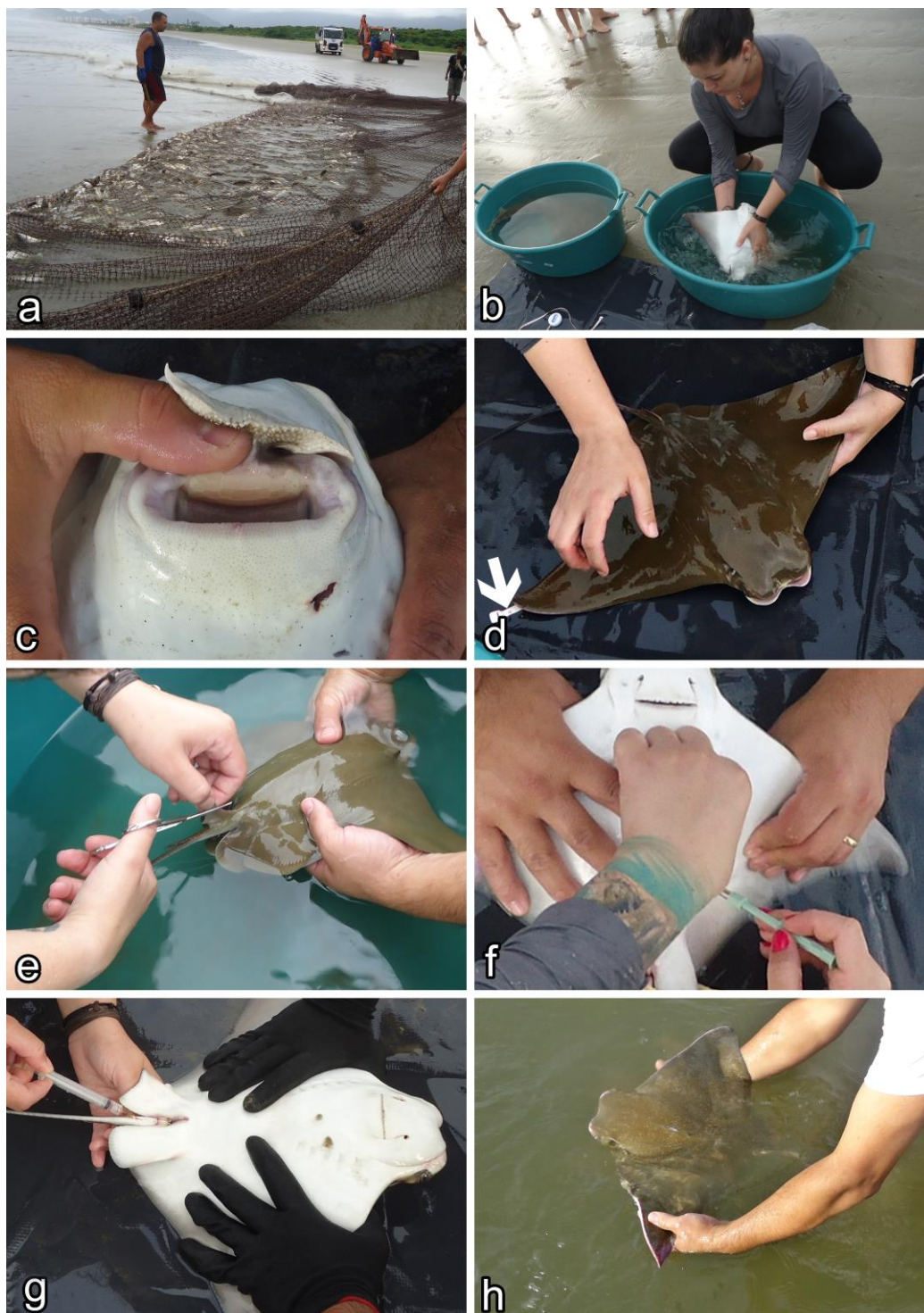
**Figura 5-** Áreas em que foram realizados os arrastos-de-praia.

Os critérios propostos por Heupel *et al.* (2007) para definição de área de berçário de tubarões foram utilizados no presente estudo, sendo eles: (1) ter maior abundância de filhotes na área considerada como berçário, comparando-se às regiões vizinhas; (2) filhotes tendem a permanecer por longos períodos no lugar e (3) o habitat é usado várias vezes ao longo dos anos pela mesma população.

#### 3.1. Amostragem dos animais

Logo na chegada da rede à praia (Figura 6a), as raias obtidas através da captura incidental foram retiradas da rede e mantidas em bacias de 50 L até o momento das amostragens (Figura 6b). A espécie foi identificada por meio das características morfológicas dentárias (Figura 6c) (McEachran e Carvalho, 2002), os dados biométricos (largura do disco)

e a massa corpórea (Figura 6d) foram registrados. Em seguida, foram coletados fragmentos da nadadeira dorsal (Figuras 6e e 7), amostras de músculo (usando *punch* para biópsia de 6 mm) (Figuras 6f e 7) e sangue (Figura 6g). Posteriormente, os animais foram liberados (Figura 6h).



**Figura 6-** Procedimento de coleta de filhotes da raia *R. bonasus*. **(a)** Chegada da rede do arrasto-de-praia. **(b)** Após retirada das raias da rede, as mesmas foram colocadas em bacias com água. **(c)** Verificação da espécie pela contagem de dentes. **(d)** Registro dos dados biométricos com fita métrica (seta). **(e)** Retirada de um fragmento da nadadeira dorsal. **(f)** Procedimento de biópsia na região ventral da nadadeira peitoral para coleta de amostras de músculo. **(g)** Coleta de sangue por punção da vasculatura caudal. **(h)** Soltura.



### 3.2. Classificação dos filhotes e fator de condição

Para classificação dos filhotes e métricas do CF foram considerados apenas os filhotes de *R. bonasus*, devido ao baixo número amostral para *R. brasiliensis*. Exemplares de *R. bonasus* foram separados em dois grupos de jovens-do-ano (YOY; < 1 ano de idade), classificados quanto ao tamanho corpóreo (largura de disco), seguindo um estudo de idade e crescimento de Fisher *et al.* (2013). Indivíduos com tamanho corpóreo < 50 cm LD foram considerados YOY I, enquanto indivíduos > 50 e < 70 cm LD foram considerados YOY II. Os YOY de *R. brasiliensis* foram considerados como YOY I. Para o CF foi utilizada a largura de disco (LD; cm) e massa (W em g) de raias amostradas nos meses de março e dezembro de 2016 e fevereiro de 2017. O CF de Fulton foi calculado através da fórmula  $CF = 100 \times (W \times LD^{-3})$  (Froese, 2006).

As porcentagens de EFAs (DHA, EPA e ARA) foram utilizadas como índices descritivos da condição nutricional e disponibilidade na dieta (Pethybridge *et al.*, 2014; Parrish *et al.*, 2015). Para a avaliação das interações tróficas, foram utilizados alguns FA: para diatomáceas incluem como marcadores C14:0, C16:1n7, C18:1n7 e EPA como biomarcadores de diatomáceas; DHA, C18:4n3 e C22:5n3 como biomarcadores de dinoflagelados (Dalsgaard *et al.*, 2003, Parrish, 2013). As razões C18:1n9/C18:1n7 e DHA/EPA são geralmente usadas como índices de carnivoría (Dalsgaard *et al.*, 2003; Pethybridge *et al.*, 2014; Parrish *et al.*, 2015), e têm sido significativamente correlacionadas com isótopos estáveis de  $\delta^{15}N$  (e, portanto, posição trófica) e de  $\delta^{13}C$  (El Sabaawi *et al.*, 2009; Parrish *et al.*, 2015). As relações de C16:1n7/C16:0 > 2 são consideradas para representar uma forte presença de diatomáceas, considerando que < 0.3 sugerem dinoflagelados (Dalsgaard *et al.*, 2003).

### 3.3. Análises metabólicas

Os lipídios totais do fígado e músculo (apenas de YOY I das duas espécies) foram extraídos com clorofórmio: metanol: água (2:1:0.5) de acordo com o método de Folch *et al.* (1957), adaptado por Parrish (1999) para organismos aquáticos, e as concentrações plasmáticas e teciduais foram quantificadas pelo método colorimétrico de Frings *et al.* (1972), utilizando como padrão óleo de fígado de bacalhau (Sigma). A quantificação da concentração de TAG e CHOL total dos tecidos apenas de YOY I das duas espécies, foi realizada por meio do analisador bioquímico automático para análises clínicas (LABMAX 240, versão 2.0), após

a extração previa realizada com hexano: isopropanol (3:2) de acordo com o método de Hara e Radin (1978). TAG, CHOL e os corpos cetônicos ( $\beta$ -hidroxibutirato-  $\beta$ -HB) foram medidos em amostras de plasma utilizando kits comerciais (TAG e CHOL: Labtest ®;  $\beta$ -HB: Cayman ®) e métodos colorimétricos correspondentes, utilizando-se um espectrofotômetro ELISA (Spectra Max 250, Molecular Devices).

O extrato lipídico tecidual (proveniente do método de Folch *et al.*, 1957) e plasma foram posteriormente metilados com cloreto de acetila (5% de HCL em metanol) (Christie, 2003), e a composição de FA foi determinada como metil ésteres (FAME) utilizando um cromatógrafo a gás (Varian modelo 3900, Walnut Creek, CA, EUA) acoplado a um ionizador de chama (FID) e auto injetor (Varian modelo CP-8410). Os ácidos graxos foram analisados em uma coluna capilar (CP Wax 52 CB, 0,25  $\mu$ m de espessura, 0,25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento). O hidrogênio foi utilizado como gás carreador a uma velocidade linear de 22 cm/s. A coluna foi programada a 170 ° C por 1 minuto, seguido por uma rampa de 2,5 ° C/minuto até 240 °C e um tempo de espera final de 5 minutos. No injetor e FID as temperaturas foram 250 e 260 °C, respectivamente. Os FAME foram identificados com base no tempo de retenção, utilizando-se padrões conhecidos (Supelco, 37 *components* – Sigma – Aldrich; Mixture, Me93, Larodan and Qualmix, PUFA *fish* M, Menhaden Oil, Larodan).

### 3.4. Análise de isótopos estáveis

As amostras de nadadeiras, células do sangue (RBC) e músculos foram liofilizadas, posteriormente queimadas por combustão a 1800°C em cápsula de estanho em um espectrômetro de massa de razão isotópica (IR-MS *ThermoQuest-Finnigan, Delta Plus Finnigan-MAT*, San Jose, CA) com um analisador elementar (Modelo 1110; Carlo Erba, Milão, Itália), no laboratório CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP-Piracicaba). O CO<sub>2</sub> (g) e N<sub>2</sub> (g) resultantes foram analisados pela razão entre os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, respectivamente, seguindo padrões internacionais reconhecidos.

A razão isotópica de C e N foi expressa em  $\delta$  como parte por milhão (‰) baseado no cálculo:  $\delta X = [(R_{amostra}/R_{padrão}) - 1] \times 1000$ , onde X é <sup>13</sup>C ou <sup>15</sup>N; R é correspondente a razão <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ou <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N e  $\delta$  é a proporção de luz emitida pelo isótopo na amostra. Os resultados da composição isotópica foram expressos em ‰, referentes aos padrões utilizados para C<sup>13</sup> (carbonato PDB-Viena) e N<sup>15</sup> (N<sub>2</sub> atmosférico).

### 3.5. Análise estatística

Foram comparados os valores médios dos metabólitos, FA e SI entre YOY I e YOY II da espécie *R. bonasus* e para comparações interespecíficas, os valores médios de FA foram comparadas entre YOY I de *R. bonasus* e YOY I de *R. brasiliensis*, e entre YOY I e YOY II de *R. bonasus* e YOY I de *R. brasiliensis* para os SI, através de Análise de Variância (*one-way ANOVA*) (Sigma Stat versão 3.1). Para dados paramétricos, foi aplicado o teste post-hoc Student-Newmann-Keuls. Para os dados não paramétricos foi aplicado o teste Tukey. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0.05$ . Os gráficos foram realizados utilizando-se o *software* SigmaPlot 10.0. Foi utilizado ponto (.) para separação dos decimais.

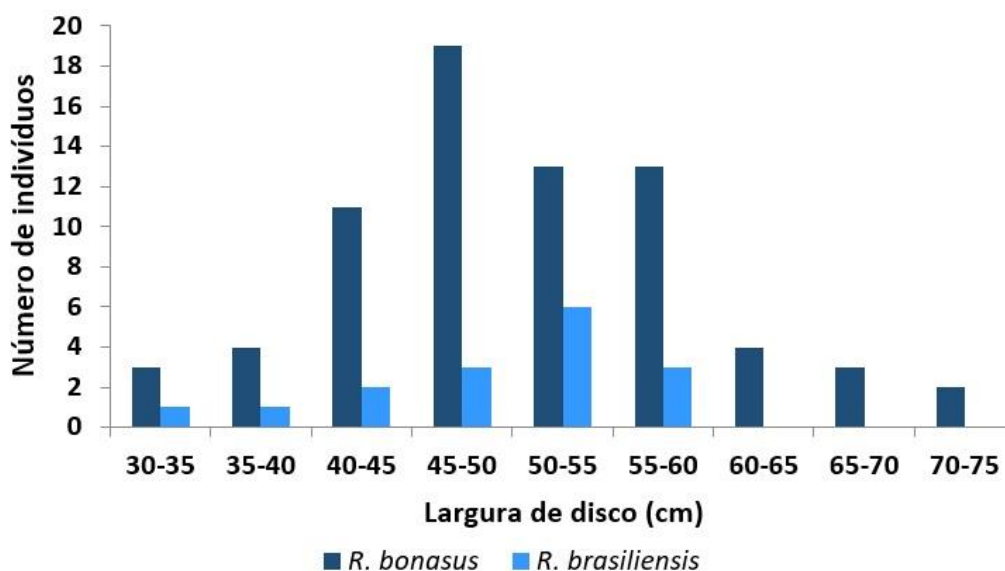
Para as análises de correlações, os dados foram transformados logaritmicamente para atender os pressupostos paramétricos das análises estatísticas. Foi calculado o grau de associação entre medidas morfométricas, CF e cada variável fisiológica por meio da análise de correlação de Pearson. Os valores positivos e negativos entre 0.1-0.29 indicam correlação fraca; 0.3-0.49: indicam correlação moderada e 0.5-0.1: indicam correlação forte (Cohen, 1988).



## 4. Resultados

### 4.1. Dados morfológicos e de captura

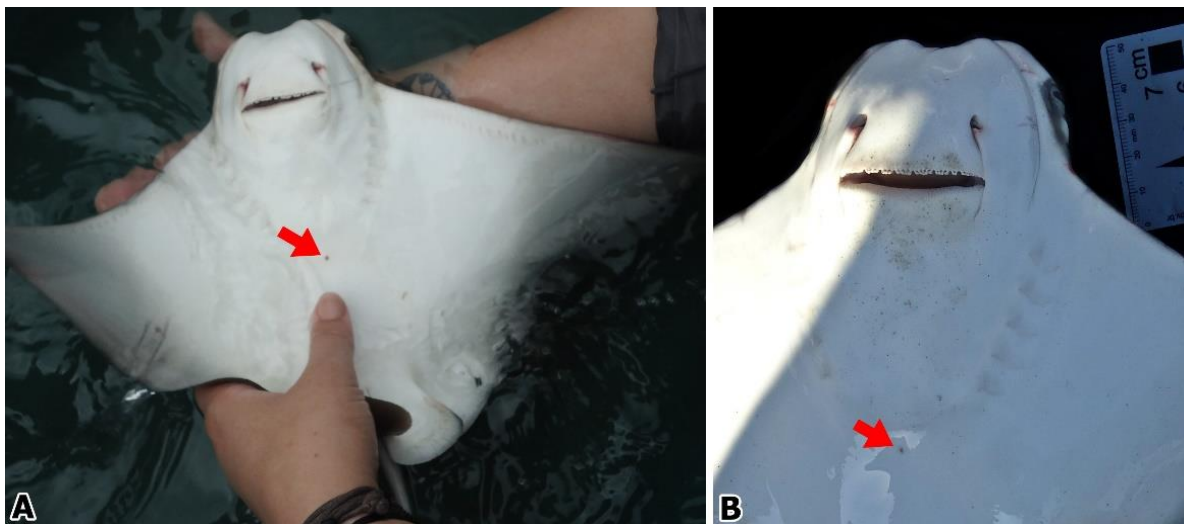
Durante as coletas, grandes cardumes foram frequentemente capturados com a presença de até 55 raias com média de  $34.0 \pm 12.07$  cm LD, entre os meses de dezembro e fevereiro. Na captura de grandes cardumes não foi possível a identificação da espécie. As maiores capturas foram registradas no final da primavera e durante todo o verão. A sazonalidade das capturas parece ser, portanto, em decorrência da baixa frequência de pesca durante o outono e inverno, devido às frequentes variações climáticas neste período. Todas as raias capturadas foram imediatamente liberadas após amostragens com raras observações de mortalidade (1.2 %; n= 15). A mortalidade foi observada principalmente durante os arrastos noturnos e em arrasto com captura de grande quantidade de peixes, o que dificultou a localização das raias durante a despesca. Destes, 9 eram da espécie *R. bonasus* (31.5 – 48 cm) e 6 eram *R. brasiliensis* (35.5 – 54 cm). *R. bonasus* apresentou o maior número total de indivíduos capturados (n= 61) com amplitude de 31.5 – 75 cm LD e a massa corpórea variou de 320 – 4010 g. Em *R. brasiliensis* (n= 16) a amplitude foi de 35.5 – 58.5 cm LD (Figura 8) e a massa corpórea de 1360 – 2620 g.



**Figura 8-** Número de indivíduos capturados entre os anos de 2015 a 2017 por espécie (*R. bonasus* e *R. brasiliensis*) e largura do disco.

Poucos indivíduos analisados apresentaram a marca de cordão umbilical (Figura 9), sendo que alguns dos menores indivíduos ( $35.8 \pm 6.01$  cm LD, n=3) foram capturados sem

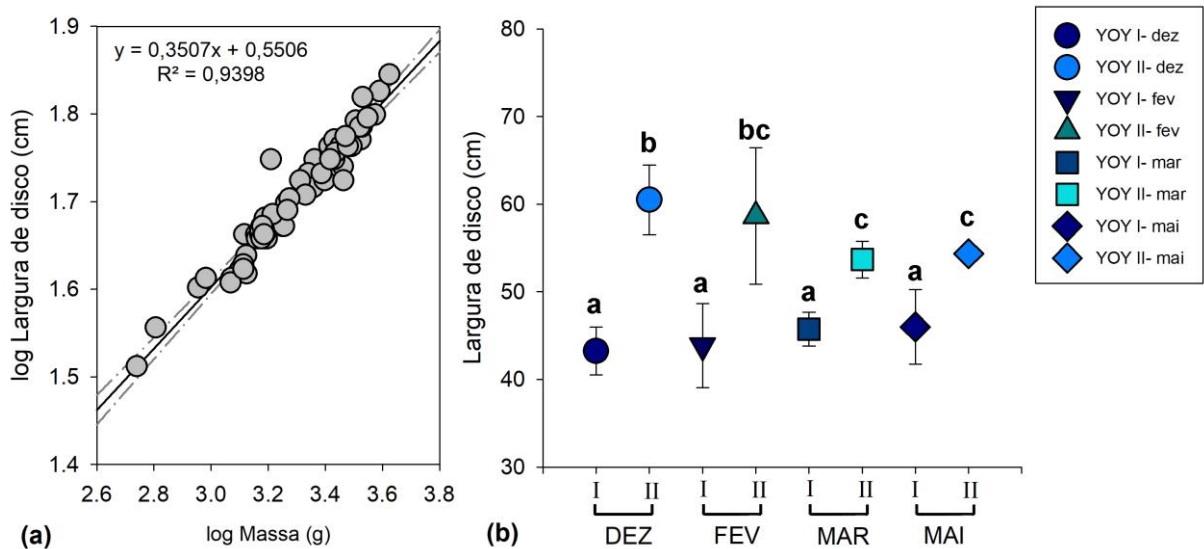
quaisquer indícios de marca do cordão umbilical. Os menores indivíduos capturados (alguns com a marca do cordão umbilical) foram registrados em dezembro (2015 e 2016) e fevereiro (2017). A única captura de indivíduos adultos ocorreu em fevereiro (2017), juntamente com neonatos no mesmo arrasto, sugerindo que o local de forrageio dessa classe de idade seja diferente da área dos YOY.



**Figura 9-** Marca do cordão umbilical (seta) em neonatos de *R. bonasus* capturados em (A) janeiro de 2016 e (B) em fevereiro de 2017.

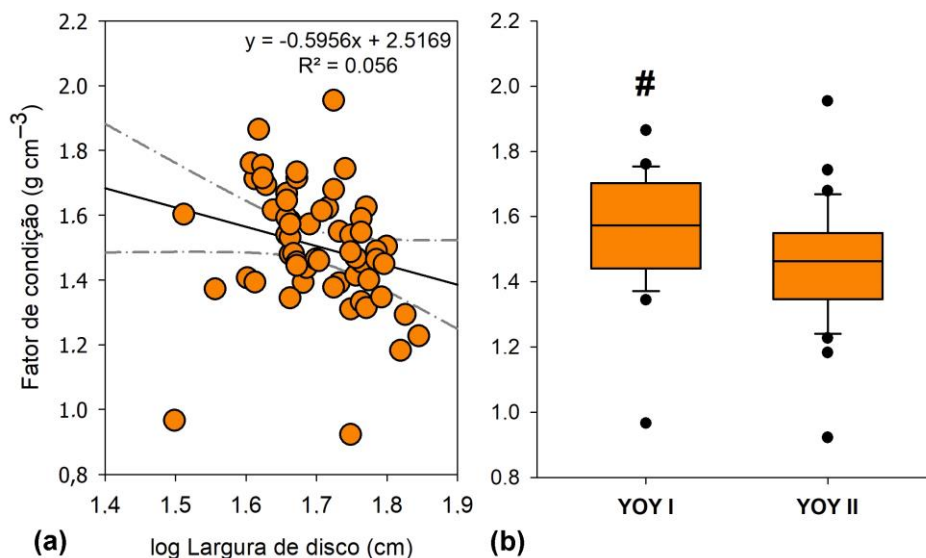
Ao considerar o LD e massa corpórea de *R. bonasus* observou-se uma forte correlação positiva entre as duas variáveis ( $r = 0.969$ ;  $p < 0.0001$ ; Figura 10a). Utilizando-se o critério do tamanho corporal para classificação das classes de idade ( $n=72$ ), o tamanho corporal de YOY I de *R. bonasus* foi entre  $43.7 \pm 4.34$  cm LD ( $n=38$ ) e YOY II entre  $57.3 \pm 4.68$  cm LD ( $n=34$ ) ( $p < 0.001$ ; Figura 10b). A massa corpórea variou entre  $1335.3 \pm 363.85$  g nos YOY I e  $2804.7 \pm 623.9$  g entre os YOY II ( $p < 0.001$ ).

De acordo com o tamanho corporal, foram encontrados YOY I em dezembro ( $43.3 \pm 2.71$  cm, LD), fevereiro ( $43.9 \pm 4.79$  cm, LD), março ( $45.8 \pm 1.94$  cm, LD) e maio ( $46.0 \pm 4.24$  cm, LD; Figura 10b). Os YOY II encontrados em dezembro ( $60.5 \pm 3.97$  cm, LD) foram maiores que os encontrados em março ( $53.7 \pm 2.10$  cm, LD) e maio ( $54.3 \pm 0.57$  cm, LD;  $p < 0.05$ ), e aqueles coletados em fevereiro ( $58.7 \pm 7.78$  cm LD) não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos outros meses.



**Figura 10-** (a) Relação da largura de disco (cm) e massa corpórea (g) de *R. bonasus*. (b) Largura de disco (cm) de YOY I e II durante os meses de amostragem. <sup>abc</sup> indicam diferença significativa entre YOY I e YOY II ao longo dos meses (dezembro, fevereiro, março e maio) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Analisando CF de Fulton (Apêndice 1), observou-se uma fraca correlação negativa em relação a LD ( $r = -0.237$ ;  $p = 0.0687$ ; Figura 11a). Separando os grupos, o CF foi maior em YOY I ( $1.6 \pm 0.18$ ) quando comparados a YOY II ( $1.7 \pm 0.19$ ;  $p = 0.048$ ; Figura 11b).



**Figura 11-** (a) Correlação de Pearson entre fator de condição (CF) e largura do disco (LD, cm). (b) Fator de condição de YOY I e YOY II de *Rhinoptera bonasus*. # indicam diferença estatística significativa (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).

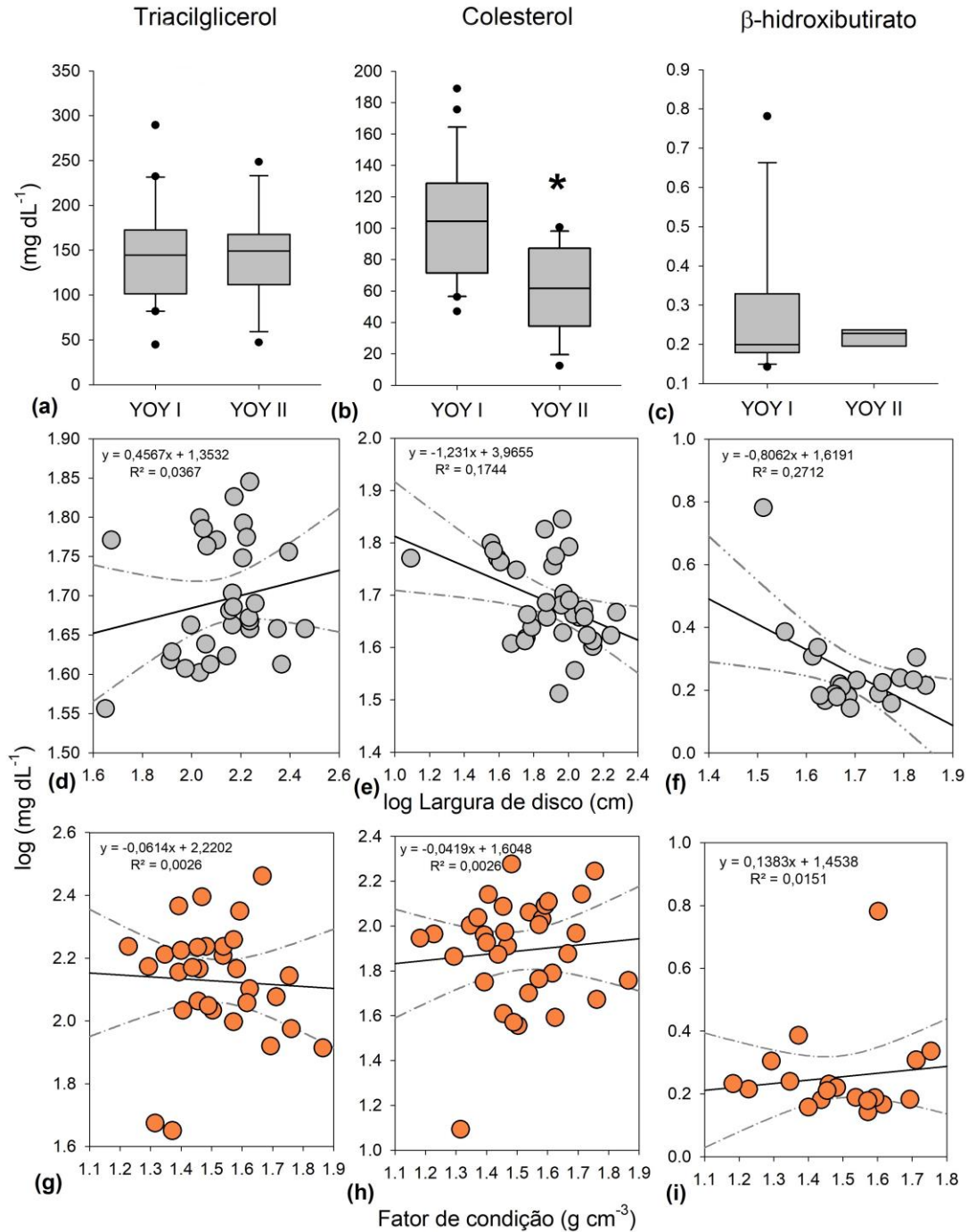
O tamanho corporal de exemplares de *R. brasiliensis* coletados no mês de março ( $54.0 \pm 2.57$  cm, LD;  $n = 8$ ) foi maior do que os animais coletados em dezembro ( $44.8 \pm 1.13$  cm,

LD;  $p = 0.003$ ;  $n = 2$ ), janeiro ( $48.0 \pm 4.91$  cm, LD;  $p = 0.034$ ;  $n = 4$ ) e maio ( $35.5$  cm, LD;  $n = 1$ ). A massa corpórea de *R. brasiliensis* foi medida apenas em março ( $2346.7 \pm 464.27$  g).

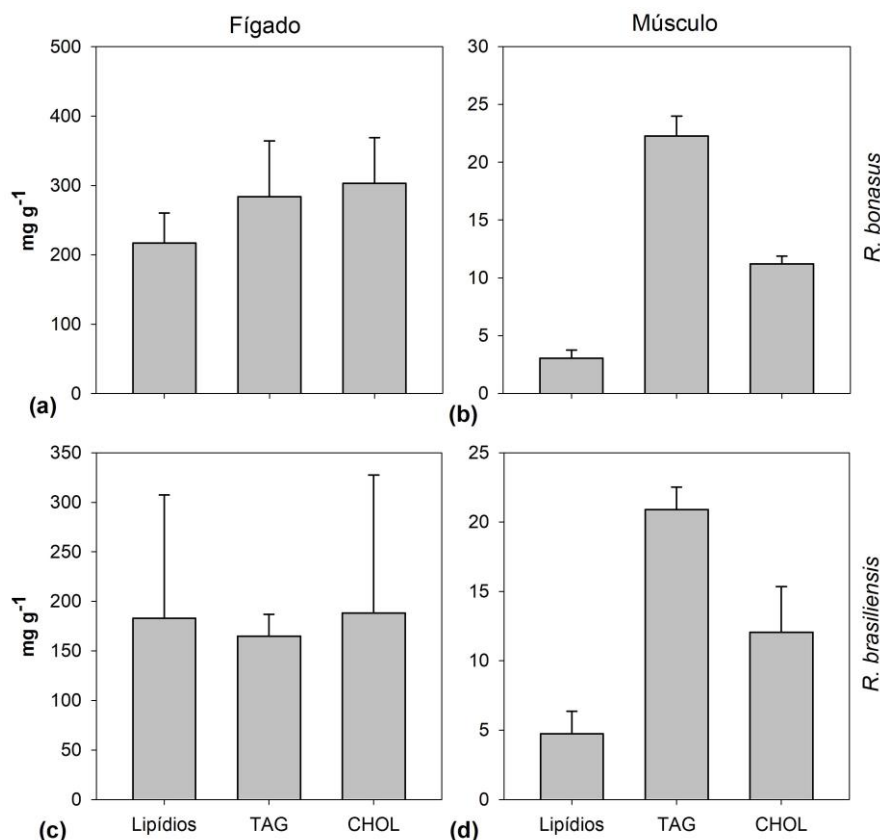
#### 4.2. Lipídios plasmáticos e teciduais

Não houve diferença estatística na concentração plasmática de TAG entre YOY I ( $145.5 \pm 59.49$  mg dL<sup>-1</sup>;  $n=19$ ) e YOY II ( $130.6 \pm 63.25$  mg dL<sup>-1</sup>;  $p = 0.465$ ;  $n=18$ ) (Figura 12a). Uma baixa correlação positiva foi encontrada entre TAG e LD ( $r = 0.123$ ;  $p = 0.302$ ; Figura 12d), e nenhuma correlação entre TAG e CF ( $r = -0.051$ ;  $p = 0.786$ ; Figura 12g). A concentração de CHOL foi maior em YOY I ( $98.89 \pm 40.24$  mg dL<sup>-1</sup>) quando comparados com YOY II ( $66.7 \pm 30.55$  mg dL<sup>-1</sup>;  $p = 0.009$ ) (Figura 12b), e mostrou uma correlação negativa significativa com LD ( $r = -0.417$ ;  $p = 0.016$ ; Figura 12e). A concentração plasmática de CHOL não mostrou correlação com CF ( $r=0.091$ ;  $p = 0.613$ ; Figura 12h).

A concentração de  $\beta$ -HB não diferiu entre YOY I ( $0.27 \pm 0.17$  mg dL<sup>-1</sup>;  $n=12$ ) e YOY II ( $0.21 \pm 0.04$  mg dL<sup>-1</sup>;  $p = 0.316$ ;  $n=10$ ) (Figura 12c). Uma correlação negativa significativa foi encontrada entre  $\beta$ -HB e LD ( $r = -0.52$ ;  $p = 0.019$ ; Figura 12f) e uma fraca correlação positiva entre  $\beta$ -HB e CF ( $r = 0.12$ ;  $p = 0.605$ ; Figura 12i). As análises de lipídios totais, TAG e CHOL no músculo e fígado em *R. bonasus* (Figura 13a e b) e *R. brasiliensis* (Figura 13c e d) foram realizadas apenas em YOY do grupo I.



**Figura 11-** (a-c) Concentração plasmática de triacilglicerol, colesterol e  $\beta$ -hidroxibutirato (mg dL<sup>-1</sup>) de YOY I e YOY II de *R. bonasus*, respectivamente. (d-f) Correlação entre logaritmos triacilglicerol, colesterol e  $\beta$ -hidroxibutirato e largura do disco (LD). (g-i) Correlação entre logaritmos triacilglicerol, colesterol e  $\beta$ -hidroxibutirato e fator de condição de Fulton. \* indicam diferença estatística significativa pelo ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13-** (a) Concentração de lipídios totais, triglicérides (TAG) e colesterol (CHOL) ( $\text{mg g}^{-1}$ ) no fígado e (b) no músculo de YOY I de *R. bonasus*. (c) Concentração de lipídios totais, TAG e CHOL no fígado e (d) no músculo de *R. brasiliensis*.

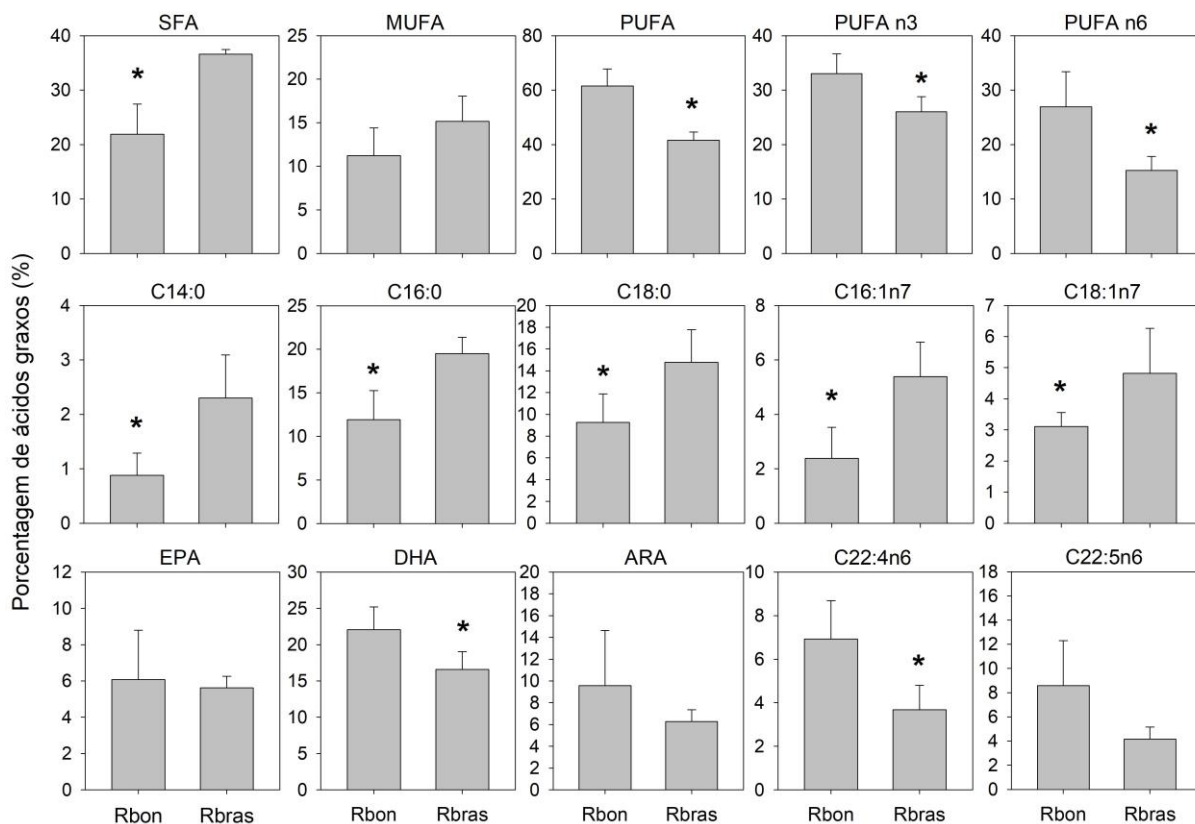
### 4.3. Ácidos graxos plasmáticos e teciduais

Foram analisados o perfil de FA do fígado ( $n=6$ ) dos animais que eventualmente morreram durante a captura, do plasma ( $n=20$ ) e músculo ( $n=48$ ) de *R. bonasus* e fígado ( $n=5$ ) e músculo ( $n=8$ ) de *R. brasiliensis*. Foi observada uma variação no perfil dos FA entre YOY I e II de *R. bonasus* e entre *R. bonasus* e *R. brasiliensis* ( $p < 0.05$ ), como descrito mais detalhadamente abaixo.

O fígado de *R. bonasus* apresentou maior porcentagem de PUFA, seguido dos SFA e MUFA. Em ordem de abundância encontra-se o DHA seguido de C16:0, ARA, C18:0 e C22:5n6 (Figura 14, Apêndice 2). O fígado de *R. brasiliensis* também apresentou maior porcentagem de PUFA, seguido de SFA e MUFA, e em ordem de abundância estão o C16:0, DHA e C18:0 seguidos de ARA e EPA (Apêndice 2).

Comparando-se os FA do fígado entre YOY I das duas espécies (Figura 14, Apêndice 2), encontramos que *R. bonasus* apresentou valores mais elevados de PUFA ( $p < 0.001$ ), PUFA n3 ( $p = 0,011$ ) e PUFA n6 ( $p = 0,009$ ) quando comparado à *R. brasiliensis* que

apresentou valores mais elevados de SFA ( $p < 0,001$ ). *R. bonasus* apresentou maiores porcentagens de DHA ( $p = 0,019$ ) e C22:4n6 ( $p = 0,012$ ), e menores de C16:0 ( $p = 0,003$ ), C18:0 ( $p = 0,015$ ), C16:1n7 ( $p = 0,005$ ), C18:1n7 ( $p = 0,024$ ) e C14:0 ( $p = 0,010$ ) comparando à *R. brasiliensis*. Os índices tróficos C16:1n7/C16:0, DHA/EPA e C18:1n9/C18:1n7 não mostraram diferenças estatísticas significativas. Dos índices de condição nutricional, o n3/n6 e ARA/EPA não mostraram diferença entre os YOY (Apêndice 2).

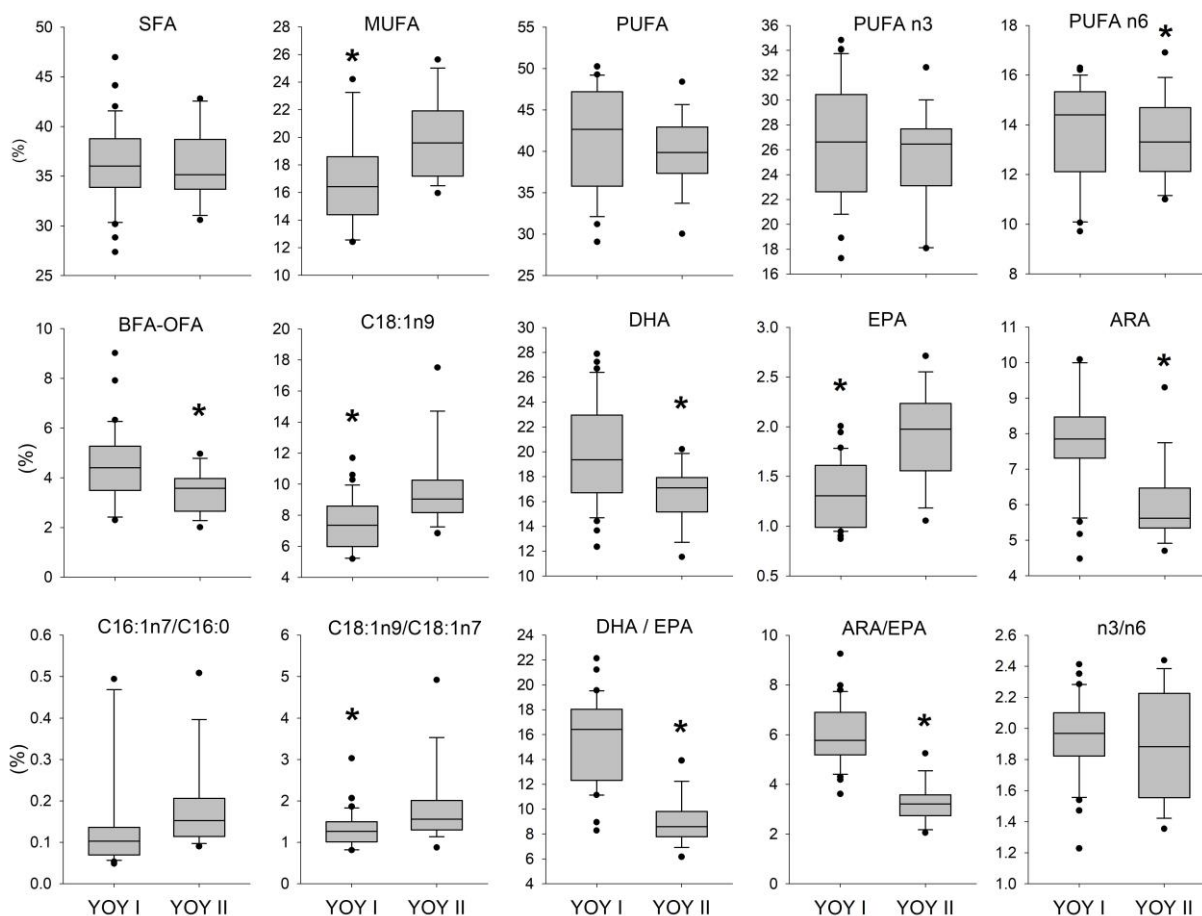


**Figura 14-** Perfil de ácidos graxos do fígado de *R. bonasus* (Rbon) e *R. brasiliensis* (Rbras) agrupados em ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), e alguns ácidos graxos individuais. \* indicam diferença estatística significativa entre as espécies (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).

O músculo de *R. bonasus* (Figura 15; Apêndice 3) também apresentou predomínio de PUFA, seguido dos SFA e MUFA. Em ordem de abundância encontra-se o DHA e C16:0, seguidos de C18:0, ARA e C18:1n9 (Apêndice 3). Observando-se os grupos, a porcentagem de MUFA total foi menor em YOY I que em YOY II ( $p = 0.003$ ). Dos FA individuais, YOY I apresentaram maiores porcentagens de DHA ( $p = 0.004$ ) e ARA ( $p < 0.001$ ) e menores de EPA ( $p < 0.001$ ) e C18:1n9 ( $p < 0.001$ ) quando comparados aos YOY II (Figura 15). Os demais FA não mostraram diferença entre YOY I e YOY II. Uma forte correlação positiva foi encontrada entre LD e EPA, forte negativa entre LD e ARA e moderada positiva entre LD e



MUFA e C18:1n9 (Tabela 1). Uma moderada correlação positiva foi encontrada entre CF e DHA e C18:1n7, e moderada negativa entre CF e EPA (Tabela 1).



**Figura 15-** Perfil de ácidos graxos do músculo de YOY I e YOY II de *R. bonasus*. \* indicam diferença estatística significativa (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).

O índice trófico C16:1n7/C16:0 não apresentou diferença entre YOY I e II ( $p = 0.107$ ; Figura 15), nem correlação com LD e CF. O marcador de nível trófico DHA/EPA foi maior em YOY I que YOY II ( $p < 0.001$ ; Figura 15) e mostrou uma forte correlação negativa com LD e positiva com CF (Tabela 1). O C18:1n9/C18:1n7 foi maior em YOY II que em YOY I ( $p = 0.011$ ; Figura 15) e mostrou moderada correlação negativa com CF (Tabela 1). Dos índices de condição nutricional, o n3/n6 não mostrou diferença entre os YOY ( $p = 0.605$ ; Figura 15), nem correlação com LD, mas mostrou moderada correlação positiva com CF (Tabela 1). O ARA/EPA foi maior em YOY I que em YOY II ( $p < 0.001$ ; Figura 15) e mostrou uma forte correlação negativa com LD (Tabela 1) e baixa correlação com CF.



**Tabela 1-** Coeficientes de correlação de Pearson entre largura de disco (LD) e fator de condição (CF) e os principais ácidos graxos no plasma e músculo de *R. bonasus*. Letras em negrito representam diferenças estatísticas.

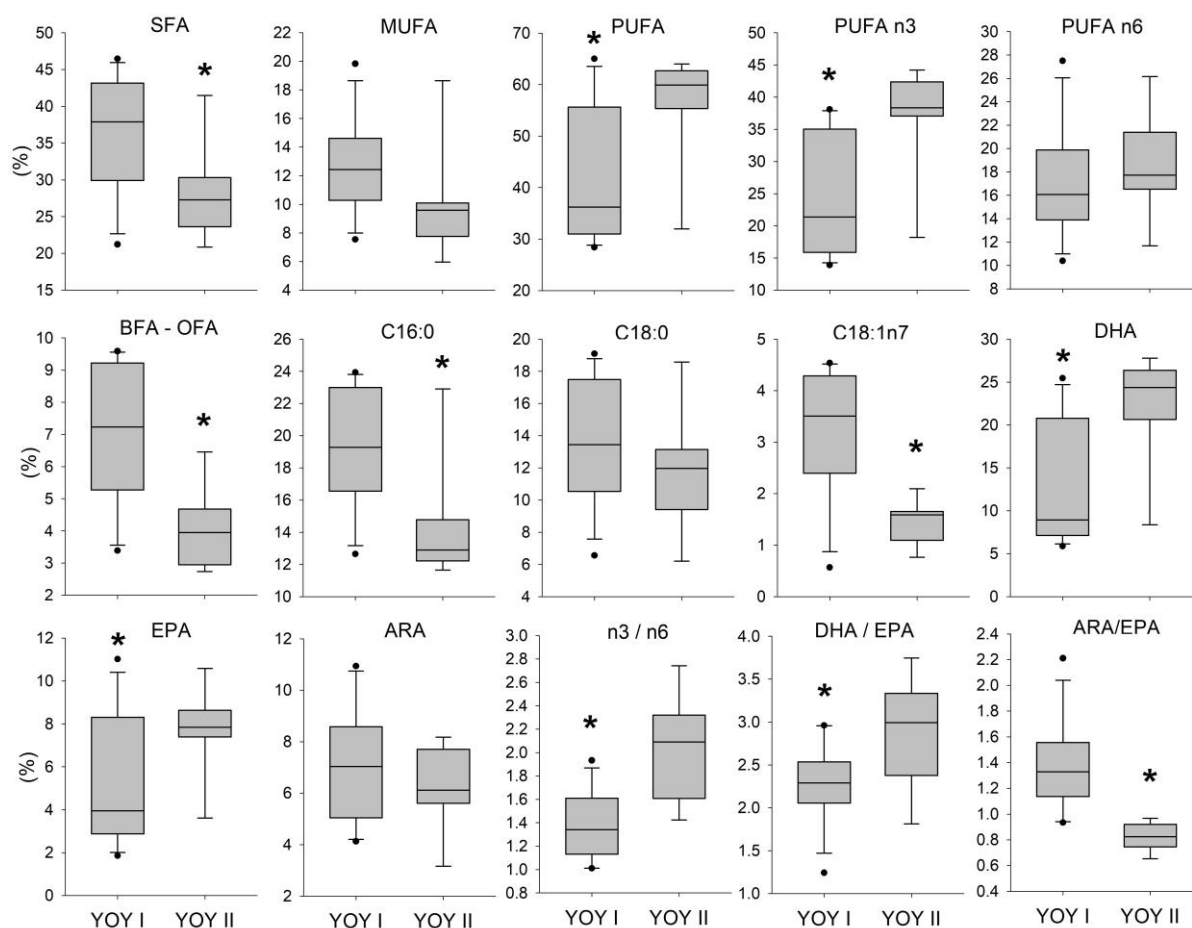
Ácidos graxos	Músculo				Plasma			
	LD		CF		LD		CF	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
SFA	-	-	-	-	-0.48	<b>0.027</b>	-	-
MUFA	0.30	<b>0.040</b>	-	-	-0.48	<b>0.026</b>	-	-
PUFA	-	-	-	-	0.53	<b>0.014</b>	-	-
PUFA n3	-	-	-	-	0.58	<b>0.005</b>	-	-
BFA/OFA	-	-	-	-	-0.62	<b>0.003</b>	-	-
C16:0	-	-	-	-	-0.54	<b>0.012</b>	-	-
C18:1n7	-	-	<b>0.43</b>	<b>0.006</b>	-0.34	0.137	-	-
C18:1n9	0.32	<b>0.024</b>	-	-	-	-	-	-
DHA	-	-	0.42	<b>0.007</b>	0.57	<b>0.007</b>	-	-
EPA	0.52	<b>&lt;0.0001</b>	-0.31	0.064	0.52	<b>0.016</b>	-0.36	0.122
ARA	-0.54	<b>&lt;0.0001</b>	-	-	-	-	-	-
C18:1n9/C18:1n7	-	-	-0.47	<b>0.002</b>	-	-	-	-
DHA/EPA	-0.64	<b>&lt;0.0001</b>	0.50	<b>0.001</b>	0.34	0.168	-	-
ARA/EPA	-0.77	<b>&lt;0.0001</b>	-	-	-0.80	<b>&lt;0.0001</b>	0.42	0.065
n3/n6	-	-	0.45	<b>0.003</b>	0.63	<b>0.002</b>	-	-

Diferentemente, o músculo de *R. brasiliensis* foi denominado por SFA, seguido dos PUFA e MUFA, e em ordem de abundância estão o C16:0, C18:0, DHA seguidos de C18:1n9, C18:1n7 (Apêndice 3). Comparando-se os ácidos graxos do músculo de YOY I entre as duas espécies, encontramos valores mais elevados de SFA em YOY I de *R. brasiliensis* ( $p = 0.009$ ) e MUFA ( $p = 0.041$ ) quando comparado à *R. bonasus* que apresentou valores mais elevados de PUFA ( $p = 0.006$ ), PUFA n3 ( $p = 0.030$ ) e PUFA n6 ( $p = 0.002$ ) (Apêndice 3). Além destes, a *R. bonasus* apresentou maiores porcentagens de DHA ( $p = 0.029$ ) e ARA ( $p < 0.001$ ) que *R. brasiliensis*, que apresentou maiores porcentagens de C16:0 ( $p = 0.021$ ) e C18:1n7 ( $p = 0.001$ ). Dos marcadores tróficos, *R. bonasus* apresentou maiores valores de DHA/EPA ( $p = 0.003$ ) e menores de C16:1n7/C16:0 ( $p = 0.019$ ) que *R. brasiliensis*. Dos índices de condição, *R. bonasus* apresentou maiores porcentagens de ARA/EPA ( $p < 0.001$ ) que *R. brasiliensis* (Apêndice 3).

A composição de FA plasmático de *R. bonasus* (Figura 16; Apêndice 4) mostrou uma predominância total de PUFA, com maiores proporções de PUFA n3 que PUFA n6, seguido de SFA. O grupo YOY I apresentou maior abundância dos FA C16:0, C18:0, DHA, ARA e EPA e o grupo YOY II dos FA DHA, C16:0, C18:0, EPA e ARA. Comparando-se os dois grupos, YOY II apresentou maiores porcentagens PUFA ( $p = 0.0010$ ) e PUFA n3 ( $p = 0.002$ )

que YOY I. Contrariamente o SFA foi maior em YOY I que em YOY II ( $p = 0.016$ ). Dos FA individuais, YOY II apresentou maiores porcentagens de DHA ( $p = 0.004$ ) e EPA ( $p = 0.047$ ) e menores de C16:0 ( $p = 0.005$ ) e C18:1n7 ( $p < 0.001$ ) quando comparados com YOY I (Figura 16). Os demais FA não mostraram diferença entre YOY I e YOY II (Apêndice 4).

Uma forte correlação positiva foi encontrada entre LD e PUFA, PUFA n3, DHA e EPA e uma forte correlação negativa entre LD e C16:0 e FA ímpar - ramificados (BFA - OFA) (Tabela 1). Além disso, foi encontrada uma moderada correlação negativa entre LD e SFA, MUFA (Tabela 1). Os demais apresentaram uma fraca correlação. Analisando-se o FC, nenhum FA mostrou correlação forte ou moderada.



**Figura 16-** Perfil de ácidos graxos do plasma de YOY I e YOY II de *R. bonasus*, \* indicam diferença estatística significativa (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).

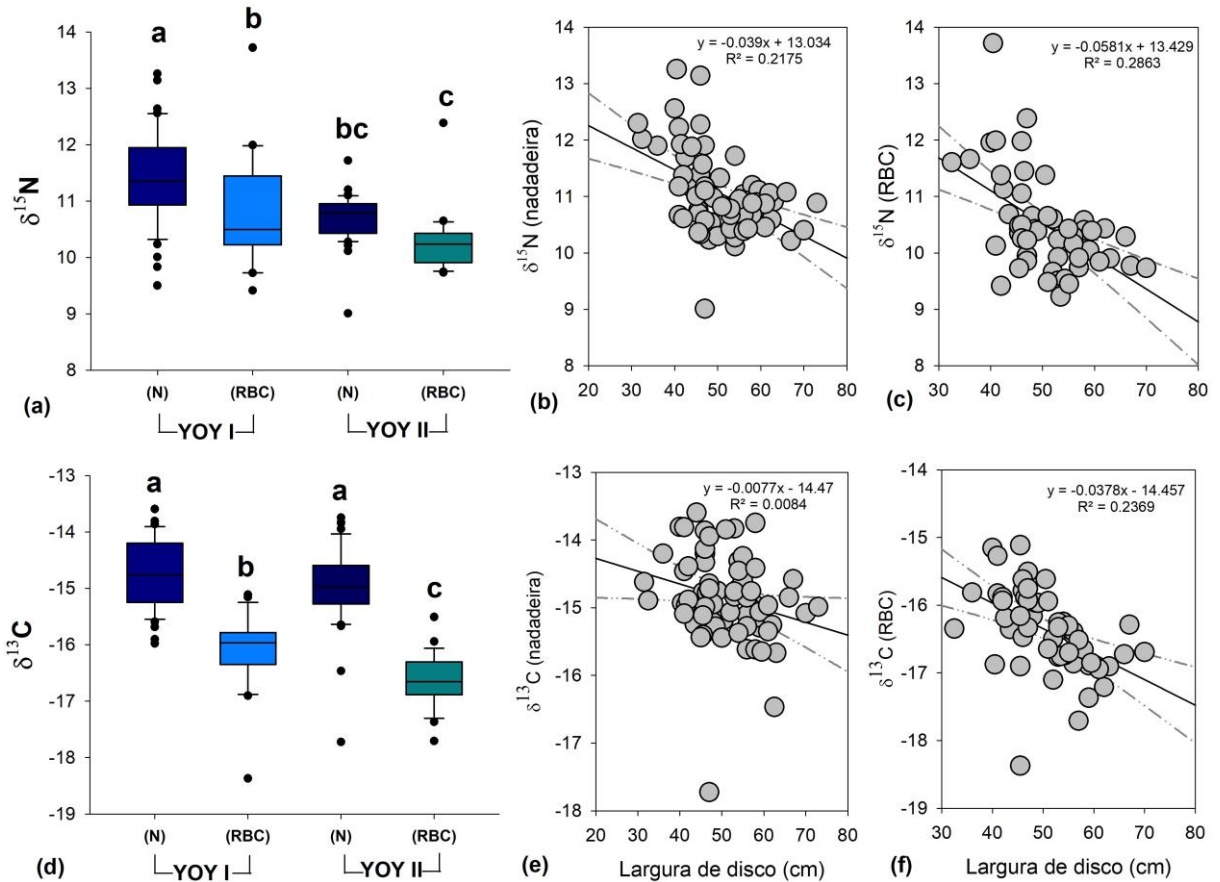
A razão trófica C16:1n7/C16:0 não apresentou diferença entre YOY I e II ( $p = 0.830$ ) (Apêndice 4) nem correlação com LD e CF. O marcador de nível trófico DHA/EPA foi maior em YOY II que YOY I ( $p = 0.015$ ; Figura 16) e mostra moderada correlação com LD (Tabela 1) e baixa com CF. A razão C18:1n9/C18:1n7 não mostrou diferença entre os YOY

( $p = 0.323$ ; Figura 16) nem correlação com LD e CF (Apêndice 4). Dos índices de condição nutricional, o  $n3/n6$  foi maior em YOY II que em YOY I ( $p < 0.001$ ; Figura 16), mostrando uma forte correlação positiva com LD (Tabela 1) e baixa correlação negativa com CF. O ARA/EPA foi maior em YOY I do que em YOY II ( $p < 0.001$ ) e mostrou uma forte correlação negativa com LD e moderada positiva com CF (Tabela 1).

#### 4.4. Isótopos estáveis

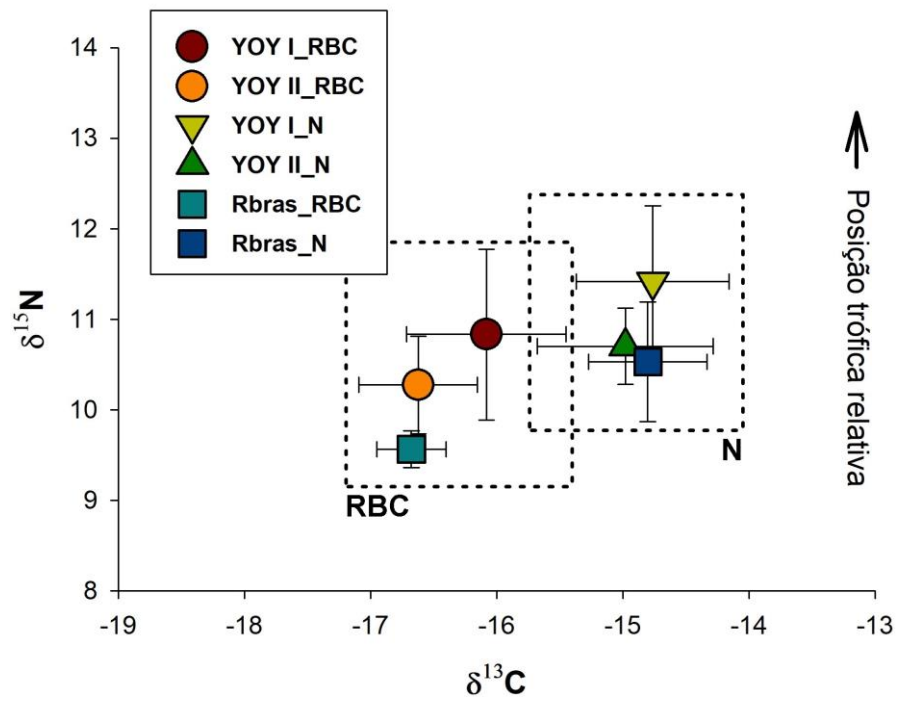
Foram analisadas hemácias (RBC;  $n = 50$ ) e fragmentos da nadadeira dorsal ( $n = 84$ ) de *R. bonasus* e RBC ( $n = 8$ ) e nadadeira dorsal ( $n = 13$ ) de *R. brasiliensis*. YOY I de *R. bonasus* apresentaram altos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nas RBC ( $10.8 \pm 0.94\text{‰}$ ) quando comparados a YOY II ( $10.3 \pm 0.54\text{‰}$ ) (ANOVA,  $p = 0.029$ ), e maiores na nadadeira ( $11.42 \pm 0.84\text{‰}$ ), comparado a YOY II ( $10.7 \pm 0.42\text{‰}$ ) ( $p < 0.001$ ) (Figuras 17c e 18). Em YOY I, o  $\delta^{15}\text{N}$  da nadadeira foi mais enriquecido que das RBC ( $p = 0.005$ ), no entanto em YOY II não há diferença entre os valores ( $p = 0.093$ ). O  $\delta^{15}\text{N}$  apresentou forte correlação negativa com LD nas RBC ( $r = -0.55$ ;  $p < 0.0001$ ; Figura 17c) e moderada negativa na nadadeira com LD ( $r = -0.48$ ;  $p < 0.0001$ ; Figura 17b). O  $\delta^{15}\text{N}$  das RBC mostrou forte correlação positiva com o marcador trófico de FA DHA/EPA muscular ( $r = 0.60$ ;  $p = 0.0003$ ) e moderada positiva entre o  $\delta^{15}\text{N}$  da nadadeira e DHA/EPA ( $r = 0.49$ ;  $p = 0.0007$ ).

Para o  $\delta^{13}\text{C}$  não há diferenças na nadadeira de YOY I ( $-14.8 \pm 0.61\text{‰}$ ) e YOY II ( $-14.9 \pm 0.69\text{‰}$ ) ( $p = 0.374$ ), no entanto nas RBC o  $\delta^{13}\text{C}$  foi maior em YOY I ( $-16.1 \pm 0.63\text{‰}$ ) que em YOY II ( $-16.6 \pm 0.47\text{‰}$ ) ( $p = 0.012$ ). O  $\delta^{13}\text{C}$  da nadadeira foi mais enriquecido que das RBC para YOY I e YOY II ( $p < 0.001$ ) (Figura 17d e 18). O  $\delta^{13}\text{C}$  apresentou moderada correlação negativa com LD nas RBC ( $r = -0.48$ ;  $p = 0.0002$ ; Figura 17f) e fraca negativa na nadadeira ( $r = -0.21$ ;  $p = 0.041$ ; Figura 17e). A relação de carbono e nitrogênio (C:N) em amostras das RBC foi de  $2.5 \pm 0.19\text{‰}$ , para YOY I e  $2.5 \pm 0.14\text{‰}$  para YOY II, evidenciando que não foram significativamente diferentes ( $p = 0.137$ ). Em amostras da nadadeira a razão foi maior em YOY I ( $2.6 \pm 0.12\text{‰}$ ) que para YOY II ( $2.5 \pm 0.15\text{‰}$ ) ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17-** Valores de Isótopos estáveis de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  de *R. bonasus* expressos em ‰. **(a)** valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das hemácias (RBC) e nadadeira (N) para YOY I e YOY II e correlações ente largura de disco (LD) com **(b)**  $\delta^{15}\text{N}$  da nadadeira e **(c)**  $\delta^{15}\text{N}$  das hemácias (RBC). **(d)** valores de  $\delta^{13}\text{C}$  das hemácias (RBC) e nadadeira (N) para YOY I e YOY II e correlações ente largura de disco (LD) com **(e)**  $\delta^{13}\text{C}$  da nadadeira e **(f)**  $\delta^{13}\text{C}$  das hemácias (RBC). <sup>abc</sup> indicam diferença estatística significativa entre os tecidos e entre YOY I e YOY II (ANOVA seguida pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).

Da mesma forma que encontrado em *R. bonasus*, em YOY I de *R. brasiliensis*, a nadadeira apresentou valores mais enriquecidos de  $\delta^{15}\text{N}$  ( $10.5 \pm 0.66\%$ ) e  $\delta^{13}\text{C}$  ( $-14.8 \pm 0.47\%$ ) quando comparados às RBC ( $9.5 \pm 0.20\%$  e  $-16.7 \pm 0.28\%$ , respectivamente) ( $p < 0.001$ ) (Figura 18). A relação de carbono e nitrogênio (C:N) em amostras de RBC foi de  $2.4 \pm 0.06\%$  e na nadadeira de  $2.5 \pm 0.11\%$ . Comparando-se as duas espécies, *R. brasiliensis* apresentou menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (menores níveis tróficos) e  $\delta^{13}\text{C}$  nas RBC que YOY I e YOY II de *R. bonasus* ( $p < 0.001$ ). No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas no tecido da nadadeira entre as duas espécies.



**Figura 18-** Valores de isótopos estáveis de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  expressos em ‰ nas células do sangue (RBC) e nadadeira (N) de jovens do ano YOY I e YOY II de *R. bonasus* e para YOY I de *R. brasiliensis* (Rbras). Maiores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  indicam maiores posições tróficas na cadeia alimentar, revelando um nível trófico superior para *R. bonasus* em comparação à *R. brasiliensis*.

## 5. Discussão

---

Este é o primeiro trabalho que descreve a estratégia nutricional no início do ciclo de vida em raias com alto grau de investimento materno e sobre o uso de área de berçário por filhotes de *R. bonasus* e *R. brasiliensis* no sudeste do Brasil. Estas informações são importantes para a compreensão de processos ligados ao investimento energético dos filhotes e, conseqüentemente, os padrões de alocação de energia e implicações na alimentação nesta fase inicial da vida. O presente trabalho traz uma contribuição para a área da fisiologia de elasmobrânquios, interações tróficas em área de berçário e sobre a estratégia reprodutiva histotrofia lipídica, uma vez que, apesar de algumas raias apresentarem um notável e complexo ciclo de vida, os processos fisiológicos ligados à dinâmica reprodutiva e às adaptações associadas à relação trófica materno-fetal e fase neonatal não tem sido investigados. De forma geral, recém-nascidos parecem apresentar biomarcadores específicos, que nos permite não somente a separação entre os grupos de YOY, mas também qualificar o investimento materno durante o período pré-natal, identificar as mudanças na qualidade da dieta e a perda do sinal materno (isotópico e de FA). A escassez das informações sobre parâmetros nutricionais de raias encaminhou a discussão dos dados aqui obtidos com aqueles disponíveis para outro grupo dentro dos elasmobrânquios, os tubarões.

### 5.1. *Uso da área de berçário*

Em espécies migratórias, a área usada como berçário é geograficamente separada da área de alimentação utilizada pelos adultos (Springer, 1967). Estas áreas são localizadas geralmente em regiões costeiras ou estuarinas, onde há proteção contra predadores e alimento abundante, permitindo a permanência do filhote durante os primeiros meses ou até anos de vida (Castro, 1993; Heupel *et al.*, 2007). O registro dos recém-nascidos em três anos consecutivos (2015, 2016 e 2017) e a permanência dos filhotes durante o ano, confirmam os critérios proposto por Heupel *et al.* (2007) para classificação de área de berçário de elasmobrânquios. Deste modo, podemos concluir que a região de Bertioaga, local de estudo do presente trabalho, funciona como área de berçário para as espécies *R. bonasus* e possivelmente para *R. brasiliensis*.

Ainda não se conhece o ciclo reprodutivo de *R. bonasus* na região de estudo, no entanto, o registro de YOY I somente durante o final da primavera e verão sugerem que o

ciclo seja anual. Estas informações indicam ainda que as fêmeas grávidas migram para próximo a esta região na primavera, e o parto ocorre no final da primavera e início do verão, como visto em outros estudos (Smith e Merriner; 1986; Fisher *et al.*, 2013). Informações sobre a biologia e captura de *R. bonasus* são raras no Brasil. A presença de neonatos e YOY foi pontualmente registrada apenas no Paraná (Bornatowski *et al.*, 2014) e no Rio Grande do Norte (Yokota e Lessa, 2006; Lessa *et al.*, 2016).

Dados de capturas de *R. brasiliensis* foram registrados no Rio Grande do Sul, durante o verão, entre os anos de 1982 – 1985 (Vooren e Lamónaca, 2004). Não há registros de capturas de recém-nascidos no Rio Grande do Sul, sugerindo que o parto e a área de berçário ocorram em alguma região mais ao norte (Vooren e Lamónaca, 2004). Fêmeas grávidas foram esporadicamente capturadas no Guarujá, São Paulo (Domingues *et al.*, 2009), região próxima à área de estudo. No entanto, o registro de neonatos e YOY para a espécie é raro, com registros apenas no presente estudo no sudeste, e de 26 indivíduos capturados recentemente em Santa Catarina (Moraes *et al.*, em revisão).

No presente estudo foram capturados filhotes de *R. brasiliensis* medindo 35.5 – 58.5 cm de LD. O menor filhote registrado foi capturado no mês de maio/2016. Estes dados, em conjunto com a informação da captura de uma fêmea grávida no mês de março e um neonato no mês de outubro (Domingues *et al.*, 2009), assim como fêmeas grávidas em meio de gestação, no mês de janeiro no Rio Grande do Sul (Vooren e Lamónaca, 2004) indicam que a época do parto e ciclo reprodutivo possa ser diferente do encontrado para *R. bonasus*. No entanto, mais estudos com a espécie são necessários, em todo ciclo reprodutivo.

Estas raias apresentam grande diferença no tamanho no nascimento, de 27-48 cm LD (McEachran e Carvalho, 2002; Domingos *et al.*, 2009; Fisher *et al.*, 2010), e consequentemente diferentes taxas de crescimento, o que dificulta a classificação da idade apenas utilizando o tamanho corporal como variável. Além disso, o uso da marca do cordão umbilical para identificar neonatos, como é utilizado para tubarões (Duncan e Holland, 2006; Hussey *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012), mostrou-se ineficiente. O modo reprodutivo de *Rhinoptera* spp. é caracterizado pelo consumo total de vitelo pelo embrião ainda no meio do desenvolvimento (Fisher, 2010), ou seja, quando os filhotes nascem, a marca do cordão umbilical já está cicatrizada, e na maioria dos indivíduos não são mais visíveis.

Um estudo de idade e crescimento para *R. bonasus* verificou que animais medindo  $41.9 \pm 4.05$  cm LD foram classificados com idade entre 0 e 1 mês, os com  $50.5 \pm 3.8$  cm LD com 4 meses, e entre  $64.5 \pm 5.9$  cm LD com 1 ano (Fisher *et al.*, 2013). Esta mesma

classificação parece ser viável e de acordo com o que foi observado no presente estudo. Animais com idade entre 0 e 1 mês (de acordo com a classificação morfométrica) foram observados com maior frequência nos meses de dezembro e fevereiro; animais com aproximadamente 4 meses foram coletados em março e maio; e aqueles com idade de 1 ano, coletados em dezembro e fevereiro. No entanto, como não foram realizadas análises de idade e crescimento, foi utilizada a separação entre os grupos YOY I e YOY II para considerar os filhotes mais novos e mais velhos, independente da época do ano em que foram coletados.

Devido às dificuldades de gerenciamento de populações de tubarões e raias por estratégias convencionais utilizadas para teleósteos, como limites de tamanho (por classe de idade), regulamentos de artes de pesca e cotas (Heithaus, 2007), a gestão de áreas utilizadas durante fases críticas do ciclo de vida destes animais é atraente para a conservação destas populações. O uso repetido desta área pela *R. bonasus* sugere que ela é potencialmente importante para a história de vida desta espécie. Pequenos aumentos na mortalidade por aumento da pesca ou outros estressores antropogênicos podem ter um efeito desproporcionalmente grande sobre a viabilidade de populações (Walters e Martell, 2004), especialmente em fases importantes do ciclo de vida (Hussey *et al.*, 2010).

Por ser uma região com alto impacto antropogênico (Gonçalves *et al.*, 2013), estudos sobre os contaminantes e o impacto das mudanças climáticas são necessários nestes locais, visto que o abandono prematuro de jovens do berçário pode prejudicar a sobrevivência, expondo estes animais a uma pressão de predação mais severa (Springer, 1967), bem como desafios energéticos dos quais ainda não estão preparados para enfrentar. Adicionalmente, a permanência por mais tempo nas áreas de berçário pode desencadear competição entre os jovens (> 1 ano de idade) e os recém-nascidos.

## **5.2. Lipídios e índice de condição corpórea**

Ao contrário dos mamíferos e muitos teleósteos, o tecido adiposo está ausente em elasmobrânquios e o fígado é o principal local de estoque, bem como um importante local de síntese de lipídios (Ballantyne, 1997). As raias do presente estudo claramente apresentaram um maior acúmulo de lipídios no fígado (79 - 321 mg g<sup>-1</sup>) do que no músculo (2.2 – 5.7 mg g<sup>-1</sup>), e foram semelhantes entre as duas espécies. O duplo papel do fígado de elasmobrânquios no armazenamento e auxílio na flutuabilidade pode influenciar a mobilização e padrões de lipídios (Speers-Roesch e Treberg, 2010). Atrelado a isto, raias bentopelágicas podem apresentar regulações de flutuabilidade mais complexas que podem não ser muito claras, e



dependentes de uma série de fatores que possam influenciar a quantidade e composição de lipídios no fígado e variabilidade entre os indivíduos.

O declínio do CF com o aumento do tamanho corporal, entre YOY I e II de *R. bonasus* no presente estudo, presume os filhotes nascem com reservas hepáticas provisionadas pela mãe durante o período pré-natal, e que possivelmente são consumidas até que os filhotes iniciem o forrageamento, assim como já visto para tubarões *Carcharhinus obscurus* e *Sphyrna lewini* (Duncan e Holland, 2006; Hussey *et al.*, 2010). Em tubarões, esta reserva é usada durante as primeiras semanas até alguns meses de vida, uma vantagem materna que permite aos animais se adequarem até que tenham desenvolvido habilidades de forrageio (Hussey *et al.*, 2010; Belicka *et al.*, 2012). Apesar do CF seguir a mesma tendência do índice hepatossomático (Hoffmayer *et al.*, 2006), estudos analisando ambos índices biométricos nesta fase de crescimento dos filhotes ajudariam a confirmar tal observação.

O estoque energético adicional, provindo da alocação de recursos maternos pré-natais, parece auxiliar no rápido crescimento observado nesta raia. *R. bonasus* cresce mais rapidamente no início da vida, até 10 cm LD nos primeiros 4 meses e mais de 20 cm LD em um ano, considerando que chegam aos  $92.4 \pm 2.2$  cm LD aos aproximados 8 anos de idade (Fisher *et al.*, 2013). O rápido crescimento inicial parece ainda estar associado ao fato dos indivíduos ingerirem maiores quantidades de alimentos em relação ao peso corporal no primeiro ano de vida (Ajemian e Powers, 2012), que juntamente com reservas endógenas, parecem suportar o rápido crescimento. Observações em cativeiro confirmaram que os filhotes começam a se alimentar após 6 a 9 dias do nascimento, com perda de peso de 6.4% da massa nestes primeiros dias (Fisher *et al.*, 2014).

Corroborando estas informações de rápido crescimento, maiores concentrações de CHOL foram observadas no plasma de YOY I quando comparadas aos YOY II, podendo ser um indicador de maior mobilização entre os tecidos, visto que o CHOL é essencial na composição das membranas celulares, ou então que YOY I ingerem alimentos com contendo mais CHOL. A fraca correlação do CHOL com o CF indica que este composto parece não ter muita relação com a condição corporal dos filhotes, mas talvez tenha relação com a alimentação intrauterina do histotrofo (rico em lipídios) (Hamlett *et al.*, 2005), ou mesmo adquirido da dieta, indicando uma maior ingestão de alimentos na fase inicial da vida. Apesar de elasmobrânquios apresentarem uma baixa quantidade de CHOL plasmático, comparado aos teleósteos (Larsson e Fange, 1977), ele tem sido relacionado à mudanças na dieta, tamanho corporal e maior atividade em tubarões (Valls *et al.*, 2016; Gallagher *et al.*, 2017).

Em contraste, o TAG não mostrou diferença entre os YOY de *R. bonasus*, e apresentou baixa correlação positiva com o tamanho corporal, indicando que passada a fase inicial de crescimento, os animais começam a aumentar sua capacidade de armazenamento de energia, diminuindo o catabolismo e possivelmente melhoram suas habilidades de forrageio. O TAG plasmático corresponde à mobilização de FA esterificados provenientes da dieta e/ou de outros tecidos, no entanto, o TAG também pode ser exportado do fígado como FA não esterificados ou seguir a  $\beta$ -oxidação hepática e cetogênese, como corpos cetônicos (Treberg *et al.*, 2006; Speers-Roesch e Treberg, 2010). Diferentemente do que foi encontrado em tubarões (Gallagher *et al.*, 2014), o TAG plasmático em filhotes de *R. bonasus* não mostrou correlação com CF, e isso pode ser devido à pouca quantidade de animais analisados, ou ao fato deste metabólito não ter relação com o CF na fase neonatal destas raias. Por ser adquirido de fontes exógenas (ingestão de alimentos) e endógenas (catabolismo de estoques energéticos) (Nelson e Cox, 2014), o CHOL e TAG plasmático refletem o estado metabólico momentâneo do indivíduo, e precisam ser interpretados com cautela. Porém mesmo com estas limitações, a análise destes metabólitos no plasma de YOY mostrou-se um método interessante e rápido para visualizar as variações no metabolismo energético ao longo do crescimento.

A concentração plasmática de  $\beta$ -HB mostrou correlação negativa com tamanho corporal em *R. bonasus*, podendo indicar que raias menores estejam mobilizando reservas do fígado e não estejam se alimentando com tanta eficiência como YOY II. Em elasmobrânquios, o  $\beta$ -HB é o principal combustível de alta energia, produzido a partir do acetil-CoA, por mitocôndrias de fígado e posteriormente exportados para tecidos periféricos para a oxidação (Ballantyne, 1997; Speers-Roesch e Treberg, 2010). Aumentos plasmáticos de  $\beta$ -HB em elasmobrânquios foram encontrados em animais em jejum, assim como visto em mamíferos, durante o catabolismo lipídico (Treberg *et al.*, 2006; Kajimura *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2010), e relacionados com variações sazonais na dieta (Valls *et al.*, 2016). No entanto, assim como encontrado para os outros metabólitos, o  $\beta$ -HB não mostrou relação com o CF. O  $\beta$ -HB, incluindo os outros corpos cetônicos, como acetoacetato e acetona, são substâncias solúveis em água que são produzidos no fígado, principalmente a partir da oxidação de ácidos graxos e são exportados para os tecidos periféricos para uso como fonte de energia (Nelson e Cox, 2014).

### 5.3. Perfil de ácidos graxos e mudanças ontogenéticas

A análise de FA revelou uma diferença significativa entre os YOY da *R. bonasus*, mostrando uma mudança ontogenética na dieta e uso do recurso materno transferido durante o período pré-natal. Filhotes menores (YOY I) apresentaram uma melhor condição nutricional que os maiores, devido a maior porcentagem de DHA e ARA, assim como observado para o índice de condição corpórea. Além disso, foram também observadas diferenças no perfil de FA entre as espécies *R. bonasus* e *R. brasiliensis*.

Dada à variedade estrutural e diferenças metabólicas, a deposição de FAs específicos pode variar entre os tecidos (Beckmann *et al.*, 2014b). Assim, a análise do perfil de FA em diferentes tecidos pode ajudar a elucidar padrões de mobilização e explorar mudanças na dieta ao longo do tempo (Every *et al.*, 2016). Estudos com elasmobrânquios têm demonstrado que MUFA são armazenados preferencialmente no fígado, e PUFA e SFA no músculo (Davidson e Cliff 2002; Pethybridge *et al.*, 2010). No presente estudo, foram encontradas proporções semelhantes dos FA totais no fígado, plasma e músculo de *R. bonasus*, que apresentou maiores proporções de PUFA (40 – 61 %), seguido de STA (28 – 37 %) e menores proporções de MUFA (10 – 20%), indicando que os FAs são retidos da dieta em proporções semelhantes nestes tecidos.

No fígado e músculo de YOY I de *R. bonasus* verificou-se uma predominância dos mesmos FA descritos para o histotrofo (Luer *et al.*, 1994), sendo eles DHA, C18:0, ARA e C16:0, assim, ao nascer, o perfil de FA parece refletir aquele da dieta intrauterina. Embriões alimentam-se do histotrofo durante a maior parte da gestação, com aumento de massa de até 3000 % (da massa inicial do ovo) (Wourms, 1981; Hamlett *et al.*, 1985), e possivelmente incorporam estes FA nestes tecidos para o uso em processos metabólicos nas fases finais da gestação. Um único estudo comparativo de transferência materno-fetal do substrato energético verificou que os FA são transferidos de forma conservada do vitelo para YOY de *Heterodontus portusjacksoni*, tendo pouca influência da dieta durante os 185 dias de experimento (Beckmann *et al.*, 2014a).

Diferenças na composição de FA do fígado entre *R. bonasus* e *R. brasiliensis* foram encontradas em todas as porções totais, em destaque para os PUFA, que foi maior em *R. bonasus* e apresentou 20% a mais que *R. brasiliensis*. Estes dados sugerem que, diferentes FA transferidos da mãe para os filhotes durante a fase pré-natal diferenciam entre as espécies, possivelmente porque a dieta das mães seja diferente ou a necessidade dos filhotes em relação aos FA seja diferente dependendo da espécie. Além disso, esta diferença pode indicar que as

duas espécies apresentam um metabolismo diferenciado, apesar de sua proximidade filogenética (Palacios-Barreto *et al.*, 2017), ou que *R. brasiliensis* tenha nascido há mais tempo, e seu perfil de FA hepático reflita a incorporação da dieta. Um acompanhamento em outros estágios do desenvolvimento e com mais indivíduos é necessário, visto que o para o fígado, poucos YOY I foram analisados.

O perfil de FA de YOY de *R. bonasus* revelou uma distinta estratégia nutricional neonatal adotada por estas raias, comparado ao que foi descrito em tubarões. Altas porcentagens de PUFA de cadeia longa (LC-PUFA, no inglês *long chain polyunsaturated fatty acid*) encontrados em YOY I confirmam o alto investimento materno de FA transferidos durante a gestação. Em contraste, filhotes de tubarões placentários nascem com baixa porcentagem de LC-PUFA, principalmente o ARA, DHA e EPA, indicando que durante a gestação, são fornecidos lipídios com baixos níveis de LC-PUFA ou então que os filhotes utilizam grande parte destes FA para o desenvolvimento intrauterino (Wai *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012). Tal estratégia reprodutiva contribui para que a mãe produza um número maior de filhotes, porém, minimizando o investimento de EFA em cada filhote (Musick e Ellis 2005; Wai *et al.*, 2011). O fato destas raias investirem em apenas um filhote e produzirem histotrofo rico em lipídios, pode permitir a mobilização seletiva de FA das reservas maternas, como visto em mamíferos marinhos (Iverson *et al.*, 1995).

O músculo tem sido descrito como melhor tecido para avaliar mudanças na dieta. Estudos com o tubarão da Groelândia (*Somniosus microcephalus*) encontraram que o perfil de FA do músculo foi proporcional ao encontrado nas presas, sugerindo uma incorporação de FA com pequenas modificações neste tecido (McMeans *et al.*, 2012). O mesmo foi encontrado em estudos experimentais com alimentação controlada por Beckmann *et al.* (2013), em que os FA da dieta foram preferencialmente utilizados e acumulados no tecido muscular do tubarão *H. portusjacksoni*. Quando crescem, os YOY de *R. bonasus* apresentam uma redução de DHA, ARA e PUFA n6, e um aumento de MUFA, C18:1n9 e EPA musculares. Contrariamente, nos tubarões placentários *Scoliodon laticaudus* e *Carcharhinus leucas*, é observado um aumento de PUFA, entre eles DHA e ARA com o aumento do tamanho corporal, juntamente com uma redução de MUFA total e C18:1n9, sugerindo que estes PUFA são obtidos da dieta após o nascimento (Wai *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012). Além disso, nos tubarões *C. leucas* foi verificada uma fase de deficiência nutricional, confirmada através das altas porcentagens de C20:3n9 e C18:1n9 em relação aos EFA (Belicka *et al.*, 2012). Este fato indica que estes animais apresentam habilidades de forrageio insuficientes no início da vida, dependendo quase que exclusivamente de reservas maternas

alocadas no fígado (Hussey *et al.*, 2010; Belicka *et al.*, 2012). Apesar da redução de alguns LC-PUFA em *R. bonasus* com o crescimento, eles não são esgotados, e mantem alta porcentagem, principalmente de DHA.

Como dito anteriormente, estas raias apresentam um rápido crescimento inicial, um processo que exige alta demanda energética. Altas porcentagens de DHA e ARA no músculo nestes filhotes, e sua posterior diminuição com crescimento, confirma o uso destes FA em processos metabólicos. Diferente do observado nos metabólitos, o DHA e as razões DHA/EPA e n3/n6 mostraram uma correlação positiva com o CF, confirmando a importância deste FA para a condição fisiológica do indivíduo. O DHA tem sido encontrado em altas proporções em embriões de tubarões ovíparos e vivíparos (Pethybridge *et al.*, 2011b; Beckmann *et al.*, 2014a), o que é esperado, devido ao papel deste FA em processos fisiológicos, tais como desenvolvimento de tecidos neurais e visuais, incluindo função sináptica e cognição (Bazinet e Layé, 2014).

O perfil de FA no plasma revelou que os filhotes de *R. bonasus* apresentam melhores habilidades de forrageio quando estão maiores. Aumentos de PUFA total, PUFA n3, entre estes DHA e EPA foram observados nos YOY II, juntamente com uma redução de SFA, entre estes C16:0, C18:0 e C18:1n7. Como elasmobrânquios usam corpos cetônicos como combustível extra-hepático, é esperado que o perfil de FA plasmático reflita o adquirido diretamente da dieta, mas também podem vir da mobilização entre tecidos (McMeans *et al.*, 2012). Além disso, o plasma tem uma rápida taxa de *turnover*, e geralmente é usado como indicador de dieta em curto prazo (Käkelä *et al.*, 2009; McMeans *et al.*, 2012).

Assim como encontrado no tubarão *H. portusjacksoni* (Beckmann *et al.*, 2014a), maiores proporções de ARA em relação ao EPA foram observadas no plasma e músculo de *R. bonasus*, resultando em maiores razões de ARA/EPA. Estes FA são preferencialmente incorporados em fosfolipídios de membranas celulares e atuam como precursores na síntese de eicosanoides, moléculas que desempenham papel na sinalização celular e como mediadores inflamatórios (Tocher, 2003; Arts, 2009). A redução de ARA e da razão ARA/EPA, juntamente com o aumento de EPA no músculo e plasma de YOY II sugere o uso do ARA no crescimento dos filhotes, visto que ele é fisiologicamente mais ativo na síntese de eicosanoides que o EPA, e são importantes no desenvolvimento de ovos e larvas de peixes (Tocher, 2003).

#### 5.4. Índices de relações tróficas: ácidos graxos e isótopos estáveis

Juntos, os indicadores tróficos de FA e SI sugerem a dependência dos recursos maternos e mudanças na dieta de filhotes de *R. bonasus*. Além disso, foi possível identificar interações tróficas entre *R. bonasus* e *R. brasiliensis* na região de estudo. Dos marcadores de FA de carnivorina ou posição trófica, a razão DHA/EPA muscular parece ser a mais representativa para *R. bonasus* que a razão C18:1n9/C18:1n7 muscular. A razão DHA/EPA foi significativamente maior em YOY I, e positivamente associado com  $\delta^{15}\text{N}$ , confirmando o enriquecimento destes nos filhotes ao nascerem. O DHA é minimamente modificado nos processos de ingestão e assimilação, sendo transferidos e seletivamente retidos nos consumidores, com isso, apresentam uma correlação positiva com nível trófico (El-Sabaawi *et al.*, 2009; Parrish *et al.*, 2015; Colombo *et al.*, 2016). O C18:1n9 tem sido ligado à piscivoria, no entanto este FA pode ser sintetizado *de novo* e pode variar com a espécie (Dalsgaard *et al.*, 2003; El-Sabaawi *et al.*, 2009).

A análise isotópica em tecidos com diferentes taxas metabólicas permite examinar mudanças temporais na dieta e entender como filhotes lidam com a dependência do recurso materno e a alimentação independente (Belicka *et al.*, 2012; Matich *et al.*, 2015). Os resultados confirmam a hipótese inicial, de que há um enriquecimento de  $\delta^{15}\text{N}$  nos tecidos de YOY I, indicando um sinal isotópico materno. A assinatura isotópica das RBC (que apresenta taxa de *turnover* mais rápida) e nadadeira (que apresenta taxa de *turnover* mais lenta) de *R. bonasus* revelou que filhotes nasceram enriquecidos em  $\delta^{15}\text{N}$  (assinatura materna), e que perderam gradualmente com o crescimento, assim como descrito para espécies de tubarões (McMeans *et al.*, 2009; Vaudo *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2015). A assinatura isotópica em filhotes de tubarões tem mostrado grande variação, dependendo da estratégia reprodutiva (Olin *et al.*, 2018). Nas fases neonatais iniciais os tecidos de filhotes refletem o sinal materno, que pode ser semelhante ao tecido da mãe, como em espécies lecitotróficas (Bourg *et al.*, 2014) e placentária (Olin *et al.*, 2018), ou podem ser enriquecidos em comparação aos tecidos maternos (McMeans *et al.*, 2009; Vaudo *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012).

Em um estudo analisando a assinatura isotópica na nadadeira de *R. bonasus*, foi demonstrado que YOY não apresentaram enriquecimento materno nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (Poulakis *et al.*, 2017), talvez pelo fato dos filhotes se alimentarem de níveis tróficos semelhantes aos de suas mães, como mostrado para tubarões (Every *et al.*, 2017). Além disso, Poulakis *et al.* (2017) encontraram todas as classes de idade para *R. bonasus*, e sugerem que

em regiões estuarinas de baixas latitudes a espécie não apresenta comportamento migratório. No presente estudo não encontramos outras classes de idade para *R. bonasus*, apenas YOY, indicando que a espécie realize seus comportamentos migratórios, ou então que utilizam outras regiões para forrageio. Tais aspectos influenciam na interpretação da assinatura isotópica e podem revelar padrões comportamentais e alimentares das populações em diferentes regiões. Por outro lado, diferenças nos resultados encontrados no presente estudo com o de Poulakis *et al.* (2017) pode ter relação com o tecido utilizado ou no processamento das amostras. No presente estudo, foram utilizadas amostras de nadadeira dorsal (cauda) e RBC, diferente do estudo de Poulakis *et al.* (2017) que utilizaram amostras da nadadeira pélvica. A nadadeira é formada por cartilagem, tecido conjuntivo e muscular e vascularização, com uma camada dérmica exterior, e tal variedade na composição pode influenciar no perfil de isótopos (Hussey *et al.*, 2010; 2012). Além disso, por ser um tecido de taxa de *turnover* lento (~500 dias, MacNeil *et al.*, 2006), diferenças temporais e espaciais podem influenciar na interpretação dos resultados.

Os dados encontrados no presente estudo indicam uma relativa rápida taxa de *turnover* nos tecidos analisados, talvez como resultado da alta taxa de crescimento inicial, discutida anteriormente (Fisher *et al.*, 2013). Em outros estudos, a assinatura de  $\delta^{15}\text{N}$  encontrada em *R. bonasus* em outras localidades estão entre  $8.5 \pm 0.3\text{‰}$  (Olin *et al.*, 2014) e  $9.4 \pm 0.5\text{‰}$  (Shaw *et al.*, 2016), semelhantes ao encontrado no presente estudo, e correspondem aos estudos de dieta, em que atuam como importantes mesopredadores (Grubbs *et al.*, 2016). Estas raias apresentam um comportamento alimentar oportunista generalista, dependendo da localidade e disponibilidade de presas (Ajemian e Power, 2012; Grubbs *et al.*, 2016). No geral alimentam-se de moluscos bivalves, poliquetas, crustáceos e equinodermos (Collins *et al.*, 2007; Ajemian e Power, 2012; Bornatowski *et al.*, 2014).

Diferenças intraespecíficas encontradas na assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  na nadadeira sugerem que as mães apresentam maior amplitude no local de forrageio que os filhotes, bem como maior amplitude nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , considerando ser este um sinal materno. No entanto, estes resultados podem ser apenas variações nas taxas de *turnover*, que podem variar com a taxa de crescimento ou mesmo pela variação no investimento materno (Olin *et al.*, 2010). Na nadadeira, as mudanças nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  parecem ocorrer mais lentamente, ou mesmo em decorrência das características estruturais e composição bioquímica deste tecido. Esta tendência tem sido relatada para tubarões, que apresentaram maiores valores de  $\delta^{13}\text{C}$  na derme (Li *et al.*, 2016).

Os biomarcadores utilizados no presente estudo confirmam o uso da área de berçário e forrageio pelos filhotes em região marinha costeira. Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  encontrados em ambos tecidos das duas espécies são os mesmos normalmente relatados em ambientes marinhos (-14 a -16‰; Hussey *et al.*, 2011, Every *et al.*, 2017). Estudos com *R. bonasus* em sistema estuarino mostraram assinatura de  $\delta^{13}\text{C}$  entre -15 a -22‰ (Poulakis *et al.*, 2017). O biomarcador de FA n3/n6 também indicou que *R. bonasus* e *R. brasiliensis* tem preferência por recursos marinhos, visto que porcentagens mais elevadas (> 1.5 %) foram encontradas, como descrito para tubarões eurialinos que também são capazes de utilizar ambientes estuarinos e dulcícolas, que apresentam valores mais baixos da razão n3/n6 (< 1.5 %; Every *et al.*, 2017). Altas porcentagens de DHA e valores < 0.3 para C16:1n7/C16:0 encontrados no presente estudo, tem sido utilizado como biomarcadores de FA característicos de dinoflagelados em cadeias tróficas marinhas (Dalsgaard *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 2015). Além disso, outros biomarcadores podem indicar locais de forrageio, tais como o ARA, que em altas porcentagens indicam forrageio em sistemas bentônicos costeiros (Copeman e Parrish, 2003; Pethybridge *et al.*, 2014) e BFA e OFA que são considerados biomarcadores de bactérias (Parrish *et al.*, 2000), podendo indicar forrageio em sedimentos.

Devido ao baixo número de indivíduos analisados de *R. brasiliensis*, os YOY foram agrupados em um único grupo amostral para comparação com YOY I e YOY II de *R. bonasus*. Comparando-se as duas espécies, encontramos que os valores para  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  da nadadeira de *R. brasiliensis* são bem semelhantes ao encontrado na nadadeira de YOY II de *R. bonasus*. Dos indivíduos de *R. brasiliensis* analisados, os SI correspondiam a YOY de maior tamanho corporal ( $50.7 \pm 6.3$  cm LD), por isso a semelhança com os YOY II de *R. bonasus*. O perfil isotópico das RBC revelou que *R. bonasus* apresenta maiores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  que *R. brasiliensis*, sugerindo que particionam recursos alimentares, com diferentes níveis tróficos e/ou forrageiam em diferentes locais, apesar das duas espécies serem simpátricas na região de estudo (Rangel *et al.*, 2017). Estudos com tubarões em áreas de berçário demonstram que a partilha de recursos é uma estratégia utilizada para reduzir a competição, adotada por espécies que dividem a mesma região como berçário (Kinney *et al.*, 2011; Matich *et al.*, 2017). Estes estudos confirmam as previsões para áreas de berçário, na qual os jovens passam o período inicial da vida em local protegido, com pouca ou nenhuma competição e alimento abundante (Castro, 1993, Simpfendorfer e Milward, 1993).

Com relação aos biomarcadores de FA no músculo, *R. brasiliensis* também apresentou um perfil semelhante aos YOY II de *R. bonasus*. No entanto, os indivíduos que foram analisados apresentavam um pequeno tamanho corpóreo ( $45.0 \pm 7.00$  cm LD), mais



semelhantes aos YOY I de *R. bonasus*. Diferenças entre FA específicos, tais como DHA, ARA e razões DHA/ARA e ARA/EPA entre YOY I de *R. bonasus* e YOY de *R. brasiliensis* reforçam as observações sobre os SI, em que filhotes acessam diferentes recursos na área de berçário. No entanto, estas diferenças também podem sugerir que o período de nascimento de *R. brasiliensis* seja diferente do observado para *R. bonasus*, ou que elas apresentam diferenças no investimento materno de FA, como já mencionado anteriormente, observando-se resultados dos FA do fígado. Além disso, menores porcentagens, principalmente de PUFAs em *R. brasiliensis* podem indicar diferenças fisiológicas entre as espécies. O acesso a mais indivíduos de *R. brasiliensis* em diferentes estágios do crescimento poderia esclarecer tais questões.

## 6. Conclusões e Considerações Finais

---

Demonstramos que a raia *R. bonasus* e possivelmente a *R. brasiliensis* utilizam a região de Bertioga, local de estudo do presente trabalho, como área de berçário, com período de nascimento ocorrendo entre o final da primavera e verão. O acompanhamento em conjunto com os pescadores mostrou-se muito eficiente no monitoramento das capturas, sendo possível a identificação do gênero e frequência de captura durante o ano. Além disso, a soltura imediata realizada pelos pescadores mostrou-se um manejo adequado, assegurando a sobrevivência dos animais na pós-captura da pesca de arrasto. Demonstramos ainda as limitações em avaliar o período neonatal e área de berçário para *Rhinoptera* spp. com critérios propostos para elasmobrânquios de outras estratégias reprodutivas, que utilizam a marca do cordão umbilical para a classificação dos filhotes. A classificação dos filhotes de *R. bonasus* através do tamanho corpóreo, baseada no estudo de idade e crescimento de Fisher *et al.* (2013), mostrou-se adequada para a investigação dos aspectos nutricionais e monitoramento das capturas na área de berçário. YOY II de dezembro e alguns encontrados em fevereiro (> 60.0 cm LD) provavelmente eram animais que estavam próximos a 1 ano de idade, com maior tamanho corporal.

Nossos resultados suportam a hipótese de que a estratégia histotrófica lipídica, juntamente com maiores períodos de gestação e o grande tamanho ao nascimento da raia *R. bonasus* confere um maior investimento energético aos filhotes. Esta estratégia parece conferir melhores condições nutricionais e habilidades de forrageio aos filhotes ao nascerem. Além disso, o perfil de EFA encontrado sugere que os filhotes não passem por deficiência destes FA, como é observado em tubarões placentários (Wai *et al.*, 2011; Belicka *et al.*, 2012), indicando grande demanda de EFA durante o início do crescimento. Filhotes nascem enriquecidos em DHA, ARA e  $\delta^{15}\text{N}$ , como reflexo da transferência materna intrauterina, e assim como encontrado para o tubarão *C. leucas* (Belicka *et al.*, 2012), *R. bonasus* demonstra perda gradual do sinal isotópico e de FA materno. YOY apresentam uma diminuição do CF, CHOL e  $\beta$ -HB com o crescimento, provavelmente como resultado do uso dos estoques energéticos provisionados pela mãe durante a gestação e redução das taxas de crescimento. YOY II parecem ter melhores habilidades de forrageio, demonstrado pelo aumento de EFA e diminuição de SFA e BFA plasmático, assim como diminuição nas concentrações de  $\beta$ -HB.

Os SI revelaram que as duas espécies particionam recursos alimentares, uma estratégia que é geralmente adotada pelas espécies que utilizam a mesma área como berçário.

Diferenças entre FA muscular e hepático entre *R. bonasus* e *R. brasiliensis* podem indicar que filhotes acessam diferentes recursos na área de berçário, ou que *R. brasiliensis* tenha nascido há mais tempo, e seu perfil de FA hepático reflita a incorporação da dieta. Além disso, diferenças na composição de FA sugerem que diferentes FA são transferidos da mãe para os filhotes durante a fase pré-natal, possivelmente porque a dieta das mães seja diferente ou que as duas espécies apresentam um metabolismo diferenciado. Um estudo comparativo entre YOY de *R. brasiliensis* em diferentes estágios é necessário para testar tais hipóteses, assim como realizado para *R. bonasus* no presente estudo.

Estas conclusões demonstram que a assinatura de FA e SI podem fornecer informações confiáveis e que podem ser usadas para discriminar populações, classes de idade e mudanças na dieta. Os SI trazem informações interessantes sobre o enriquecimento presente nos filhotes, que foram fortemente correlacionados com a razão DHA/EPA, e permite a análise do uso de recursos alimentares em uma escala bidimensional. No entanto, verificamos que a análise de FA foi mais conclusiva para comparação entre YOY I e YOY II e das mudanças graduais em decorrência de variações ontogenéticas. Além disso, o DHA, C18:1n7 e as razões n3/n6, DHA/EPA e C18:1n9/C18:1n7 foram significativamente correlacionados com o CF em *R. bonasus*. Como os FA são essenciais em processos fisiológicos ligados ao crescimento, reprodução e sobrevivência, eles fornecem excelentes ferramentas para examinar simultaneamente a dinâmica nutricional neonatal, transferência de energia, interações tróficas e condição nutricional ou de saúde (Pethybridge *et al.*, 2015). Os lipídios e FA apresentam taxas de *turnover* mais rápidas do que as proteínas e, conseqüentemente o  $\delta^{15}\text{N}$ , sendo assim considerados melhores marcadores para investigar mudanças temporais, mostrando-se ferramentas interessantes no estudo da dinâmica nutricional e interações tróficas (Pethybridge *et al.*, 2015; 2018).

A combinação de biomarcadores permitiu analisar os aspectos nutricionais e interações tróficas de YOY em uma área de berçário, avaliados por meio de amostragem não-letal, permitindo compreender como o maior investimento materno afeta tais aspectos durante o início da história de vida das raias *R. bonasus* e *R. brasiliensis*. Essas ferramentas fisiológicas podem ser utilizadas para a geração de modelos mecanicistas confiáveis, para que, posteriormente a essa descrição inicial, seja detectada a vulnerabilidade desses animais com complexa história de vida.

## 7. Referências Bibliográficas

---

- Adams, K. R., Fetterplace, L. C., Davis, A. R., Taylor, M. D., Knott, N. A. 2018. Sharks, rays and abortion: The prevalence of capture-induced parturition in elasmobranchs. *Biological Conservation*, 217, 11-27.
- Adnet, S., Cappetta, H., Guinot, G., Notarbartolo Di Sciara, G. 2012. Evolutionary history of the devil rays (Chondrichthyes: Myliobatiformes) from fossil and morphological inference. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166, 132–159.
- Ajemian, M. J., Powers, S. P. 2016. Seasonality and ontogenetic habitat partitioning of cownose rays in the northern Gulf of Mexico. *Estuaries and Coasts*, 39(4), 1234-1248.
- Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo (ALESP). Decreto Nº 60.133, de 7 de Fevereiro de 2014: As espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção, as quase ameaçadas e as deficientes de dados para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. 2014. Available from: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2014/decreto-60133-07.02.2014.html>
- Arts, M. T., Brett, M. T., Kainz, M. 2009. Lipids in aquatic ecosystems. Springer Science & Business Media. 394 p.
- Awruch, C. A. 2016. Reproduction strategies. In: *Fish Physiology*. Vol. 34. Academic Press. pp. 255-310.
- Ballantyne, J.S. 1997. Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 118: 703–742.
- Ballantyne, J.S. 2016. Jaws II: metabolism of elasmobranchs. In: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (eds) *Physiology of elasmobranch fishes: internal processes*, 1st edn. Academic Press, United States, pp 395–456.
- Barker, A. S. 2006. The IUCN Red List of Threatened Species. *Rhinoptera bonasus*. e.T60128A12310195 [Internet] 2006 [cited 2017 Mar 10]. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2006.RLTS.T60128A12310195.en>.
- Beckmann, CL, Mitchell JG, Seuront L, Stone DAJ, Huveneers C. 2014a. From eggs to hatchling: preferential retention of fatty acids biomarkers in young-of-the-year Port Jackson sharks *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal Fish Biology*. 85: 944-952.
- Beckmann, C. L., Mitchell, J. G., Stone, D. A., Huveneers, C. 2013. A controlled feeding experiment investigating the effects of a dietary switch on muscle and liver fatty acid

- profiles in Port Jackson sharks *Heterodontus portusjacksoni*. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*, 448: 10-18.
- Beckmann, C. L., Mitchell, J. G., Stone, D. A., Huveneers, C. 2014. Inter-Tissue Differences in Fatty Acid Incorporation as a Result of Dietary Oil Manipulation in Port Jackson Sharks (*Heterodontus portusjacksoni*). *Lipids*, 49: 577-590.
- Belicka, L.L., Matich, P., Jaffé, R., Heithaus, M.R. 2012. Fatty acids and stable isotopes as indicators of early-life feeding and potential maternal resource dependency in the bull shark *Carcharhinus leucas*. *Marine Ecology Progress Series*, 455: 245–256.
- Blaylock, R. A. 1993. Distribution and abundance of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, 16:255–63.
- Bigelow, H. B., Schroeder, W. C. Sawfishes, Guitarfishes, Skates and Rays. Volume 1 de Memoir. New Haven: Sears Foundation for Marine Research, 1953.
- Birsoy, K., Festuccia, W. T., Laplante, M. 2013. A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of Cell Science*, 126:1541-1552.
- Bornatowski, H., Wosnick, N., do Carmo, W. P. D, Corrêa, M. F. M, Abilhoa, V. 2014. Feeding comparisons of four batoids (Elasmobranchii) in coastal waters of southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94:1491-99.
- Borrell, A., Gómez-Campos, E., Aguilar, A. 2015. Influence of Reproduction on Stable-Isotope Ratios: Nitrogen and Carbon Isotope Discrimination between Mothers, Fetuses, and Milk in the Fin Whale, a Capital Breeder. *Physiology Biochemistry Zoology*, 89:41–50.
- Bourg, B. Le, Kiszka, J., Bustamante, P. 2014. Mother–embryo isotope ( $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{13}\text{C}$ ) fractionation and mercury (Hg) transfer in aplacental deep-sea sharks. *Journal of Fish Biology*, 84:1574-1581.
- Budge, S. M., Iverson, S. J., Koopman, H. N. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Marine Mammal Science*, 22(4): 759-801.
- Carlisle, A.B., Kim, S.L., Semmens, B.X., Madigan, D.J., Jorgensen, S.J., Perle C.R., Anderson S.D., Chapple T.K., Kanive P.E., Block, B.A. 2012. Using Stable Isotope Analysis to Understand the Migration and Trophic Ecology of Northeastern Pacific White Sharks (*Carcharodon carcharias*). *PLoS ONE*, 7: e30492.

- Castro, J. I. 1993. The shark nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environmental Biology of Fishes*, 38: 37-48.
- Castro, J. I., Sato, K., Bodine, A. B. 2016. A novel mode of embryonic nutrition in the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*. *Marine Biology Research*, 12(2): 200-205.
- Chin A., Kyne P. M., Walker T.I., McAuley R. B. 2010. A new integrated risk assessment for climate change: Analyzing the vulnerability of sharks and rays on Australia's Great Barrier Reef. *Global Change Biology*, 16:1936–1953.
- Cohen, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, NJ, Erlbaum.
- Colombo, S. M., Wacker, A., Parrish, C. C., Kainz, M. J., Arts, M. T. 2016. A fundamental dichotomy in long-chain polyunsaturated fatty acid abundance between and within marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*, 25: 163-174.
- Cortés, E. 1999. Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES Journal of Marine Science*, 56: 707-717.
- Cortés, E. 2004. Life history patterns, demography, and population dynamics. In: Carrier J. C., Musick, J. A., Heithaus M. R., editors. *Biology of Sharks and Their Relatives*. Boca Raton: CRC Press, p. 449–69.
- Dalsgaard, J., John, M. S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., Hagen, W. 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46: 225-340.
- Domingues, R. R., Gonzalez, M. M. B, Amorim, A. F. 2009. Scientific Note First reported occurrence of pregnant and neonato, *Rhinoptera brasiliensis* (Chondrichthyes, Rhinopteridae) caught off Guarujá city, São Paulo state, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4): 605-608.
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavahagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N.K., Fordham, S.V., Francis, M.P., Pollock, C.M., Simpfendorfer, C.A., Burgess, G.H., Carpenter, K.E., Compagno, L.J.V., Ebert, D.A., Gibson, C., Heupel, M.R., Livingstone, S.R., Sanciangco, J.C., Stevens, J.D., Valenti, S. e White, W.T. 2014. Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife*.
- Duncan, K. M., Holland, K. N. 2006. Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks *Sphyrna lewini* in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 312: 211-221.

- El-Sabaawi, R., Dower, J. F., Kainz, M., Mazumder, A. 2009. Characterizing dietary variability and trophic positions of coastal calanoid copepods: insight from stable isotopes and fatty acids. *Marine Biology*, 156: 225-237.
- Elliot, M. G., Crespi, B. J. 2008. Placental invasiveness and brain–body allometry in eutherian mammals. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 1763-1778.
- Every, S. L., Pethybridge, H. R., Crook, D. A., Kyne, P. M., Fulton CJ. Tropical shark trophic niches. 2016. Comparison of fin and muscle tissues for analysis of signature fatty acids in tropical euryhaline sharks. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 479: 46–53
- Every, S. L., Pethybridge, H. R., Fulton, C. J., Kyne, P. M., Crook, D. A. 2017. Niche metrics suggest euryhaline and coastal elasmobranchs provide trophic connections among marine and freshwater biomes in northern Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 565: 181-196.
- Ferretti, F., Worm, B., Britten, G.L., Heithaus, M.R., Lotze, H.K. 2010. Patterns and ecosystem consequences of shark declines in the ocean. *Ecology letters*, 13(8): pp.1055-1071.
- Fisher, R.A. 2010. Life history, trophic ecology, & prey handling by cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, from Chesapeake Bay. NOAA final report (NA07NMF4570324) Grant No. 713031. VIMS Marine Resource Report No. 2010–20, VSG-10-25.
- Fisher, R. A., Call, G. C., Grubbs, R. D. 2013. Age, growth, and reproductive biology of cownose rays in Chesapeake Bay. *Marine and Coastal Fisheries*, 5(1): 224-235.
- Fisher, R.A., Call, G.C., McDowell, J.R. 2014. Reproductive variations in cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) from Chesapeake Bay. *Environmental Biology of Fishes*, 97:1031–1038.
- Folch, J., Less, M., Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226:497-503.
- Frings, C.S., Fendly, T.W., Dunn, R.T., Quenn, C.A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*, 18: 673-674.
- Frisk, M. G. 2010. Life history strategies of batoids. *Sharks and their Relatives. II. Biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 283-318.
- Fry, B., Arnold, C. 1982. Rapid  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  turnover during growth of brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Oecologia*, 54: 200–204.

- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22:241–253.
- Gallagher, A. J., Skubel, R. A., Pethybridge, H. R., Hammerschlag, N. 2017. Energy metabolism in mobile, wild-sampled sharks inferred by plasma lipids. *Conservation Physiology*, 5: 1-10.
- Gallagher, A. J., Wagner, D. N., Irschick, D. J., Hammerschlag, N. 2014. Body condition predicts energy stores in apex predatory sharks. *Conservation Physiology*, 2: cou022.
- Gomes, U.L., Signori, C., Gadig, O.B.F., Santos, H.R.S. 2010. Guia para identificação de tubarões e raias do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Technical Books.
- Goodman, M. A., Conn, P. B., Fitzpatrick, E. 2010. Seasonal occurrence of cownose rays (*Rhinoptera bonasus*) in North Carolina’s estuarine and coastal waters. *Estuaries and Coasts*, 34: 640–651.
- Grijalba-Bendeck M, Polo-Silva C, Acero AP. Una aproximación a la abundancia de los batoideos capturados artesanalmente en santa marta (Colombia). *Boletim Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras*, 2007: 36:251-68.
- Grubbs, R. D., Carlson, J. K., Romine, J. G., Curtis, T. H., McElroy, W. D., McCandless, C. T., Cotton C. F., Musick, J. A. 2016. Critical assessment and ramifications of a purported marine trophic cascade. *Scientific Reports*, 6, 20970.
- Hamlett, W.C., Kormanik, G.A., Storrie, M., Stevens, B., Walker, T.I. 2005. Chondrichthyan parity, lecithotrophy and matrotrophy. In: Hamlett W. C. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras* (pp. 395e434). Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
- Hamlett, W.C., Musick, J.A., Eulitt, A.M., Jarrell, R.L., Kelly, M.A. 1996. Ultrastructure of uterine trophonemata, accommodation for Uterolactation, and gas exchange in the southern stingray, *Dasyatis americana*. *Canadian Journal Zoology*, 74: 1417-1430.
- Hamlett, W.C., Wourms, J P., Smith, J.W. 1985. Stingray placental analogues: structure of trophonemata in *Rhinoptera bonasus*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17: 541-550.
- Heithaus, M. R. 2007. Nursery areas as essential shark habitats: a theoretical perspective. *American Fisheries Society Symposium Series*, 50: 3-13.
- Heithaus, M. R., Frid, A., Wirsing, A. J., Worm, B. 2008. Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4): 202-210.



- Heithaus, M. R., Wirsing, A. J., Dill, L. M. 2012. The ecological importance of intact top-predator populations: a synthesis of 15 years of research in a seagrass ecosystem. *Marine and Freshwater Research*, 63(11), 1039-1050.
- Heupel, M.R., Carlson, J.K. e Simpfendorfer, C.A., 2007. Shark nursery areas: concepts, definition, characterization and assumptions. *Marine Ecology Progress Series*, 337: 287-297.
- Hobson, K.A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecology*, 120:314–326.
- Hulbert, A. J., Abbott, S. K. 2012. Nutritional ecology of essential fatty acids: an evolutionary perspective. *Australian Journal of Zoology*, 59: 369-379.
- Hussey, N. E., Cocks, D. T., Dudley, S. F., McCarthy, I. D., Wintner, S. P. 2009. The condition conundrum: application of multiple condition indices to the dusky shark *Carcharhinus obscurus*. *Marine Ecology Progress Series*, 380: 199-212.
- Hussey, N. E., DiBattista, J. D., Moore, J. W., Ward, E. J., Fisk, A. T., Kessel, S., Guttridge, T. L., Feldheim, K. A., Franks, B. R., Gruber, S. H., Weideli, O. C. Chapman, D. D. 2017. Risky business for a juvenile marine predator? Testing the influence of foraging strategies on size and growth rate under natural conditions. *Proceedings of the Royal Society B*. 284: 20170166.
- Hussey, N.E., MacNeil, M.A., Olin, J.A., McMeans, B.C., Kinney, M.J., Chapman, D.D., Fisk, A.T. 2012. Stable isotopes and elasmobranchs: tissue types, methods, applications, and assumptions. *Journal of Fish Biology*, 80:1449–1484.
- Hussey, N.E., Wintner, S.P., Dudley, S.F.J., Cliff, G., Cocks, D.T., MacNeil, M.A. 2010. Maternal investment and size-specific reproductive output in carcharhinid sharks. *Journal Animal Ecology*, 79: 184–193.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Avaliação do risco de extinção dos elasmobrânquios e quimeras no Brasil: 2010-2012. Itajaí: CEPSUL, 2016.
- Iverson, S.J. 2009. Tracing Aquatic Food Webs Using Fatty Acids: From Qualitative Indicators to Quantitative Determination. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*, ed. Arts, MT, Brett MT, Kainz MJ. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pp. 281-308.
- Iverson, S.J., Oftedal, O.T., Bowen, W.D., Boness, D.J., Sampugna, J. 1995. Prenatal and postnatal transfer of fatty acids from mother to pup in the hooded seal. *Journal Comparative Physiology*, 165: 1-12.

- Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Piersma, T. 2002. Plasma metabolites reflect seasonally changing metabolic processes in a long-distance migrant shorebird (*Calidris canutus*). *Zoology*, 105(3): 239-246.
- Käkelä, R., Furness, R. W., Kahle, S., Becker, P. H., Käkelä, A. 2009. Fatty acid signatures in seabird plasma are a complex function of diet composition: a captive feeding trial with herring gulls. *Functional Ecology*, 23: 141-149.
- Kinney, M. J., Hussey, N. E., Fisk, A. T., Tobin, A. J., Simpfendorfer, C. A. 2011. Communal or competitive? Stable isotope analysis provides evidence of resource partitioning within a communal shark nursery. *Marine Ecology Progress Series*, 439: 263-276.
- Kölliker, M. (2012). *The evolution of parental care*. OUP Oxford.
- Larsson, Å., Fänge, R. 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 57(3): 191-196.
- Lessa, R., Rodrigues, J., Barreto, R., Nunes, R., Camargo, G., Santana, F. M. 2016. Pesca Incidental de Rajiformes nos arrastos de praia em Caiçara do Norte, RN. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 8:34-41.
- Li, Y., Hussey, N. E., Zhang, Y. 2016. Quantifying ontogenetic stable isotope variation between dermis and muscle tissue of two pelagic sharks. *Aquatic Biology*, 25: 53-60.
- Luer, C. A., Walsh, C.J., Bodine, A.B., Rodgers, R.S., Wyffels, J. 1994. Preliminary biochemical analysis of histotroph secretions from the cownose ray *Rhinoptera bonasus* and the atlantic stingray *Dasyatis sabina*, with observations on the uterine villi from *R. bonasus*. Abstract American Elasmobranch Society 10th Annual Meeting, 2.-8. June 1994, University of Southern California, Los Angeles.
- Matich, P., Heithaus, M. R., Layman, C. A. 2011. Contrasting patterns of individual specialization and trophic coupling in two marine apex predators. *Journal of Animal Ecology*, 80(1): 294-305.
- Matich P., Kiszka J.J., Heithaus, M.R., Mourier J., Planes, S. 2015. Short-term shifts of stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) values in juvenile sharks within nursery areas suggest rapid shifts in energy pathways *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 465:83–91.
- Matich, P., Kiszka, J. J., Mourier, J., Planes, S., Heithaus, M. R. 2017. Species co-occurrence affects the trophic interactions of two juvenile reef shark species in tropical lagoon nurseries in Moorea (French Polynesia). *Marine environmental research*, 127: 84-91.
- McEachran, J. D., Carvalho M. R. 2002. Batoid fishes. In *The Living Marine Resources of the Western Central Atlantic*, Vol. 1. (Carpenter, K. E., ed). Rome: FAO.

- McMeans, B.C., Olin, J.A., Benz, G.W. 2009. Stable-isotope comparisons between embryos and mothers of a placental shark species. *Journal of Fish Biology*, 75: 2464–2474.
- McMeans, B. C., Arts, M. T., Fisk, A. T. 2012. Similarity between predator and prey fatty acid profiles is tissue dependent in Greenland sharks (*Somniosus microcephalus*): Implications for diet reconstruction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 429:55-63.
- MacNeil, M. A., Skomal, G. B., Fisk, A. T. 2005. Stable isotopes from multiple tissues reveal diet switching in sharks. *Marine Ecology Progress Series*, 302:199-206.
- McWilliams, S. R., Guglielmo, C., Pierce, B., Klaassen, M. 2004. Flying, fasting, and feeding in birds during migration: a nutritional and physiological ecology perspective. *Journal of Avian Biology*, 35(5): 377-393.
- Musick J.A., J.K. Ellis. 2005. Reproductive Evolution of Chondrichthyes. pp. 45-79. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras*. William C. Hamlett. ed. Science Publishers, Inc. Plymouth, U.
- Neer, J.A., Rose, K.A., Cortés, E. 2007. Simulating the effects of temperature on individual and population growth of *Rhinoptera bonasus*: a coupled bioenergetics and matrix modeling approach. *Marine Ecology Progress Series*, 329: 211-223.
- Neer, J. A., Thompson, B. A. 2005. Life history of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in the northern Gulf of Mexico, with comments on geographic variability in life history traits. *Environmental Biology of Fishes*, 73: 321–31.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2014. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- Oddone, M. C., Amorim, A. F. D., Mancini, P. L., Norbis, W. 2007. Size composition, monthly condition factor and morphometrics for fishery-dependent samples of *Rioraja agassizi* (Chondrichthyes: Rajidae), off Santos, Southeast Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 5: 415-424.
- Oftedal, O.T. 2002. The Mammary Gland and Its Origin During Synapsid Evolution. *J Mam. Gland Biol. Neopl.*7: 225-252.
- Olin, J. A., Hussey, N. E., Fritts, M., Heupel, M. R., Simpfendorfer, C. A., Poulakis, G. R., Fisk, A. T. 2011. Maternal meddling in neonatal sharks: implications for interpreting stable isotopes in young animals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 1008-1016.

- Olin, J. A., Shipley, O. N., McMeans, B. C. 2018. Stable isotope fractionation between maternal and embryo tissues in the Bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*). *Environmental Biology of Fishes*, 1-11.
- Omori, K. L., Fisher, R. A. 2017. Summer and fall movement of cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, along the east coast of United States observed with pop-up satellite tags. *Environmental Biology of Fishes*, 100: 1435-1449.
- Palacios-Barreto, P., Cruz, V. P., Foresti, F., Rangel, B. D. S., Uribe-Alcocer, M., Diaz-Jaimes, P. 2017. Molecular evidence supporting the expansion of the geographical distribution of the Brazilian cownose ray *Rhinoptera brasiliensis* (Myliobatiformes: Rhinopteridae) in the western Atlantic. *Zootaxa*, 4341: 593-600.
- Parrish, C. C. 2013. Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography*, 2013: 1-16.
- Parrish, C.C. 2009. Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs. In: *Lipids in Aquatic Ecosystems*, ed. Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. pp. 309-326.
- Parrish, C. C., Pethybridge, H., Young, J. W., Nichols, P. D. 2015. Spatial variation in fatty acid trophic markers in albacore tuna from the Southwestern Pacific Ocean—a potential ‘tropicalization’ signal. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 113: 199-207.
- Pethybridge, H. R., Choy, C. A., Polovina, J. J., Fulton, E. A. 2018. Improving marine ecosystem models with biochemical tracers. *Annual review of marine science*, 10(1).
- Pethybridge, H., Daley, R. K., Nichols, P. D. 2011a. Diet of demersal sharks and chimaeras inferred by fatty acid profiles and stomach content analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409(1-2): 290-299.
- Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., Nichols, P.D. 2011b. Lipid (energy) reserves, utilization and provisioning during oocyte maturation and early embryonic development of deepwater chondrichthyans. *Marine Biology* 158 (12): 2741–2754.
- Pethybridge, H., Daley, R., Virtue, P., Nichols, P. 2010. Lipid composition and partitioning of deepwater chondrichthyans: inferences of feeding ecology and distribution. *Marine Biology*, 157: 1367-1384.
- Pethybridge, H.R., Parrish, C.C., Morrongiello, J., Young, J.W., Farley, J.H., Gunasekera, R.M., Nichols, P.D. 2015. Spatial patterns and temperature predictions of tuna fatty acids: tracing essential nutrients and changes in primary producers. *PloS one*, 10: e0131598.

- Pethybridge, H.R., Parrish, C.C., Bruce, B.D., Young, J.W., Nichols, P.D. 2014. Lipid, Fatty Acid and Energy Density Profiles of White Sharks: Insights into the Feeding Ecology and Ecophysiology of a Complex Top Predator. *PLoS ONE* 9(5): e97877.
- Poulakis, G.R. 2013. Reproductive biology of the Cownose Ray in the Charlotte Harbor estuarine system, Florida. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*. 2013, 5:159–73.
- Poulakis, G. R., Urakawa, H., Stevens, P. W., DeAngelo, J. A., Timmers, A. A., Grubbs, R. D., Frisk, A. T., Olin, J. A. 2017. Sympatric elasmobranchs and fecal samples provide insight into the trophic ecology of the smalltooth sawfish. *Endangered Species Research*, 32: 491-506.
- Rangel, B. S., Cruz, V. P., Rodrigues, A., Araujo, M. L. G., Oliveira, C., Foresti, F., Moreira, R. G. 2017. Sympatric and syntopic occurrence of cownose rays: Neonatal strategies for survival? *Journal of Applied Ichthyology*, 33: 542-545.
- Rangel, B.S., Rodrigues, A., Moreira, R.G. 2018. Use of a nursery area by cownose rays (*Rhinoptera*) in southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 16: e170089. DOI: 10.1590/1982-0224-20170089.
- Rubenstein, D. R., Hobson, K. A. 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(5): 256-263.
- Sardenne, F., Chassot, E., Fouché, E., Ménard, F., Lucas, V., Bodin, N. 2016. Are condition factors powerful proxies of energy content in wild tropical tunas? *Ecological Indicators*, 71: 467-476.
- Sheridan, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 107: 495-508.
- Shiffman, D., Gallagher, A. G., Boyle, M. D., Hammerschlag-Peyer, C. M., Hammerschlag, N. 2012. Stable isotope analysis as a tool for elasmobranch conservation research: a primer for non-specialists. *Marine and Freshwater Research*, 63:635–643.
- Smith, J. W., Merriner, J. V. 1985. Food habits and feeding behavior of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*, in lower Chesapeake Bay. *Estuaries*, 8(3): 305-310.
- Speake, B.K., Thompson, M.B. 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comparative and Biochemistry Physiology A*. 127(4):453–467.
- Speers-Roesch, B., Treberg, J.R. 2010. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comparative and Biochemistry Physiology A*, 155:417–434.

- Speers-Roesch, B., Ip, Y. K., Ballantyne, J. S. 2006. Metabolic organization of freshwater, euryhaline, and marine elasmobranchs: implications for the evolution of energy metabolism in sharks and rays. *Journal of experimental biology*, 209(13): 2495-2508.
- Springer, S. 1967. Social organization of shark populations. In: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F., Rall, D.P. (ed) *Sharks, skates and rays*. John Hopkins Press, Baltimore, MD. p 149–74.
- Stevenson, R.D., Woods Jr, W.A. 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 1169-1190.
- Tilley, A., López-Angarita, J., Turner, J.R. 2013. Diet reconstruction and resource partitioning of a Caribbean marine mesopredator using stable isotope Bayesian modelling. *PloS one*, 8(11): e79560.
- Valls, E., Navarro, J., Barría, C., Coll, M., Fernández-Borràs, J., Rotllant, G. 2016. Seasonal, ontogenetic and sexual changes in lipid metabolism of the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) in deep-sea free-living conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 483: 59-63.
- Vaudo, J.J., Matich, P., Heithaus, M.R. 2010. Mother–offspring isotope fractionation in two species of placental sharks. *Journal of Fish Biology*, 77:1724–1727.
- Vooren, C.M., Lamónaca, A.F. 2004. The IUCN Red List of Threatened Species. *Rhinoptera brasiliensis*. e.T44595A10912274 [Internet] [cited 2017 Mar 10] The IUCN Red List of Threatened Species 2004. Available from: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T44595A10912274.en>.
- Vooren, C.M., Klippel, S., Galina, A.B. 2005. Os elasmobrânquios das águas costeiras da Plataforma Sul. In: Vooren, C. M., Klippel, S., editors. *Ações para a conservação de tubarões e raias no sul do Brasil*. Porto Alegre: Igaré, pp. 113-20.
- Williams, M.J., Sutherland, W.H., McCormick, M.P., de Jong, S.A., Walker, R.J., Wilkins, G.T. 1999. Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. *Journal of the American College of Cardiology*, 33: 1050-1055.
- Wourms, J.P. 1977. Reproduction and development in chondrichthyan fishes. *American Zoology*, 17: 379-410.
- Wourms, J.P. 1981. Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishes. *American Zoology*, 21 :473-515.
- Yokota, L., Lessa, R.P. 2006. A nursery area for sharks and rays in northeastern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 75: 349–360.

## 8. Apêndices

**Apêndice 1-** Largura de disco, massa corporal e fator de condição de Fulton dos indivíduos de *R. bonasus* e *R. brasiliensis* utilizados para o cálculo do fator de condição (FC).

	Data da captura	Sexo	LD (cm)	Massa (g)	FC	
	22/03/2016	M	56.0	2300.0	1.31	
	22/03/2016	M	50.0	1830.0	1.46	
	22/03/2016	M	54.0	2190.0	1.39	
	22/03/2016	F	52.0	2280.0	1.62	
	22/03/2016	F	46.0	1309.0	1.34	
	22/03/2016	F	53.0	2500.0	1.68	
	22/03/2016	F	56.0	1620.0	0.92	
	22/03/2016	M	47.0	1780.0	1.71	
	22/03/2016	F	55.0	2900.0	1.74	
	23/03/2016	M	53.0	2050.0	1.38	
	23/03/2016	F	54.0	2440.0	1.55	
	23/03/2016	F	47.0	1800.0	1.73	
	23/03/2016	F	53.0	2910.0	1.95	
	23/03/2016	F	42.0	1270.0	1.71	
	23/03/2016	M	57.0	2620.0	1.41	
	23/03/2016	M	51.0	2140.0	1.61	
	23/03/2016	F	47.0	1500.0	1.44	
	23/03/2016	F	45.5	1550.0	1.65	
	24/03/2016	M	58.0	2600.0	1.33	
<i>Rhinoptera bonasus</i>	22/12/2016	F	40.0	900.0	1.41	
	22/12/2016	M	46.0	1440.0	1.48	
	22/12/2016	F	41.0	1180.0	1.71	
	22/12/2016	M	59.0	2700.0	1.31	
	22/12/2016	F	59.0	3337.0	1.62	
	22/12/2016	M	67.0	3890.0	1.29	
	22/12/2016	F	58.0	2840.0	1.46	
	22/12/2016	M	56.0	2700.0	1.54	
	22/12/2016	M	45.5	1450.0	1.54	
	22/12/2016	F	41.5	1333.0	1.87	
	22/12/2016	F	40.5	1170.0	1.76	
	22/12/2016	M	57.0	2720.0	1.47	
	22/12/2016	F	62.0	3210.0	1.35	
	22/12/2016	M	58.0	3100.0	1.59	
	22/12/2016	M	63.0	3760.0	1.50	
	22/12/2016	M	61.0	3380.0	1.49	
	22/12/2016	F	61.0	3320.0	1.46	
	22/12/2016	N	58.0	3020.0	1.55	
	22/12/2016	F	56.0	2610.0	1.49	
	22/12/2016	M	62.5	3540.0	1.45	
	22/12/2016	M	46.0	1490.0	1.53	
	22/12/2016	F	45.5	1570.0	1.67	
		07/02/2017	F	50.5	1880.0	1.46
		07/02/2017	M	46.0	1540.0	1.58
	07/02/2017	M	48.0	1540.0	1.39	
	07/02/2017	M	41.0	960.0	1.39	
	07/02/2017	F	46.5	1490.0	1.48	
	07/02/2017	F	43.5	1330.0	1.61	

	07/02/2017	F	48.5	1640.0	1.44
	07/02/2017	M	59.5	2950.0	1.40
	07/02/2017	F	47.0	1510.0	1.45
	07/02/2017	F	49.0	1850.0	1.57
	07/02/2017	M	45.5	1500.0	1.59
	07/02/2017	M	42.5	1300.0	1.69
	07/02/2017	F	46.0	1530.0	1.57
	22/02/2017	M	36.0	640.0	1.37
	22/02/2017	F	42.0	1300.0	1.75
	22/02/2017	F	32.5	550.0	1.60
	22/02/2017	F	66.0	3400.0	1.18
	23/03/2016	F	52.0	1990.0	1.42
	24/03/2016	M	58.5	2580.0	1.29
	24/03/2016	F	53.0	2390.0	1.61
<i>Rhinoptera</i>	24/03/2016	M	54.3	2590.0	1.62
<i>brasiliensis</i>	24/03/2016	M	53.5	2320.0	1.52
	24/03/2016	M	51.0	2270.0	1.71
	24/03/2016	M	55.1	2620.0	1.57
	24/03/2016	M	56.0	3000.0	1.71
	22/12/2016	F	44.0	1360.0	1.59



**Apêndice 2-** Composição dos ácidos graxos do fígado de jovens-do-ano (YOY I) de *R. bonasus* e *R. brasiliensis* (média em %  $\pm$  desvio padrão e o coeficiente de variação em %).

Ácidos graxos (%)	Fígado			
	<i>R. bonasus</i> (n = 6)		<i>R. brasiliensis</i> (n = 5)	
<b>C15:0</b>	0.7 $\pm$ 0.31	43 %	1.0 $\pm$ 0.30	31 %
<b>C16:0iso</b>	0.6 $\pm$ 0.23	40 %	0.8 $\pm$ 0.35	46 %
<b>C17:0</b>	1.4 $\pm$ 0.61	43 %	1.9 $\pm$ 0.29	15 %
<b>C17:0anteiso</b>	1.9 $\pm$ 0.57	31 %	1.4 $\pm$ 0.39	28 %
<b>C14:0</b>	0.9 $\pm$ 0.41*	47 %	2.3 $\pm$ 0.79	34 %
<b>C16:0</b>	11.9 $\pm$ 3.36*	28 %	19.5 $\pm$ 1.85	9 %
<b>C18:0</b>	9.2 $\pm$ 2.63*	28 %	14.8 $\pm$ 2.99	20 %
<b>C16:1n7</b>	2.4 $\pm$ 1.14*	48 %	5.4 $\pm$ 1.27	24 %
<b>C18:1n9</b>	3.6 $\pm$ 1.61	45 %	3.6 $\pm$ 1.29	36 %
<b>C18:1n7</b>	3.1 $\pm$ 0.45*	15 %	4.8 $\pm$ 1.45	30 %
<b>C20:1n9</b>	1.4 $\pm$ 0.66	46 %	2.2 $\pm$ 0.60	27 %
<b>C22:1</b>	1.5 $\pm$ 0.45	30 %	-	-
<b>C18:3n3</b>	0.9 $\pm$ 0.35	39 %	-	-
<b>C20:4n3</b>	1.7 $\pm$ 0.39	23 %	-	-
<b>C20:5n3 (EPA)</b>	6.1 $\pm$ 2.72	45 %	5.6 $\pm$ 0.63	11 %
<b>C22:5n3</b>	4.0 $\pm$ 1.06	26 %	3.6 $\pm$ 0.87	24 %
<b>C22:6n3 (DHA)</b>	22.1 $\pm$ 3.12*	14 %	16.6 $\pm$ 2.43	15 %
<b>C20:2n6</b>	0.8 $\pm$ 0.23	28 %	0.9 $\pm$ 0.07	8 %
<b>C20:3n6</b>	0.6 $\pm$ 0.02	3 %	-	-
<b>C20:4n6 (ARA)</b>	9.6 $\pm$ 5.05	53 %	6.3 $\pm$ 1.07	17 %
<b>C22:2n6</b>	2.2 $\pm$ 1.26	57 %	-	-
<b>C22:4n6</b>	6.9 $\pm$ 1.76*	25 %	3.7 $\pm$ 1.11	30 %
<b>C22:5n6</b>	8.6 $\pm$ 3.71	43 %	4.2 $\pm$ 0.98	24 %
<b><math>\Sigma</math> BFA - OFA</b>	3.8 $\pm$ 1.10	29 %	4.3 $\pm$ 0.76	17 %
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	21.9 $\pm$ 5.55*	25 %	36.6 $\pm$ 0.84	2 %
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	11.2 $\pm$ 3.18	28 %	15.2 $\pm$ 2.87	19 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	61.5 $\pm$ 6.20*	10 %	41.5 $\pm$ 3.04	7 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA n3</b>	33.0 $\pm$ 3.61*	11 %	26.0 $\pm$ 2.80	10 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA n6</b>	26.9 $\pm$ 6.41*	24 %	15.3 $\pm$ 2.58	17 %
<b>n3/n6</b>	1.3 $\pm$ 0.42	32 %	1.8 $\pm$ 0.44	25 %
<b><math>\Sigma</math> C18 n3</b>	0.4 $\pm$ 0.53	145 %	-	-
<b><math>\Sigma</math> C20-22 n3</b>	32.7 $\pm$ 3.28*	10 %	26.0 $\pm$ 2.80	11 %
<b><math>\Sigma</math> C18 n6</b>	-	-	-	-
<b><math>\Sigma</math> C20-22 n6</b>	26.9 $\pm$ 6.41*	24 %	15.1 $\pm$ 2.72	18 %
<b>EPA/ARA</b>	0.7 $\pm$ 0.17*	25 %	0.9 $\pm$ 0.09	10 %
<b>DHA/ARA</b>	3.1 $\pm$ 2.08	67 %	2.8 $\pm$ 0.98	35 %
<b>EPA/DHA</b>	0.3 $\pm$ 0.15	53 %	0.3 $\pm$ 0.08	22 %
<b>DHA/EPA</b>	4.3 $\pm$ 2.07	48 %	3.0 $\pm$ 0.76	25 %
<b>C16:1n7/C16:0</b>	0.2 $\pm$ 0.09	44 %	0.3 $\pm$ 0.04	15 %
<b>C18:1n9/C18:1n7</b>	1.1 $\pm$ 0.39	34 %	0.8 $\pm$ 0.31	39 %
<b>ARA/EPA</b>	1.5 $\pm$ 0.38	24 %	1.1 $\pm$ 0.10	9 %

- Valores não encontrados ou menores que 0.5%.

\* indicam diferença estatística significativa entre YOY I de *R. bonasus* e YOY de *R. brasiliensis* (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).  $\Sigma$ BFA - OFA – ácidos graxos ímpares e ramificados,  $\Sigma$ SFA - ácidos graxos saturados,  $\Sigma$ MUFA - ácidos graxos monoinsaturados,  $\Sigma$ PUFA - ácidos graxos polinsaturados total,  $\Sigma$ PUFA n-6 - PUFA ômega 6,  $\Sigma$ PUFA n6- PUFA ômega 3.

**Apêndice 3-** Composição dos ácidos graxos do músculo de jovens-do-ano (YOY I e II) de *R. bonasus* e YOY de *R. brasiliensis* (média em %  $\pm$  desvio padrão e o coeficiente de variação em %).

Ácidos graxos (%)	<i>Rhinoptera bonasus</i>				<i>Rhinoptera brasiliensis</i>	
	YOY I (n = 32)		YOY II (n = 16)		(n = 6)	
<b>C15:0</b>	0.5 $\pm$ 0.01	1 %	-	-	0.5 $\pm$ 0.06	12 %
<b>C16:0iso</b>	1.5 $\pm$ 0.41	26 %	1.5 $\pm$ 0.55	36 %	1.4 $\pm$ 0.43	31 %
<b>C17:0</b>	1.5 $\pm$ 0.74	49 %	1.1 $\pm$ 0.67	63 %	2.0 $\pm$ 0.75	37 %
<b>C17:0anteiso</b>	1.0 $\pm$ 0.42	42 %	-	-	0.6 $\pm$ 0.19	30 %
<b>C18:0iso</b>	1.8 $\pm$ 1.10	59 %	-	-	1.7 $\pm$ 1.13	67 %
<b>C18:0anteiso</b>	1.5 $\pm$ 0.79	52 %	1.5 $\pm$ 0.40	27 %	-	-
<b>C20:0iso</b>	1.1 $\pm$ 0.68	61 %	-	-	-	-
<b>C15:1c</b>	0.6 $\pm$ 0.02	3 %	-	-	-	-
<b>C14:0</b>	3.2 $\pm$ 4.01	124 %	2.2 $\pm$ 1.90	88 %	1.9 $\pm$ 1.75	92 %
<b>C16:0</b>	20.1 $\pm$ 2.77	14 %	19.8 $\pm$ 2.61	13 %	23.0 $\pm$ 1.75*	8 %
<b>C18:0</b>	14.6 $\pm$ 2.19	15 %	14.6 $\pm$ 2.44	17 %	16.5 $\pm$ 1.42	9 %
<b>C20:0</b>	0.8 $\pm$ 0.43	53 %	1.0 $\pm$ 0.38	40 %	-	-
<b>C16:1n7</b>	2.9 $\pm$ 2.19	76 %	3.2 $\pm$ 1.28	40 %	4.0 $\pm$ 1.37	35 %
<b>C18:1n9</b>	7.4 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	23 %	9.9 $\pm$ 2.63 <sup>b</sup>	27 %	8.3 $\pm$ 2.30	28 %
<b>C18:1n7</b>	5.9 $\pm$ 1.15	19 %	6.1 $\pm$ 1.25	21 %	7.7 $\pm$ 1.09*	14 %
<b>C20:1n9</b>	1.8 $\pm$ 1.76	99 %	1.5 $\pm$ 0.84	55 %	0.8 $\pm$ 0.29	35 %
<b>C16:4n1</b>	2.3 $\pm$ 0.87	37 %	-	-	-	-
<b>C16:2n4</b>	-	-	-	-	2.2 $\pm$ 0.35	16 %
<b>C18:3n4</b>	0.9 $\pm$ 0.26	29 %	1.5 $\pm$ 1.17	81 %	-	-
<b>C18:3n3</b>	1.9 $\pm$ 1.26	66 %	1.6 $\pm$ 0.66	42 %	-	-
<b>C18:4n3</b>	2.0 $\pm$ 1.93	95 %	-	-	-	-
<b>C18:2n6t</b>	0.7 $\pm$ 0.02	3 %	0.6 $\pm$ 0.03	5 %	0.7 $\pm$ 0.03	5 %
<b>C18:2n9</b>	2.8 $\pm$ 1.89	68 %	-	-	-	-
<b>C20:3n3</b>	-	-	1.4 $\pm$ 0.60	42 %	-	-
<b>C20:4n3</b>	1.9 $\pm$ 1.20	62 %	1.7 $\pm$ 0.42	25 %	-	-
<b>C20:5n3 (EPA)</b>	1.3 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	26 %	2 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	20 %	1.4 $\pm$ 0.28	20 %
<b>C22:5n3</b>	3.9 $\pm$ 1.20	31 %	4.8 $\pm$ 1.44	30 %	4.5 $\pm$ 1.62	36 %
<b>C22:6n3 (DHA)</b>	19.9 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup>	20 %	16.8 $\pm$ 2.34 <sup>b</sup>	14 %	15.9 $\pm$ 4.13*	26 %
<b>C20:2n6</b>	1.8 $\pm$ 1.49	82 %	1.3 $\pm$ 0.75	59 %	-	-
<b>C20:4n6 (ARA)</b>	7.8 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>	18 %	6.0 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	19 %	5.4 $\pm$ 1.07*	20 %
<b>C22:4n6</b>	2.9 $\pm$ 0.92	32 %	3.3 $\pm$ 0.64	20 %	3.0 $\pm$ 0.94	32 %
<b>C22:5n6</b>	2.2 $\pm$ 0.70	31 %	2.7 $\pm$ 0.49	18 %	1.9 $\pm$ 0.18	10 %
<b><math>\Sigma</math> BFA - OFA</b>	4.5 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	34 %	3.5 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	24 %	4.9 $\pm$ 1.83	37 %
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	36.4 $\pm$ 4.21	12 %	36.0 $\pm$ 3.73	10 %	41.4 $\pm$ 3.10*	7 %
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	16.9 $\pm$ 3.24 <sup>a</sup>	19 %	20.2 $\pm$ 2.86 <sup>b</sup>	14 %	20.1 $\pm$ 3.98*	20 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	41.4 $\pm$ 6.22	15 %	40.1 $\pm$ 4.3	11 %	33.3 $\pm$ 6.21*	19 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA n3</b>	26.6 $\pm$ 4.58	17 %	25.7 $\pm$ 3.88	15 %	21.8 $\pm$ 5.50*	25 %
<b><math>\Sigma</math> PUFA n6</b>	13.7 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	15 %	13.3 $\pm$ 1.64 <sup>b</sup>	12 %	10.7 $\pm$ 1.47*	14 %
<b>n3/n6</b>	2.0 $\pm$ 0.26	14 %	1.9 $\pm$ 0.33	17 %	2.0 $\pm$ 0.36	18 %
<b><math>\Sigma</math> C20-22 n3</b>	25.9 $\pm$ 4.59	18 %	24.9 $\pm$ 3.37	13 %	21.7 $\pm$ 5.63	26 %
<b><math>\Sigma</math> C20-22 n6</b>	13.6 $\pm$ 2.11	16 %	13.1 $\pm$ 1.6	12 %	10.4 $\pm$ 1.50	14 %
<b>EPA/ARA</b>	0.2 $\pm$ 0.04	21 %	0.3 $\pm$ 0.07	20 %	0.3 $\pm$ 0.04	15 %
<b>DHA/ARA</b>	2.6 $\pm$ 0.4	15 %	2.8 $\pm$ 0.45	16 %	3.0 $\pm$ 0.82	27 %
<b>EPA/DHA</b>	0.1 $\pm$ 0.02	26 %	0.1 $\pm$ 0.02	16 %	0.1 $\pm$ 0.02	25 %
<b>DHA/EPA</b>	15.5 $\pm$ 3.44 <sup>a</sup>	22 %	8.6 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	16 %	9.9 $\pm$ 5.70*	57 %
<b>C16:1n7/C16:0</b>	0.2 $\pm$ 0.14	89 %	0.2 $\pm$ 0.11	62 %	0.4 $\pm$ 0.55*	131 %
<b>C18:1n9/C18:1n7</b>	1.3 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	35 %	1.8 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	53 %	2.7 $\pm$ 4.06	151 %
<b>ARA/EPA</b>	6.0 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	20 %	3.1 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	19 %	3.9 $\pm$ 0.57*	15 %

- Valores não encontrados ou menores que 0.5%.

<sup>ab</sup> indicam diferença estatística significativa entre YOY I e YOY II de *R. bonasus* e \* indicam diferença estatística significativa entre YOY I de *R. bonasus* e YOY de *R. brasiliensis* (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).  $\Sigma$ BFA - OFA – ácidos graxos ímpares e ramificados,  $\Sigma$ SFA - ácidos graxos saturados,  $\Sigma$ MUFA - ácidos graxos monoinsaturados,  $\Sigma$ PUFA - ácidos graxos polinsaturados total,  $\Sigma$ PUFA n-6 - PUFA ômega 6,  $\Sigma$ PUFA n6- PUFA ômega 3.

**Apêndice 4-** Composição dos ácidos graxos do plasma de jovens-do-ano (YOY I e II) de *R. bonasus* (média em %  $\pm$  desvio padrão e o coeficiente de variação em %).

Ácidos graxos (%)	<i>Rhinoptera bonasus</i>			
	YOY I (n = 12)		YOY II (n = 9)	
C15:0	0.7 $\pm$ 0.20	31 %	-	-
C17:0	1.9 $\pm$ 0.44	24 %	1.7 $\pm$ 0.41	25 %
C17:0anteiso	1.4 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	23 %	0.7 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	27 %
C18:0iso	0.9 $\pm$ 0.28	30 %	0.7 $\pm$ 0.24	33 %
C18:0anteiso	1.2 $\pm$ 0.23	20 %	0.8 $\pm$ 0.10	12 %
C20:0iso	1.4 $\pm$ 0.62	43 %	1.1 $\pm$ 0.47	45 %
C23:0	1.1 $\pm$ 0.49	47 %	-	-
C16:0	19.3 $\pm$ 3.82 <sup>a</sup>	20 %	14.2 $\pm$ 3.45 <sup>b</sup>	24 %
C18:0	13.6 $\pm$ 3.83	28 %	11.8 $\pm$ 3.42	29 %
C20:0	0.8 $\pm$ 0.12	16 %	0.6 $\pm$ 0.05	9 %
C22:0	1.3 $\pm$ 0.38	29 %	1.0 $\pm$ 0.16	15 %
C24:0	1.9 $\pm$ 1.02	53 %	0.9 $\pm$ 0.24	27 %
C14:1c	1.1 $\pm$ 0.56	51 %	-	-
C14:1t	1.0 $\pm$ 0.19	20 %	-	-
C16:1n7	1.8 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	31 %	1.4 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	28 %
C18:1n9	4.8 $\pm$ 1.21	25 %	4.7 $\pm$ 2.72	57 %
C18:1n7	3.2 $\pm$ 1.26	39 %	2.3 $\pm$ 0.87	38 %
C20:1n9	1.3 $\pm$ 0.75	59 %	1.2 $\pm$ 0.46	39 %
C20:1n11	0.8 $\pm$ 0.42	51 %	-	-
C22:1	1.3 $\pm$ 0.55	43 %	-	-
C16:4n1	1.3 $\pm$ 0.55	41 %	1.0 $\pm$ 0.35	34 %
C16:2n4	0.7 $\pm$ 0.09	13 %	-	-
C18:4n3	1.8 $\pm$ 1.04	59 %	1.1 $\pm$ 0.53	47 %
C18:2n6c	1.5 $\pm$ 1.02	70 %	1.2 $\pm$ 0.55	48 %
C18:2n6t	0.7 $\pm$ 0.10	14 %	0.8 $\pm$ 0.3	38 %
C18:2n9	1.8 $\pm$ 0.26	15 %	1.0 $\pm$ 0.64	63 %
C20:3n3	3.9 $\pm$ 2.97	75 %	3.2 $\pm$ 0.02	1 %
C20:4n3	1.1 $\pm$ 0.68	62 %	1.1 $\pm$ 0.86	75 %
C20:5n3 (EPA)	5.7 $\pm$ 2.91 <sup>a</sup>	51 %	7.8 $\pm$ 1.85 <sup>b</sup>	24 %
C22:5n3	2.3 $\pm$ 1.09	46 %	4.4 $\pm$ 1.08	24 %
C22:6n3 (DHA)	12.9 $\pm$ 7.14 <sup>a</sup>	55 %	22.5 $\pm$ 5.89 <sup>b</sup>	26 %
C21:5n3	1.1 $\pm$ 0.48	46 %	1.5 $\pm$ 0.96	63 %
C20:2n6	2.0 $\pm$ 0.73	36 %	1.8 $\pm$ 0.46	25 %
C20:4n6 (ARA)	7.1 $\pm$ 2.3	32 %	6.4 $\pm$ 1.56	25 %
C22:4n6	4.1 $\pm$ 1.78	44 %	5.1 $\pm$ 1.91	38 %
C22:5n6	2.7 $\pm$ 1.46	54 %	4.1 $\pm$ 1.54	38 %
$\Sigma$ BFA - OFA	7.0 $\pm$ 2.15 <sup>a</sup>	30 %	4.0 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	30 %
$\Sigma$ SFA	36.5 $\pm$ 8.15 <sup>a</sup>	22 %	28.0 $\pm$ 6.00 <sup>b</sup>	21 %
$\Sigma$ MUFA	12.6 $\pm$ 3.31	26 %	9.9 $\pm$ 3.57	36 %
$\Sigma$ PUFA	42.2 $\pm$ 12.87 <sup>a</sup>	31 %	56.9 $\pm$ 9.84 <sup>b</sup>	17 %
$\Sigma$ PUFA n3	24.1 $\pm$ 9.21 <sup>a</sup>	38 %	37.6 $\pm$ 7.71 <sup>b</sup>	21 %
$\Sigma$ PUFA n6	17.2 $\pm$ 4.79	28 %	18.7 $\pm$ 4.15	22 %
n3/n6	1.4 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	21 %	2.0 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	21 %
$\Sigma$ C18 n3	1.5 $\pm$ 1.24	81 %	0.9 $\pm$ 0.72	78 %
$\Sigma$ C20-22 n3	22.8 $\pm$ 9.97 <sup>a</sup>	44 %	36.7 $\pm$ 8.16 <sup>b</sup>	22 %
$\Sigma$ C18 n6	1.3 $\pm$ 0.92	68 %	1.3 $\pm$ 0.50	39 %
$\Sigma$ C20-22 n6	15.9 $\pm$ 4.90	31 %	17.4 $\pm$ 4.13	24 %
EPA/ARA	0.8 $\pm$ 0.18	23 %	2.3 $\pm$ 1.44	61 %
DHA/ARA	1.7 $\pm$ 0.52	30 %	2.1 $\pm$ 1.73	84 %
EPA/DHA	0.5 $\pm$ 0.12	26 %	0.4 $\pm$ 0.09	25 %
C16:1n7/C16:0	0.1 $\pm$ 0.04	44 %	0.1 $\pm$ 0.04	35 %
C18:1n9/C18:1n7	1.8 $\pm$ 0.99	55 %	2.2 $\pm$ 0.83	38 %
DHA/EPA	2.3 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	20 %	2.9 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	21 %
ARA/EPA	1.4 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	26 %	0.8 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	13 %

- Valores não encontrados ou menores que 0.5%.

<sup>ab</sup> indicam diferença estatística significativa entre YOY I e YOY II de *R. bonasus* (ANOVA seguido pelo teste de Tukey;  $p < 0.05$ ).  $\Sigma$ BFA - OFA – ácidos graxos ímpares e ramificados,  $\Sigma$ SFA - ácidos graxos saturados,  $\Sigma$ MUFA - ácidos graxos monoinsaturados,  $\Sigma$ PUFA - ácidos graxos polinsaturados total,  $\Sigma$ PUFA n-6 - PUFA ômega 6,  $\Sigma$ PUFA n6- PUFA ômega 3.