

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral IB-USP

PROJETO DE DOUTORADO

**ECOFISIOLOGIA E RELAÇÕES TRÓFICAS DE TUBARÕES:
BIOMARCADORES COMO FERRAMENTAS PARA CONSERVAÇÃO**

Doutoranda: MSc. Bianca de Sousa Rangel

<http://lattes.cnpq.br/4492933049709830>

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Professora Associada, RDIDP

<http://lattes.cnpq.br/4352170261682357>

Coorientador: Prof. Dr. Neil Hammerschlag

Professor Associado

Predator Ecology Lab e Shark Research and Conservation Program, Rosenstiel School of Marine & Atmospheric Science / Abess Center for Ecosystem Science & Policy, Universidade de Miami. 4600 Rickenbacker Causeway, Miami, Fl 33149-1098.

1. Introdução e justificativa

Ao longo do ciclo de vida, os animais lidam com alterações no estado nutricional, relacionados a diferentes fatores endógenos e exógenos, incluindo diferentes processos biológicos de alta demanda energética (Figura 1; Sheridan, 1994, Zera e Harshman, 2001). De modo que, os padrões de alocação de recursos para manutenção, crescimento e reprodução são parte integrante da história de vida de todos animais (Ricklefs e Wikelski, 2002). Neste sentido, o estudo de animais em ambiente natural é essencial para a compreensão das estratégias alimentares adotadas, diversidade fisiológica e necessidades nutricionais de cada espécie (Wikelski e Cooke, 2006; Cooke *et al.*, 2013; Gallagher *et al.*, 2017a). Dada a elevada diversidade nas estratégias de história de vida, os elasmobrânquios (tubarões e raias) tornam-se interessantes modelos para o estudo de relações entre a fisiologia e interações ecológicas no ambiente marinho (Cortés, 2000; Frisk, 2010). Informações estas, que são essenciais em modelos mecanicistas e para prever a capacidade de resposta aos potenciais impactos associados com atividades humanas e mudanças ambientais (Cooke *et al.*, 2013).

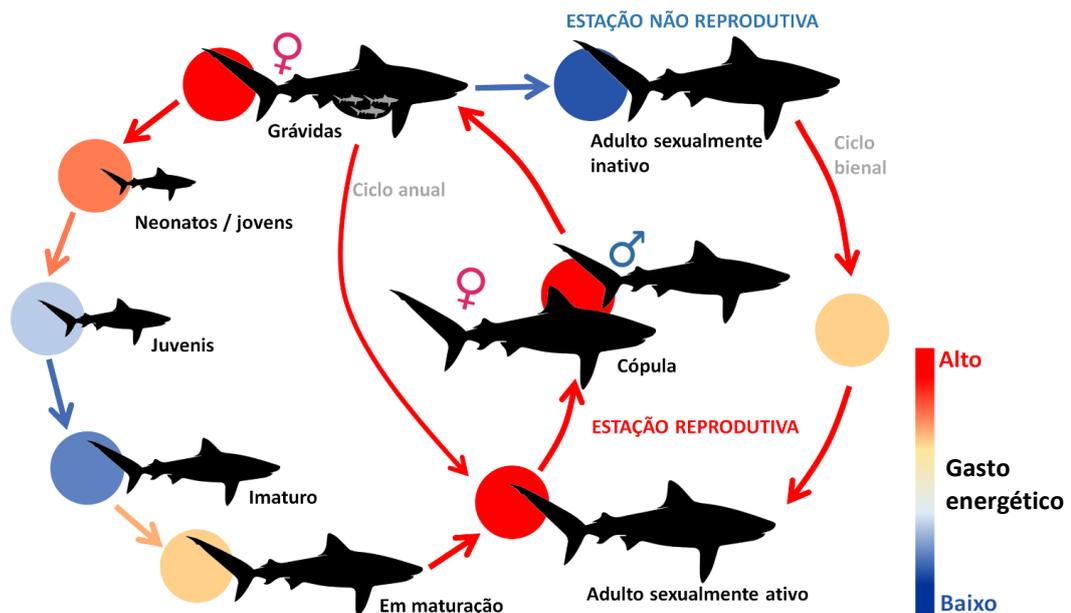


Figura 1- Modelo conceitual sobre o gasto de energia durante o ciclo de vida em tubarões vivíparos com ciclo anual e bienal.

Sendo eles predadores de topo ou mesopredadores, os elasmobrânquios desempenham destacado papel funcional na dinâmica dos ecossistemas marinhos, estuarinos e dulcícolas (Stevens *et al.*, 2000, Ferretti *et al.*, 2010). Ecologicamente, eles influenciam a transferência de energia através de interações ecológicas diretas, como predação, e indiretas como competição e modificação do comportamento de níveis tróficos inferiores (Figura 2) (Heithaus *et al.*, 2008; Dulvy *et al.*, 2017). Nesse sentido, reduções populacionais, principalmente de grandes tubarões,

refinar hipóteses para desenvolver quadros preditivos sobre os recursos energéticos utilizados em determinados estágios da vida, co-ocorrência e declínio de espécies chaves nos ecossistemas marinhos (Gallagher *et al.*, 2017b; Shipley *et al.*, 2019). Tal conhecimento é fundamental para entender os efeitos de perturbações ambientais e antrópicas nos processos fisiológicos e na transferência de energia nas redes tróficas de mesopredadores e predadores marinhos (Gonçalves *et al.*, 2017). Por exemplo, em resposta a alterações ambientais e/ou antropogênicas, consumidores que adotaram estratégias generalistas (maior amplitude de nicho alimentar, consumindo maior variedade de presas) são mais resistentes à alterações no ecossistema que possam afetar a disponibilidade de presas, por outro lado, espécies especialistas (menor amplitude de nicho alimentar, consumindo alguns tipos de presa), são previstas para serem relativamente mais suscetíveis a alterações antrópicas que afetam sua cadeia alimentar (Frisk, 2010; Gallagher *et al.*, 2012).

Para preencher parte destas lacunas, o presente projeto de doutorado irá investigar os efeitos da variação espacial, temporal e do estágio de vida na condição nutricional e relações tróficas em tubarões de diferentes estratégias de história de vida, no contexto das mudanças ambientais e manejo em áreas marinhas protegidas. Biomarcadores fisiológicos e tróficos serão utilizados como ferramentas para acessar: (1) o status e ciclo reprodutivo através do perfil dos esteroides gonadais; (2) o metabolismo energético e condição nutricional, através do perfil hormonal e dos metabólitos lipídico e perfil de ácidos graxos; e (3) a ecologia trófica e interação entre os tubarões, através da análise do perfil de ácidos graxos e isótopos estáveis. Parte deste projeto vem sendo realizado em parceria com o *Shark Research and Conservation Program*, da Universidade de Miami (Figura 3). Portanto, na presente proposta abordamos apenas a parte realizada com os tubarões estudados no Brasil.

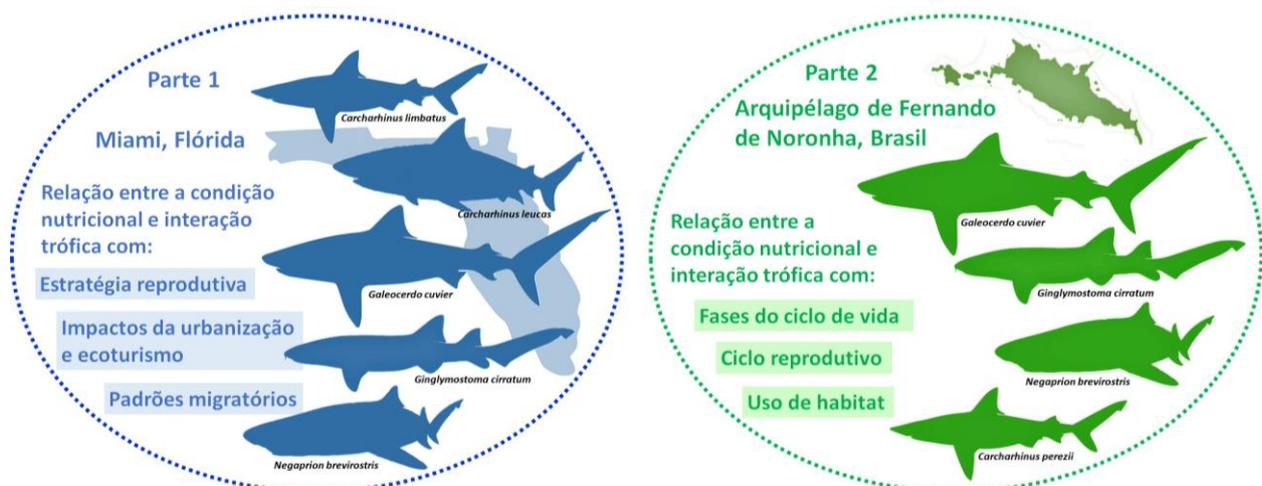


Figura 3- Modelo ilustrativo das duas partes que compõem o presente projeto de doutorado. Parte 1 vem sendo realizado com tubarões amostrados na região do sul da Florida, EUA. Parte 2 realizada no arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil, parte integrante da presente proposta.

Espécies móveis, como tubarões, são conhecidas por usar alguns habitats-chave, para sobreviver e maximizar o sucesso reprodutivo, usando essas áreas, com abundantes fontes de alimento, para forrageio, reprodução e berçário, bem como para evitar condições ambientais adversas (e.g. Lennox *et al.*, 2016). Algumas espécies de tubarões apresentam fidelidade a estes locais, por exemplo para acasalar, como visto para tubarões-lixia (*Ginglymostoma cirratum*) em águas rasas do parque nacional *Dry Tortugas* (Flórida, EUA) no início do verão (Carrier *et al.*, 2003), ou como área de berçário, como observado para tubarões-limão em Bimini, Bahamas e tubarões-de-pontas-negras-do-recife (*Carcharhinus melanopterus*) em Moorea, Polinésia Francesa (e.g. Mourier e Planes 2013, Feldheim *et al.*, 2014). A identificação e conservação desses habitats são essenciais para a conservação desses animais, que têm a maior proporção de espécies ameaçadas de qualquer vertebrado marinho (Davidson e Dulvy, 2017; Heupel *et al.*, 2018). Atualmente, no entanto, ainda é muito pouco conhecido sobre como os tubarões estão usando habitats-chave (por exemplo, para forrageamento, crescimento, reprodução), no Oceano Atlântico equatorial (Garla *et al.*, 2006; 2009; Afonso *et al.* 2016; 2017).

A área de proteção ambiental marinha de Fernando de Noronha fornece uma grande oportunidade para o estudo destes animais, uma vez que a região tem sido descrita como importante área de reprodução e berçário do tubarão-lixia *G. cirratum*, como berçário do tubarão-limão e tubarão-cabeça-de-cesto (*N. brevirostris* e *Carcharhinus perezi*; Garla *et al.*, 2006; 2009), e também utilizada por tubarões-tigre juvenis *Galeocerdo cuvier* (Afonso *et al.*, 2017). No entanto, algumas perguntas permanecem inexploradas, por exemplo: (1) espécies que são encontradas durante todo o ano, apresentam diferentes estágios do ciclo de vida e reprodutivo?; (2) uma variação na qualidade nutricional poderia estar relacionada ao ciclo de vida, ou à uma mudança nos nutrientes locais?; (3) como os tubarões que estão co-ocorrendo nesta região estão particionando ou competindo pelos mesmos recursos alimentares? (4) há uma estabilidade temporal nesta interação trófica?

Neste sentido, usando biomarcadores fisiológicos, obtidos através de amostragens não letais, serão testadas as seguintes hipóteses:

(1) Dado que estas espécies utilizam a região durante o ciclo reprodutivo, como para cópula, gestação, parto, e também por juvenis (Garla *et al.*, 2006; 2009; Afonso *et al.*, 2016; 2017), espera-se encontrar um padrão hormonal distinto para cada estágio (Figura 4) bem como uma variação sazonal no status reprodutivo. Com base em estudos anteriores (revisão em Awruch, 2013), esperamos que seja possível distinguir fêmeas em período de vitelogênese e gestação, através de suas altas concentrações de estradiol e progesterona. Consequentemente, espera-se encontrar baixas concentrações desses hormônios em fêmeas que não estão no período reprodutivo.

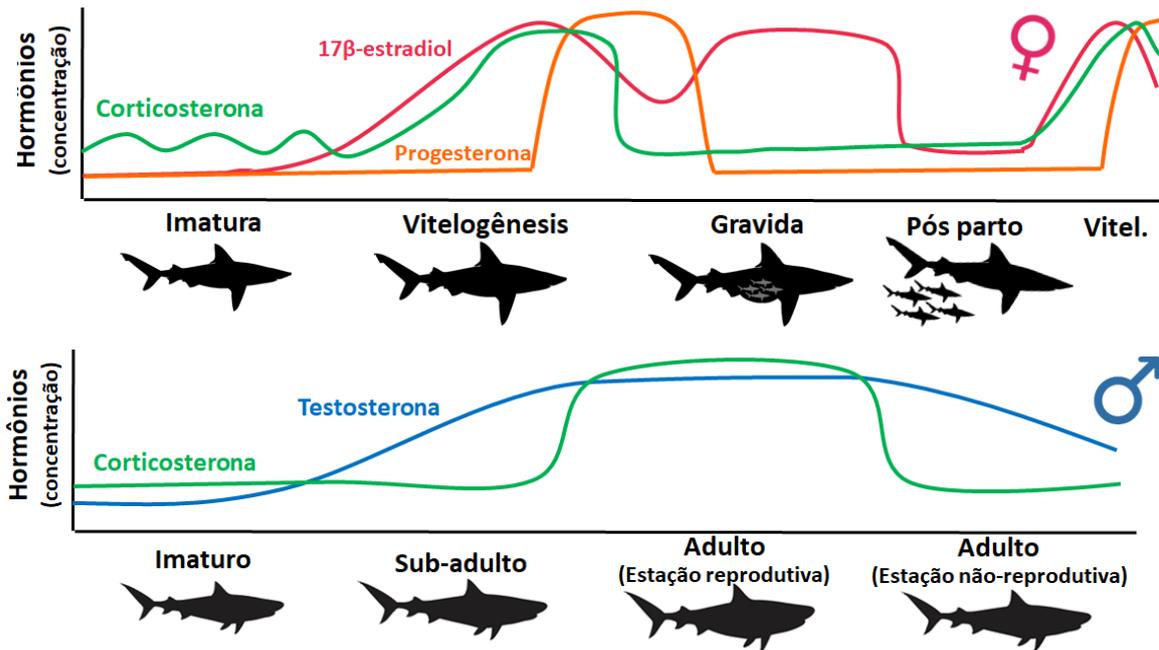


Figura 4- Previsão teórica sobre o perfil hormonal em fêmeas e machos durante diferentes estágios de vida, de imatura a pós-parto.

(2) Considerando os altos custos metabólicos do investimento materno em fêmeas e comportamento reprodutivo em machos, espera-se que eles usem energia armazenada previamente para a reprodução (Figura 5). No entanto, devido à grande diversidade de estratégia de história de vida dos tubarões estudados na região de estudo, espera-se encontrar uma variação nestes padrões entre as espécies, e uma relação direta entre a alocação de energia e a fase do ciclo de vida. Espera-se desta forma, encontrar indicadores de alta demanda energética e de mobilização dos estoques energéticos em fêmeas nas fases de vitelogênese e gestação, e em machos nos períodos de acasalamento.

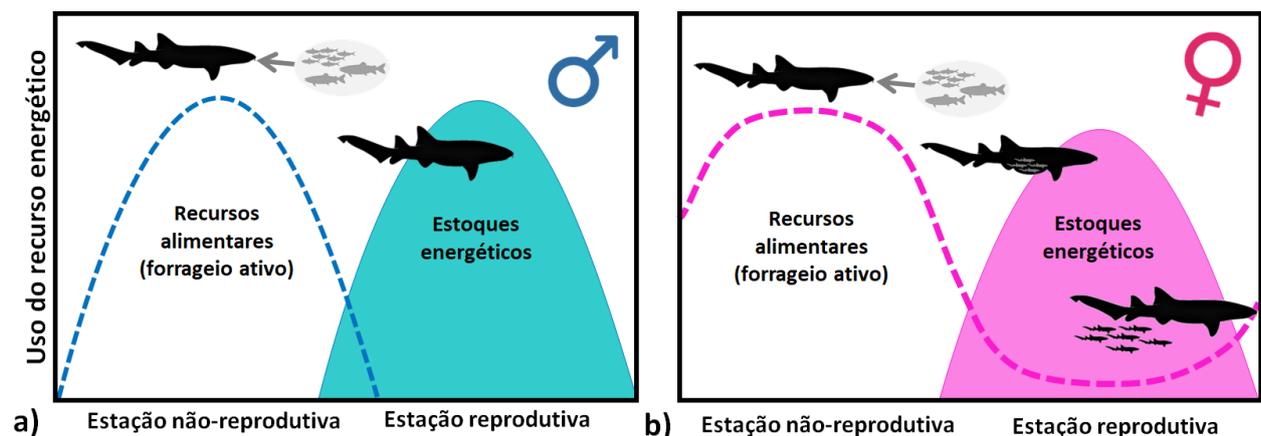


Figura 5- Modelo conceitual. (a) Ciclo sazonal do estoque energético e uso durante a reprodução em machos e (b) em fêmeas. Usando como exemplo o tubarão-lixá, *Ginglymostoma cirratum*.

(3) Biomarcadores tróficos (isótopos estáveis e ácidos graxos) serão utilizados como ferramentas para testar a hipótese de que os tubarões-tigre, limão, lixa e cabeça-de-cesto (*G.*

cuvier, *N. brevirostris*, *G. cirratum* e *C. perezii*, respectivamente) particionam recursos alimentares na região de estudo (Figura 6), dado que esta é uma estratégia comumente encontrada em tubarões simpátricos, para facilitar a co-ocorrência e evitar a competição (e.g. Gallagher *et al.*, 2017b; Shipley *et al.*, 2019). Neste sentido, espera-se encontrar uma estabilidade temporal nas relações tróficas entre eles. Especificamente para tubarões tigre, espera-se encontrar pelo menos dois grupos distintos, uma vez que a competição intraespecífica foi relatada para a espécie na região, onde alguns tubarões patrulhavam continuamente as águas costeiras por períodos prolongados, enquanto outros tubarões repetidamente fazem breves incursões nesses habitats, seguidos de períodos mais longos de ausência (Afonso *et al.*, 2019).

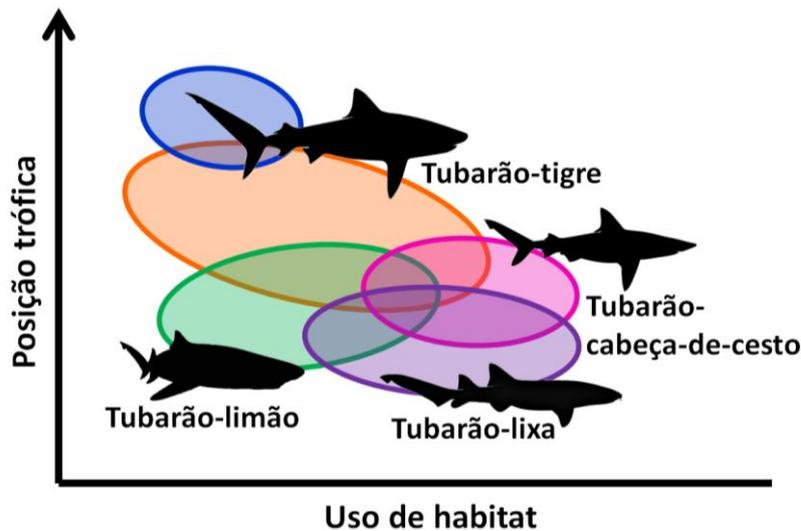


Figura 6- Modelo conceitual sobre a relação trófica intra e interespecífica dos tubarões na região. *Galeocerdo cuvier* (azul e laranja); *Negaprion brevirostris* (verde); *Ginglymostoma cirratum* (roxo) e *Carcharhinus perezii* (rosa).

(4) Dado que não foi observado nenhum efeito negativo do ecoturismo em estudos prévios em outras regiões (e.g. Hammerschlag *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2019), espera-se encontrar padrões uniformes de uso de recursos alimentares e na condição nutricional nos tubarões ocupando regiões com atividade turística em baixa e alta temporada.

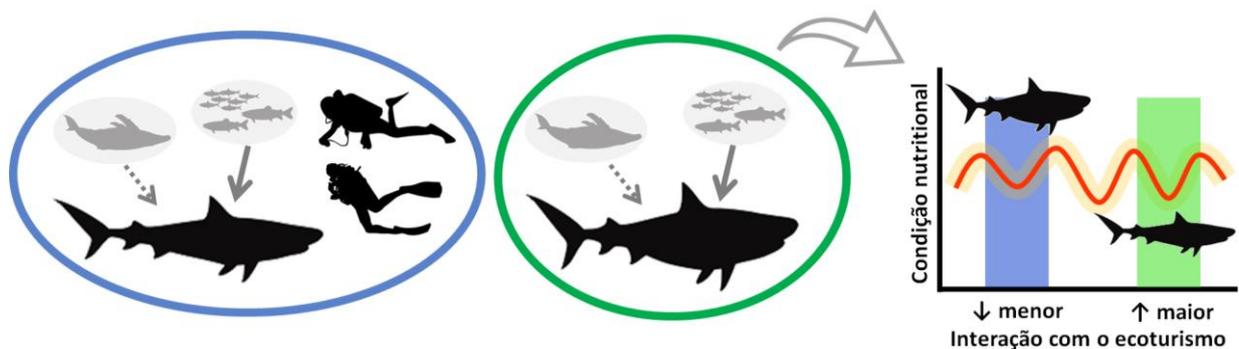


Figura 7- Modelo conceitual sobre a interação dos tubarões com o ecoturismo, menor ou maior (baixa temporada x alta temporada e locais com turistas x locais sem turistas) e a variação na condição nutricional.

2. Objetivo geral

Investigar os aspectos fisiológicos relacionados à reprodução, estado nutricional e relações tróficas em tubarões de diferentes estratégias de história de vida, no sistema insular de Fernando de Noronha, avaliando a importância dessa área para o ciclo de vida de cada espécie e como tais ferramentas poderão auxiliar no manejo em áreas marinhas protegidas e a prever os efeitos de perturbações ambientais.

2.1 Objetivos específicos

1) Identificar o estágio reprodutivo de tubarões das espécies *G. cuvier*, *N. brevirostris*, *G. cirratum* e *C. perezi*, avaliando o ciclo reprodutivo e como o estágio de vida influencia sazonalmente suas condições nutricionais e interações tróficas;

2) Analisar a influência temporal nos indicadores de qualidade nutricional e demanda metabólica em tubarões de diferentes estratégias alimentares, identificando nutrientes essenciais para cada espécie e como eles variam sazonalmente e em resposta ao ciclo de vida;

3) Explorar a complexidade trófica dos tubarões desta região, identificando o nível trófico e relação trófica entre as quatro espécies, mais especificamente explorando relações de competição ou partição de recursos alimentares, e as variações intra e interespecíficas;

4) Avaliar o impacto do ecoturismo na qualidade nutricional e relações tróficas de tubarões, comparando locais com e sem atividade (visitação/mergulho), bem como períodos de baixa e alta temporada;

5) Comparar parâmetros fisiológicos entre as populações do arquipélago de Fernando de Noronha e do sul da Flórida, avaliando se os parâmetros reprodutivos, nutricionais e tróficos variam espacialmente nas quatro espécies e quais poderiam ser as implicações em termos de monitoramento em áreas marinhas protegidas;

6) Caracterizar a resposta fisiológica espécie-específica ao estresse de captura em tubarões expostos à uma interação experimental de pesca padronizada, bem como identificar se fatores como tamanho, espécie e duração da pesca influenciam esta resposta;

3. Metodologia

3.1. Local de estudo

Foi selecionada a região do arquipélago de Fernando de Noronha, um grupo isolado de pequenas ilhas vulcânicas localizadas no Atlântico equatorial ocidental (03°51'S; 32°25'W), 345 km ao nordeste do Brasil, primeiramente devido à alta taxa de captura e abundância de tubarões na região, uma área de proteção marinha (Garla *et al.*, 2006; 2009; Afonso *et al.*, 2017), garantindo

assim um número amostral significativo para o teste das hipóteses propostas no presente estudo; secundamente por ser uma região de grande importância no ciclo de vida destes animais, seja para alimentação e/ou reprodução (Garla *et al.*, 2006; 2009). Além disso, o arquipélago de Fernando de Noronha é uma região que apresenta grande potencial ecoturístico, incluindo a interação com tubarões no mergulho e na pesquisa, permitindo efetivas ações de educação ambiental (Garla *et al.*, 2015; Pires *et al.*, 2016).

A coleta de amostras teve início este ano, em parceria com o Laboratório de Oceanografia Pesqueira, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, liderado pelo Prof. Dr. Fábio Hissa Vieira Hazin, conduzidas mediante às seguintes autorizações: Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio #67989-1) e comitê de ética (nº da licença 059/2019, nº do processo 23082.011664/2019-55), cadastro CGen (#A51BEA9). Os tubarões *G. cuvier*, *N. brevirostris*, *G. cirratum* e *C. perezii* foram escolhidas para o presente estudo devido à alta taxa de captura das espécies na região (Camila Araújo, comunicação pessoal).

3.2. Captura, manejo e amostragem dos animais

Os tubarões vêm sendo capturados através do uso de *drumlines* e espinhel pelágico de superfície e fundo, descrito detalhadamente em Afonso *et al.* (2017). Em resumo, o espinhel ou *drumline* são lançados e retirados após aproximadamente 2-3h para verificação da presença de tubarões. Os tubarões são laçados pela cauda e embarcados, e então uma mangueira de água é inserida na boca do tubarão para bombear ativamente a água sobre as brânquias enquanto o animal fica temporariamente imobilizado (Figura 8). Todos os tubarões capturados passam pelos seguintes procedimentos: (1) identificados a nível de espécie com base em suas características morfológicas; (2) sexo identificado através da presença/ausência do clássper; (3) recebem uma marca plástica do tipo *T-bar*, com um número de identificação no caso de recapturas; (4) obtidos dados biométricos (comprimento total, furcal com exceção do *G. Cirratum*, pré-caudal e interdorsal, todas em cm) e morfológicos, descritos abaixo; (5) coletadas amostras de tecido dérmico e muscular (biópsia de 6 mm); (6) coletadas amostras de sangue, obtidas por punção da vasculatura caudal (~10 ml), utilizando seringas descartáveis e heparinizadas (EDTA) (Figura 8b); e por fim, (7) alguns animais selecionados recebem também uma marca acústica, cirurgicamente implantadas na cavidade celômica (Figura 8b), para permitir a detecção de tubarões marcados por um arranjo estacionário composto por 12 receptores acústicos submarinos (VR2W, Vemco) estrategicamente arranjados na região de estudo.

Sub-amostras de sangue são então centrifugadas (1300 rpm) por 5 minutos em temperatura ambiente para separação do plasma. Todas as amostras de tecido, sangue total e plasma são

colocadas em tubos criogênicos, congeladas em nitrogênio líquido, até serem acondicionados em freezer em temperatura de -20°C , onde permanecem até o período das análises (Tabela 1).



Figura 8- (a) Procedimento de marcação, com marca acústica e (b) coleta de sangue em um tubarão-tigre (*Galeocerdo cuvier*). (c) manejo de um tubarão-limão (*Negaprion brevirostris*) e tubarão-lixia (*Ginglymostoma cirratum*) Fotos: © Laboratório de Oceanografia Pesqueira, UFRPE.

Tabela 1- Análises que serão realizadas nos tubarões do presente estudo indicando o tecido correspondente em cada uma. Não serão coletadas amostras de músculo e derme para o tubarão-lixia (), devido à sua camada de pele e dentículos dérmicos.

Análise	Tecido/fluido	Espécies			
		<i>Galeocerdo cuvier</i>	<i>Negaprion brevirostris</i>	<i>Ginglymostoma cirratum</i>	<i>Carcharhinus perezii</i>
Perfil de ácidos graxos	Plasma	X	X	X	X
	Músculo	X	X	-	X
	Derme	X	X	-	X
	Sangue total	X	X	X	X
Metabólitos					
<i>Triglicérides</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Colesterol</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>β-hydroxybutyrate</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Ureia</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Lactato</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Glicose</i>	Plasma	X	X	X	X
Hormônios esteroides					
<i>17β-estradiol</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Progesterona</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Testosterona</i>	Plasma	X	X	X	X
<i>Corticosterona</i>	Plasma	X	X	X	X
Isótopos estáveis	Sangue total	X	X	X	X

3.3. Caracterização do status reprodutivo

Para caracterizar o status reprodutivo será usada a análise de hormônios gonadais. A concentração plasmática dos hormônios esteroides 17β -estradiol, testosterona e progesterona das espécies de tubarões será quantificada utilizando-se kits comerciais (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) pelo método de Elisaimunoensaio (ELISA). Todas as amostras de plasma serão analisadas em duplicatas e as medições de absorvância serão realizadas em um leitor de microplacas (Spectra Max 250 Molecular Devices), seguindo os protocolos que vem sendo utilizados para elasmobrânquios no laboratório.

3.4. Condição nutricional e metabolismo energético

A condição nutricional será avaliada através de medidas morfométricas (condição corpórea) e variáveis fisiológicas (metabólitos lipídicos e perfil de ácidos graxos). A condição corporal dos tubarões será avaliada para cada indivíduo com base em cinco medidas morfológicas (ver detalhes em Irschick e Hammerschlag 2014, Figura 9). Em resumo, estas medições incluem (1) comprimento pré-caudal, a distância da ponta do focinho até a inserção da nadadeira caudal; (2) extensão lateral, (3) amplitude frontal, (4) extensão proximal e (5) circunferência da quilha caudal (Irschick e Hammerschlag 2014).

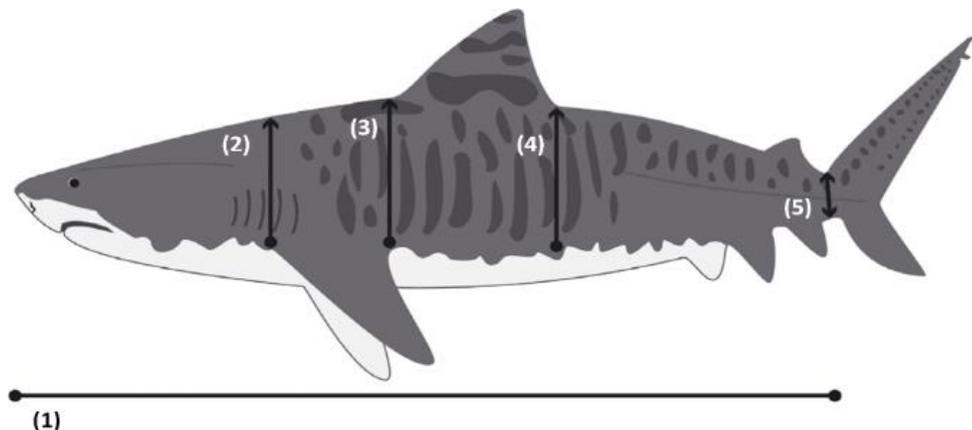


Figura 9- Medidas para cálculo da condição corporal. Modificado de Irschick e Hammerschlag (2014).

A concentração plasmática de corticosterona será quantificada utilizando-se kit comercial (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) pelo método de Elisaimunoensaio (ELISA), mesmo método descrito acima. Os metabólitos de triglicérides, colesterol e os corpos cetônicos (β -hidroxibutirato- β -HB) serão analisados para avaliar a demanda metabólica e a variação da condição nutricional durante diferentes fases do ciclo de vida. Os metabólitos serão medidos em amostras de plasma utilizando kits comerciais (triglicérides e colesterol: Labtest®; β -HB: Cayman

®) e métodos colorimétricos correspondentes, utilizando-se um espectrofotômetro ELISA (Spectra Max 250, Molecular Devices).

O perfil de ácidos graxos será utilizado para avaliar a variação da qualidade nutricional dos tubarões. Amostras de músculo (15-70 mg), derme (15-25 mg), sangue total e plasma (100µL) serão analisados por transmetilação direta descrita por Parrish *et al.* (2015). As amostras serão homogeneizadas em 3mL da solução metanol: diclorometano: ácido clorídrico concentrado (10:1:1 v:v:v) e mantidas em banho-maria por 2 horas a 80°C. Após a retirada e resfriamento, serão adicionados 1.5 ml de água Milli-Q, seguido de 1.5 ml de hexano e 0.3 ml de diclorometano. Após a mistura completa, os tubos serão centrifugados a 2.000 rpm durante 5 min. A camada superior orgânica será então removida e transferidas para os *vials* de injeção e evaporadas em nitrogênio. Os ácidos graxos serão analisados com o cromatógrafo à gás (Varian modelo 3900) acoplado a um ionizador de chama e autoinjeter (CP8410). Os ácidos graxos serão identificados com base no tempo de retenção, utilizando-se padrões conhecidos (Supelco, *37 components* – Sigma – Aldrich, dentre outros).

3.5 Interações tróficas

Análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$) será utilizada para avaliar a variação das interações tróficas intra e interespecíficas. As amostras de sangue total serão liofilizadas, pesadas e queimados 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_2 (g) e N_2 (g) resultantes serão analisados pela razão entre os isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, respectivamente, seguindo padrões internacionais reconhecidos. A razão isotópica de C e N será expressa em δ como parte por milhão (‰) baseado no cálculo: $\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 1000$, onde X é ^{13}C ou ^{15}N ; R é correspondente a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e δ é a proporção de luz emitida pelo isótopo na amostra. Os resultados da composição isotópica serão expressos em ‰, referentes aos padrões utilizados para C^{13} (carbonato PDB-Viena) e N^{15} (N_2 atmosférico).

3.6 Estresse de captura

Variáveis fisiológicas serão analisadas para avaliar a resposta ao estresse de captura das espécies estudadas, garantindo que estão sendo usados métodos adequados de captura e manejo. Ureia, glicose e lactato serão medidos em amostras de plasma utilizando kits comerciais (Labtest®, catalogo n. 27, n. 133-1/500 e n. 138-1/50, respectivamente). Todas as amostras de plasma

serão analisadas em duplicatas e as medições de absorvância serão realizadas em um leitor de microplacas (Spectra Max 250 Molecular Devices), seguindo os protocolos de cada kit.

3.7 Análises dos dados

Tamanho corporal e concentração de esteroides gonadais serão utilizados para categorização dos estágios de vida (♀: imatura, em vitelogênese, grávida, em repouso; ♂: imaturo, maduro ativo e inativo), grupos que serão então comparados entre si para avaliar a variância dos hormônios em cada estágio, espécie e estação do ano. A condição nutricional será descrita para cada espécie e comparada entre os estágios de vida, bem como verificada a correlação entre o tamanho e condição corpórea com os metabólitos, ácidos graxos e corticosterona, utilizando-se a correlação de Pearson. A comparação das variáveis entre os estágios de vida, locais com e sem atividade turística (visitação/mergulho) e períodos de baixa e alta temporada será realizada inicialmente pela Análise de Variância (one-way ANOVA) (Sigma Stat versão 3.1). Para dados paramétricos, será aplicado o teste post-hoc Student-Newmann-Keuls. Para os dados não paramétricos será aplicado o teste Dunn's ou Tukey. Será considerada diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Para explorar a variação no perfil de ácidos graxos e isótopos estáveis entre as espécies e estações do ano, em um primeiro momento serão utilizadas análise multivariadas como análise de componentes principais (PCA) e escalonamento multidimensional (nMDS), seguido das análises de porcentagem da similaridade (SIMPER) e análise de similaridades (ANOSIM), realizadas inicialmente no programa PAST v3.12. Posteriormente, testes através de modelos lineares generalizados (GLM) serão realizados para descrição completa dos dados obtidos.

4. Atividades previstas

As amostragens no sistema insular de Fernando de Noronha iniciaram este ano, com mais 4 expedições previstas para 2020 (Fevereiro / Maio / Agosto / Novembro) e 2 para 2021 (Fevereiro / Maio). Dentre as atividades acadêmicas, inclui-se a realização de disciplinas, ministrar minicursos e palestras, participação em eventos acadêmicos, apresentação de trabalhos com resultados resultantes do presente projeto, escrita de relatório e artigos científicos. Além disso, neste tempo serão realizadas as análises das amostras já coletadas no laboratório e análise de dados. Com exceção da análise de isótopos estáveis, no qual as amostras serão preparadas (liofilizadas, pesadas e colocadas nas capsulas) e então enviadas ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP-Piracicaba para análise. Durante o período do doutorado, prevê-se a realização de pelo menos 2 estágios no exterior, incluindo a Universidade de Miami e Universidade de Windsor.

5. Detalhamento da infraestrutura física e tecnológica a ser utilizada

Para o presente estudo será utilizada a infraestrutura de pesca (espinhel e *drumline*) para captura de tubarões do Laboratório de Oceanografia Pesqueira da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Além disso serão utilizados equipamentos (ELISA e cromatógrafo a gás, descritos acima), bem como todos materiais necessários para análise (vidrarias, reagentes, gases, entre outros), do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos da Universidade de São Paulo. Os kits hormonais e dos metabólitos serão adquiridos com o financiamento do projeto temático da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2014/16320–7).

6. Linhas gerais do cronograma a ser cumprido

Cronograma incluindo as atividades deste ano e referente à parte 1 do presente projeto, com tubarões da região da Florida e Bahamas.

Descrição das atividades (semestre)	2019		2020		2021		2022
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X
Disciplinas	X	X	X				
Monitoria de disciplinas			X	X			
Coleta de amostras em Fernando de Noronha		X	X	X	X		
Coleta de amostras na Flórida/Bahamas	X	X	X	X	X	X	
Envio das amostras de UMiami para IB-USP	X			X		X	
Análise das amostras	X	X	X	X	X	X	
Análise dos resultados	X	X	X	X	X	X	X
Apresentação em eventos científicos		X	X	X	X	X	X
Estágio no exterior	X				X	X	
Preparação de artigos científicos	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação				X			
Defesa do doutorado							X

7. Planilha de orçamento com estimativa dos gastos previstos

Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quant.	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo (descrever cada item)	Vials para cromatografia	Sim	7	pacote (100)	R\$ 122,00	854,00
	Reagentes (Metanol, Diclorometano, Clorofórmio)	Não	10	Unidade	R\$ 25,00	250,00
	Kit Triglicérides (Labtest)	Não	2	Unidade	R\$ 262,00	524,00
	Kit Colesterol (Labtest)	Não	2	Unidade	R\$ 260,00	520,00
	Kit 17B-Estradiol (Cayman)	Não	2	Unidade	R\$ 950,00	1.900,00
	Kit Progesterona (Cayman)	Não	2	Unidade	R\$ 800,00	1.600,00
	Kit Corticosterona (Cayman)	Não	2	Unidade	R\$ 950,00	1.900,00
	Kit Testosterona (Cayman)	Não	2	Unidade	R\$ 780,00	1.560,00
	Kit Lactato (Labtest)	Não	2	Unidade	R\$ 266,00	532,00
	Kit Glicose (Labtest)	Não	1	Unidade	R\$ 75,00	75,00
	Kit Ureia (Labtest)	Não	2	Unidade	R\$ 136,00	272,00
	Agulhas e seringas	Não	50	Unidade	R\$ 3,00	150,00
Serviço de Terceiros Pessoa Física	Saídas de barco para captura de tubarões *	Não	12	Dia	R\$ 2.500,00	30.000,00
Viagens	Passagens (São Paulo/Fernando de Noronha/São Paulo) *	Não	4	Viagem	R\$ 2.000,00	8.000,00
	Passagens (São Paulo/Fernando de Noronha/São Paulo)	Não	2	Viagem	R\$ 2.000,00	4.000,00
	Alimentação	Não	24	Dia	R\$ 70,00	1.680,00
	Transporte das amostras para análise de isótopos estáveis (São Paulo-SP/Piracicaba-SP/São Paulo-SP)	Não	2	Dia	R\$ 90,00	180,00
	Alojamento	Não	40	Dia	R\$ 65,00	2.600,00
TOTAL						56.597,00

*Itens solicitados para financiamento do FUNBIO.

8. Resultados esperados e impacto previsto do projeto

No presente projeto identificaremos o status reprodutivo para tubarões considerados adultos, separando os animais em classes (♀: imatura, em vitelogênese, grávida, em repouso; ♂: imaturo, maduro ativo e inativo). Uma vez identificada, estas classes serão utilizadas para entender a importância da região de estudo no ciclo de vida das quatro espécies de tubarões estudadas. Tomadas em conjunto as análises fisiológicas e morfométricas, espera-se entender como a alocação energética e condição nutricional, aspectos que são estritamente relacionados ao crescimento, reprodução e migração, variam em resposta ao estágio de vida, sazonalidade e entre as espécies.

Com a análise de biomarcadores tróficos iremos descrever os papéis ecológicos dos tubarões no sistema insular de Fernando de Noronha, bem como identificar suas interações intra e interespecífica. Além disso seremos capazes de comparar, em termos qualitativos, a variação na dieta nas quatro espécies de tubarões e avaliar o impacto de atividades ecoturísticas na qualidade nutricional durante períodos de alta temporada.

Tais descrições de base fisiológica da história de vida dos tubarões servirão de base para futuros estudos sobre possíveis distúrbios ambientais e/ou antrópicos na região, bem como para medidas de gestão específicas que podem ser requeridas para as atividades ecoturísticas. Possibilitando desta forma, monitorar as populações longo prazo, utilizando-se um método rápido e minimamente invasivo, já validado para as espécies em questão.

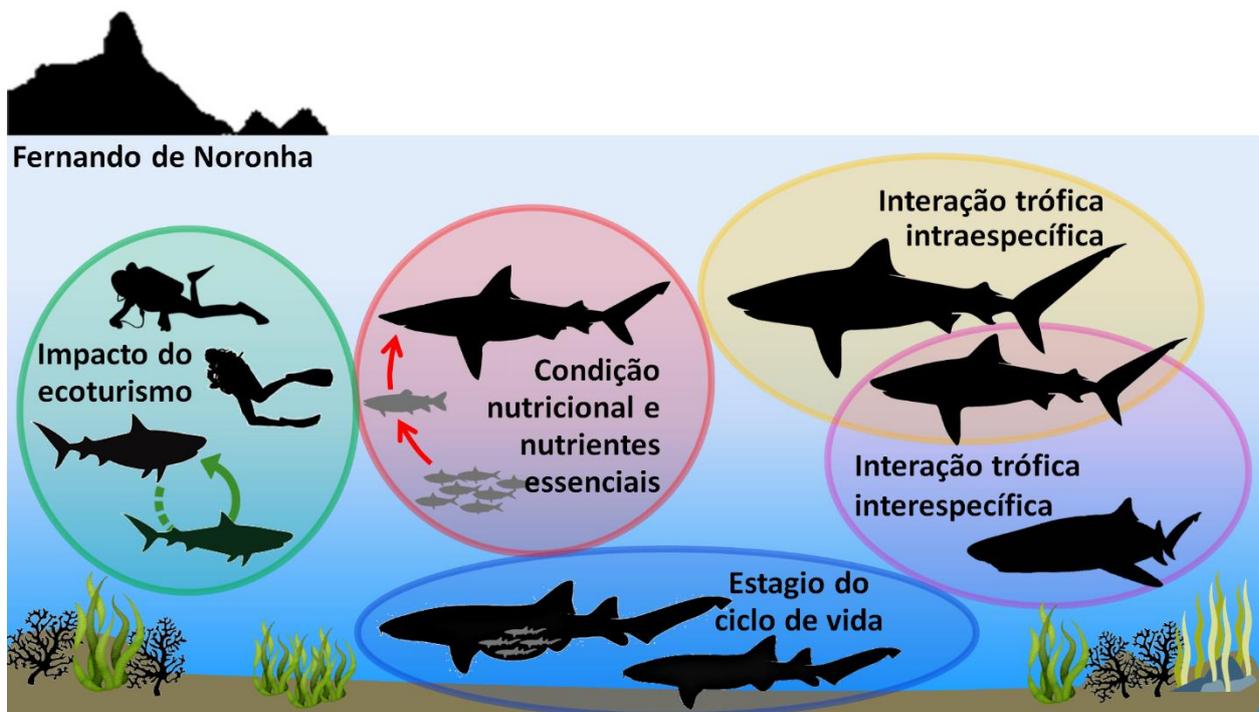


Figura 10- Síntese dos resultados esperados e impacto previsto do projeto, usando algumas espécies como modelo.

9. Referências bibliográficas

- Afonso, A. S., Cantareli, C. V., Levy, R. P., & Veras, L. B. (2016). Evasive mating behaviour by female nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788), in an equatorial insular breeding ground. *Neotropical Ichthyology*, 14(4).
- Afonso, A. S., Garla, R., & Hazin, F. H. (2017). Tiger sharks can connect equatorial habitats and fisheries across the Atlantic Ocean basin. *PloS one*, 12(9), e0184763.
- Afonso, A. S., Hazin, F. H. & Veras, L. B. (2019). Spatial ecology and conservation of the tiger shark, *Galeocerdo cuvier*, in the equatorial Atlantic Ocean. *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR'18 | International Meeting on Marine Research 2018*.
- Awruch, C. A. (2013). Reproductive endocrinology in chondrichthyans: the present and the future. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 60-70.
- 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.
- Carrier, J. C., Murru, F. L., Walsh, M. T., & Pratt Jr, H. L. (2003). Assessing reproductive potential and gestation in nurse sharks (*Ginglymostoma cirratum*) using ultrasonography and endoscopy: an example of bridging the gap between field research and captive studies. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 22(2), 179-187.
- Cooke, S. J., Sack, L., Franklin, C. E., Farrell, A. P., Beardall, J., Wikelski, M., & Chown, S. L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conservation Physiology*, 1(1), cot001.
- Cortés, E. (1999). Standardized diet compositions and trophic levels of sharks. *ICES Journal of marine science*, 56(5), 707-717.
- Cortés, E. (2000). Life history patterns and correlations in sharks. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 299-344.
- Davidson, L. N., & Dulvy, N. K. (2017). Global marine protected areas to prevent extinctions. *Nature ecology & evolution*, 1(2), 0040.
- Dulvy, N. K., Fowler, S. L., Musick, J. A., Cavanagh, R. D., Kyne, P. M., Harrison, L. R., ... & Pollock, C. M. (2014). Extinction risk and conservation of the world's sharks and rays. *Elife*, 3, e00590.
- Dulvy, N. K., Simpfendorfer, C. A., Davidson, L. N., Fordham, S. V., Bräutigam, A., Sant, G., & Welch, D. J. (2017). Challenges and priorities in shark and ray conservation. *Current Biology*, 27(11), R565-R572.

- Feldheim, K. A., Gruber, S. H., DiBattista, J. D., Babcock, E. A., Kessel, S. T., Hendry, A. P., ... & Chapman, D. D. (2014). Two decades of genetic profiling yields first evidence of natal philopatry and long-term fidelity to parturition sites in sharks. *Molecular Ecology*, 23(1), 110-117.
- 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), 1055-1071.
- Frisk, M. G., Miller, T. J., & Fogarty, M. J. (2001). Estimation and analysis of biological parameters in elasmobranch fishes: a comparative life history study. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(5), 969-981.
- Gallagher, A. J., Kyne, P. M., & Hammerschlag, N. (2012). Ecological risk assessment and its application to elasmobranch conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 80(5), 1727-1748.
- Gallagher, A. J., Skubel, R. A., Pethybridge, H. R., & Hammerschlag, N. (2017a). Energy metabolism in mobile, wild-sampled sharks inferred by plasma lipids. *Conservation Physiology*, 5(1).
- Gallagher, A. J., Shiffman, D. S., Byrnes, E. E., Hammerschlag-Peyer, C. M., & Hammerschlag, N. (2017b). Patterns of resource use and isotopic niche overlap among three species of sharks occurring within a protected subtropical estuary. *Aquatic Ecology*, 51(3), 435-448.
- Garla, R. C., Chapman, D. D., Wetherbee, B. M., & Shivji, M. (2006). Movement patterns of young Caribbean reef sharks, *Carcharhinus perezi*, at Fernando de Noronha Archipelago, Brazil: the potential of marine protected areas for conservation of a nursery ground. *Marine Biology*, 149(2), 189-199.
- Garla, R. C., Freitas, R. H., Calado, J. F., Paterno, G. B., & Carvalho, A. R. (2015). Public awareness of the economic potential and threats to sharks of a tropical oceanic archipelago in the western South Atlantic. *Marine Policy*, 60, 128-133.
- Garla, R. C., Garcia, J., Veras, L. B., & Lopes, N. P. (2009). Fernando de Noronha as an insular nursery area for lemon sharks, *Negaprion brevirostris*, and nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*, in the equatorial western Atlantic Ocean. *Marine Biodiversity Records*, 2.
- Gonçalves, A. M., Marques, J. C., & Gonçalves, F. (2017). Fatty Acids' Profiles of Aquatic Organisms: Revealing the Impacts of Environmental and Anthropogenic Stressors. In *Fatty Acids*. IntechOpen.
- Grubbs, R. D., Carlson, J. K., Romine, J. G., Curtis, T. H., McElroy, W. D., McCandless, C. T., & Musick, J. A. (2016). Critical assessment and ramifications of a purported marine trophic cascade. *Scientific Reports*, 6, 20970.

- Heithaus, M.R. et al. 2008. Predicting ecological consequences of marine top predator declines. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4), 202-210.
- Heupel, M. R., Kanno, S., Martins, A. P., & Simpfendorfer, C. A. (2019). Advances in understanding the roles and benefits of nursery areas for elasmobranch populations. *Marine and Freshwater Research*, 70(7), 897-907.
- Hammerschlag, N., Gallagher, A. J., Wester, J., Luo, J., & Ault, J. S. (2012). Don't bite the hand that feeds: assessing ecological impacts of provisioning ecotourism on an apex marine predator. *Functional Ecology*, 26(3), 567-576.
- Hammerschlag, N., & Sulikowski, J. (2011). Killing for conservation: the need for alternatives to lethal sampling of apex predatory sharks. *Endangered Species Research*, 14(2), 135-140.
- 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(5), 1449-1484.
- Hussey, N. E., MacNeil, M. A., Siple, M. C., Popp, B. N., Dudley, S. F., & Fisk, A. T. (2015). Expanded trophic complexity among large sharks. *Food Webs*, 4, 1-7.
- Irschick, D. J., & Hammerschlag, N. (2015). Morphological scaling of body form in four shark species differing in ecology and life history. *Biological journal of the Linnean Society*, 114(1), 126-135.
- Iverson, S. J. (2009). Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. In *Lipids in aquatic ecosystems* (pp. 281-308). Springer, New York, NY.
- Lennox, R. J., Chapman, J. M., Souliere, C. M., Tudorache, C., Wikelski, M., Metcalfe, J. D., & Cooke, S. J. (2016). Conservation physiology of animal migration. *Conservation physiology*, 4(1).
- Meyer, L., Pethybridge, H., Beckmann, C., Bruce, B., & Huveneers, C. (2019). The impact of wildlife tourism on the foraging ecology and nutritional condition of an apex predator. *Tourism Management*, 75, 206-215.
- Mourier, J., & Planes, S. (2013). Direct genetic evidence for reproductive philopatry and associated fine-scale migrations in female blacktip reef sharks (*Carcharhinus melanopterus*) in French Polynesia. *Molecular Ecology*, 22(1), 201-214.
- Myers, R. A., Baum, J. K., Shepherd, T. D., Powers, S. P., & Peterson, C. H. (2007). Cascading effects of the loss of apex predatory sharks from a coastal ocean. *Science*, 315(5820), 1846-1850.

- Parrish, C. C., Nichols, P. D., Pethybridge, H., & Young, J. W. (2015). Direct determination of fatty acids in fish tissues: quantifying top predator trophic connections. *Oecologia*, 177(1), 85-95.
- 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(6), 1367-1384.
- 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.
- Pires, N. M., Garla, R. C., & Carvalho, A. R. (2016). The economic role of sharks in a major ecotourism archipelago in the western South Atlantic. *Marine Policy*, 72, 31-39.
- Ricklefs, R. E., & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(10), 462-468.
- Roff, G., Doropoulos, C., Rogers, A., Bozec, Y. M., Krueck, N. C., Aurellado, E. & Mumby, P. J. (2016). The ecological role of sharks on coral reefs. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(5), 395-407.
- Sheridan, M. A. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 107(4), 495-508.
- Shipley, O. N.; Gallagher, A. J.; Shiffman, D. S.; Kaufman, L.; Hammerschlag, N. (2019). Diverse resource-use strategies in a large-bodied marine predator guild: evidence from differential use of resource subsidies and intraspecific isotopic variation. *Marine Ecology Progress Series*.623: 71–83.
- Stevens, J. D., Bonfil, R., Dulvy, N. K., & Walker, P. A. (2000). The effects of fishing on sharks, rays, and chimaeras (chondrichthyans), and the implications for marine ecosystems. *ICES Journal of Marine Science*, 57(3), 476-494.
- Zera, A. J., & Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual review of Ecology and Systematics*, 32(1), 95-126.
- Wikelski, M., & Cooke, S. J. (2006). Conservation physiology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 38-46.