

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

USO DO HABITAT, ECOLOGIA TRÓFICA E SOBREPOSIÇÃO DE NICHOS
EM ODONTOCETOS DO ATLÂNTICO SUL-OCIDENTAL, ATRAVÉS DA
ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

ANA CAROLINA CORRÊA TATSCH

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

Orientadora: Silvina Botta
Co-orientador: Eduardo Resende Secchi

RIO GRANDE
Julho, 2015

*"Nada na vida é para ser temido,
é apenas para ser compreendido.
Agora é a hora de compreender mais,
para que possamos temer menos."*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar, à minha querida e maravilhosa orientadora Silvina Botta, que sempre me ajudou muito em tudo, durante cada etapa deste trabalho, e com quem tive a oportunidade de aprender muito, me puxando a orelha sempre que necessário e me guiando, sempre com muita paciência (e olha que eu sou um desafio à paciência de qualquer um), no caminho das pedras, digo, dos papers. Sil, muitíssimo obrigada por tudo!!!
- Ao meu querido e maravilhoso co-orientador Eduardo Secchi, que sempre me deu grande apoio, estando sempre disposto a me ajudar nos momentos em que mais precisei, corrigindo sempre com muito carinho os meus trabalhos, mesmo mareado durante o embarque ou em viagens. E em qualquer lugar do planeta! Edu, fico sem palavras para te agradecer!!
- Aos membros da banca, professores Dr. Alexandre Garcia e a Dra. Valentina Franco-Trecu, por aceitarem o convite e colaborarem com mais esta etapa do meu crescimento profissional.
- À Lilia, que apesar de me importunar o tempo todo, me ajudou a cortar os enormes dentes de cachalotes, sem que eu destruísse a serra metalográfica do laboratório. Sem ela, talvez eu tivesse que trabalhar o resto da vida só para pagar esses eventuais prejuízos. Valeu “Lídia”!!!
- Ao Marcelo, Guga e Dove, que me ajudaram a encontrar e carregar os enormes crânios das baleias-bicudas dentro de um container escuro e apertado, em dias de sol escaldante, para que eu pudesse retirar as amostras de ossos. Valeu gurizada!!
- À Elisa, que me ajudou com o procedimento de extração de lipídios.
- Ao Jony, que me ajudou na revisão e identificação das espécies.
- Às minhas queridas amigas do coração, Genyffer e Thaíse, pelo apoio, por todas as nossas conversas “isotópicas”, e por aturarem o meu peculiar mau humor.
- A todos aqueles que, mesmo antes de eu nascer (e olha que eu não sou mais tão jovem) já coletavam as amostras de dentes dos animais

encalhados. Sem o árduo trabalho de todas essas pessoas, este trabalho não poderia ter sido realizado. A todos vocês, os meus mais sinceros agradecimentos!!

- Aos órgãos financiadores e apoiadores do projeto, Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES, Yaqu Pacha e Cetacean Society International.
- Ao Laboratório de Ictiologia, pelo empréstimo da balança para a pesagem das amostras isotópicas.
- Aos fascinantes e misteriosos odontocetos, os quais tive o privilégio de conhecer (ainda que não em sua melhor versão) e poder aprender, ainda que apenas um pouquinho, sobre o quanto suas vidas são muito mais interessantes do que a de nós, reles humanos.
- Aos meus amados pais, Elena e Léo, por todo o apoio e compreensão que tiveram para comigo durante todo o mestrado, bem como pelo amor incondicional que sempre tiveram e sempre demonstraram por mim.
- Aos meus amados e divertidos “filhos”, Darwin, Foguinho, Anúbis, Gaia e Guria, que sempre me distraíram (às vezes até mais do que eu gostaria) nos momentos em que eu já não aguentava mais pensar sobre cetáceos, e necessitava da companhia de animais, digamos, menos exóticos. Meus amores, sem vocês na minha vida, tudo teria sido muito mais fácil!!!
- E, em especial, ao João, meu companheiro e grande amor da minha vida, pelo seu imenso companheirismo, amor, carinho, dedicação e, principalmente, compreensão sem iguais que sempre teve comigo durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sempre me incentivando e me tranquilizando, comemorando junto comigo todas as alegrias e, principalmente, me ajudando a superar algumas eventuais frustrações no decorrer desta caminhada. Além da enorme paciência que teve, especialmente nos últimos meses da dissertação. Amor, te amo!!!

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
APRESENTAÇÃO	5
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	6
<i>Odontocetos do Atlântico Sul-Occidental</i>	<i>6</i>
<i>Métodos de Estudo em Ecologia Trófica: diretos versus indiretos</i>	<i>13</i>
<i>Gradientes Isotópicos no Ambiente Marinho</i>	<i>16</i>
<i>Nicho Ecológico versus Nicho Isotópico</i>	<i>17</i>
<i>Limitações Metodológicas das Análises Isotópicas.....</i>	<i>18</i>
<i>Hipóteses e Objetivos</i>	<i>21</i>
Hipóteses	22
Objetivos	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
<i>Área de Estudo</i>	<i>24</i>
<i>Amostragem.....</i>	<i>24</i>
<i>Análises de Isótopos Estáveis</i>	<i>25</i>
<i>Modelos de Normalização Lipídica</i>	<i>27</i>
<i>Análises Estatísticas</i>	<i>27</i>
SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	29
<i>Ecologia trófica e habitat de forrageio: variações intraespecíficas (Capítulo 2)</i>	29
<i>Ecologia trófica e habitat de forrageio: variações interespecíficas (Capítulo 2)</i>	30
Nichos isotópicos	30
<i>Efeitos da acidificação, extração química e normalização lipídica sobre os</i> <i>valores isotópicos de carbono e nitrogênio (Anexo I).....</i>	31
CONCLUSÕES PRINCIPAIS	32
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO 2: USO DO HABITAT, ECOLOGIA TRÓFICA E SOBREPOSIÇÃO DE NICHOS EM ODONTOCETOS DO ATLÂNTICO SUL-OCIDENTAL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS	40
ANEXO I.....	78

**USO DO HABITAT, ECOLOGIA TRÓFICA E SOBREPOSIÇÃO DE
NICHOS EM ODONTOCETOS DO ATLÂNTICO SUL-OCIDENTAL, ATRAVÉS
DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a dieta, identificar áreas de forrageio, bem como o nicho isotópico de 18 espécies de odontocetos, pertencentes a quatro famílias distintas, que habitam diferentes zonas oceanográficas do Atlântico Sul-Occidental (ASO). Foi utilizado o método de análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, em amostras de dentes e ossos de 122 exemplares. Além disso, a fim de avaliar possíveis vieses nas análises isotópicas, foram testados os efeitos da acidificação e da extração química de lipídios, bem como da interação entre estes tratamentos em ossos de baleias-bicuda. Foi também testada a eficiência de quatro modelos matemáticos de correção lipídica anteriormente publicados. A mudança no $\delta^{13}\text{C}$ após a extração foi significativa, evidenciando a necessidade de eliminar *a priori* os lipídeos das amostras ou utilizar um modelo matemático *a posteriori*. Níveis tróficos e/ou áreas de forrageio distintos foram evidenciados entre espécies e possíveis ecótipos. Um gradiente costa-oceano, assim como uma variação latitudinal, foram demonstrados através dos valores isotópicos de carbono apresentados pelas espécies analisadas. Duas espécies (*Orcinus orca* e *Pseudorca crassidens*) apresentaram diferenças intraespecíficas nas áreas de forrageio. Dentre as espécies que forrageiam em regiões da plataforma interna (i.e., enriquecidas em ^{13}C) dois grandes predadores (i.e., *O. orca* e *P. crassidens*) particionam

seus nichos em níveis tróficos elevados. Em regiões mais afastadas da costa (valores de $\delta^{13}\text{C}$ intermediários), diversas espécies também coexistem sem ter uma sobreposição nos seus nichos tróficos, ocupando desde posições tróficas elevadas (i.e., *P. crassidens*), intermediárias (i.e., *Steno bredanensis*), e outras mais baixas, como *Delphinus delphis* e *Stenella frontalis*. Na região da plataforma externa, incluindo talude e zonas mais profundas, duas espécies puderam ser localizadas em níveis tróficos baixos (i.e., *P. crassidens* e *Grampus griseus*), estando *Physeter macrocephalus* no extremo superior da cadeia trófica, e outras espécies (i.e., *Kogia breviceps*, *Lagenodelphis hosei*, *Globicephala melas*) em níveis tróficos intermediários. Zifídeos apresentaram baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, coincidindo com suas dietas teutófagas e sua distribuição sobre águas profundas. Dentre eles, espécies tipicamente de altas latitudes (e.g., *Berardius arnuxii*) apresentaram os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$, de acordo com o gradiente latitudinal decrescente em direção aos polos encontrado nas bases das redes tróficas. Este estudo analisou evidências isotópicas de longo prazo sobre o habitat de forrageio e hábito alimentar de odontocetos, sugerindo que a plataforma externa e o talude são áreas de grande importância ecológica para os odontocetos do ASO, contribuindo com informações relevantes sobre o papel ecológico destes organismos neste ecossistema.

PALAVRAS-CHAVE: uso do habitat, ecologia trófica, nicho isotópico, odontocetos, Atlântico Sul-Occidental, isótopos estáveis, extração de lipídios.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the diet, identify foraging areas, as well as the isotopic niche 18 species of toothed whales, belonging to four distinct families, inhabiting different oceanographic zones of the Western South Atlantic (WSA). The analysis of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ on samples of teeth and bones of 122 specimens was used. Furthermore, to evaluate the possible biases in the isotopic analysis, the effects of acidification and chemical extraction of lipids was tested, as well as the interaction between these treatments on bone of beaked whales. The efficiency of four mathematical models of lipid correction previously published was also tested. The change in $\delta^{13}\text{C}$ after extraction was significant evidence of the need to account for lipids either *a priori* through chemical extraction or by applying a mathematical model *a posteriori*. Trophic levels and/or different foraging areas were evidenced between species and possible ecotypes. Coastal-oceanic and latitudinal gradients were identified for carbon isotope values presented by the analyzed species. In addition, two species (*O. orca* and *P. crassidens*) showed intraspecific differences in foraging areas. Among the species that forage in areas of inner shelf (i.e. enriched in ^{13}C) two large predators (*O. orca* and *P. crassidens*) partitioned their niche in higher trophic levels. In more remote areas off the coast (intermediate values of $\delta^{13}\text{C}$) several species also coexist without an overlap in their trophic niches, from high trophic positions (i.e. *P. crassidens*), intermediate (i.e. *S. bredanensis*) and species at lower trophic levels such as *D. delphis* and *S. frontalis*. In the region of the outer continental shelf, including the slope and deeper areas two species might be located in lower trophic levels (*P. crassidens* and *G. griseus*), with *P. macrocephalus* at the upper end of the food

chain and other species (i.e. *K. breviceps*, *L. hosei*, *S. coeruleoalba*, *G. melas*) in intermediate levels. Ziphiids showed low values of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ coinciding with its teuthophagous habit and distribution in deep waters. Among them, typically high-latitude species (e.g., *B. arnuxii*) had the lowest $\delta^{13}\text{C}$ values following the decreasing latitudinal gradient of the base of the food webs toward the poles. This study analyzed the isotopic evidence of the long-term foraging habitat and feeding habit of toothed whales, suggesting that the outer continental shelf and slope are of great ecological importance for odontocetes in the WSA, providing relevant information on the ecological role of these organisms in this ecosystem.

KEYWORDS: use of habitat, trophic ecology, isotopic niche, odontocetes, Western South Atlantic, stable isotopes, lipid extraction.

APRESENTAÇÃO

O Oceano Atlântico Sul-Occidental apresenta uma grande riqueza de cetáceos odontocetos. O conhecimento sobre a ecologia trófica e o uso do habitat destes animais é imprescindível para a compreensão de seus papéis ecológicos nos ecossistemas marinhos. Os odontocetos consomem uma ampla variedade de organismos nos diferentes habitats por eles ocupados que, em grande parte dos casos, ocorre em regiões oceanográficas distantes da costa, como a plataforma média e externa, talude e regiões oceânicas profundas. Por esta razão, estudos que abordem a ecologia trófica e o uso do habitat destas espécies costumam ser dispendiosos e de difícil execução. Técnicas como a análise de isótopos estáveis por espectrometria de massa, mais especificamente os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), permitem investigar dados de longo prazo sobre a ecologia trófica e o padrão de uso do habitat de animais cujo papel ecológico ainda é pouco conhecido na região. Esta Dissertação teve como base a produção de conhecimento sobre a ecologia trófica e o uso do habitat de cetáceos odontocetos do Oceano Atlântico Sul-Occidental por meio da análise de isótopos estáveis.

Nesse contexto, a presente Dissertação foi estruturada em 2 capítulos e um anexo, apresentado no formato de artigo. O Capítulo 1, redigido em língua portuguesa, apresenta uma introdução geral, hipóteses e objetivos, material e métodos, síntese dos resultados e principais conclusões. O Capítulo 2 corresponde ao artigo principal da dissertação e também está redigido em língua portuguesa. O Anexo I está composto pelo segundo manuscrito, redigido em língua inglesa, que se encontra em revisão no periódico "Rapid Communications in Mass Spectrometry".

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os cetáceos odontocetos ocorrem em diferentes zonas oceanográficas e ocupam um amplo espectro trófico (Ballance, 2009; Hooker, 2009). Estão representados por espécies que consomem desde o segundo nível da teia alimentar até predadores de topo (Barros & Clarke, 2009). Suas dietas incluem vários tipos de presas, incluindo peixes e invertebrados pelágicos, demersais ou bentônicos, aves e até outros mamíferos marinhos (Estes, 2007).

1.1. Odontocetos do Atlântico Sul-Occidental

O Oceano Atlântico Sul-Occidental apresenta uma grande riqueza de cetáceos odontocetos, dos quais a maior parte das espécies ocorre em regiões oceanográficas distantes da costa, como a plataforma média e externa, talude e regiões oceânicas mais profundas (Bastida et al., 2007; Lodi & Borobia, 2013). Por esta razão, estudos que abordem a ecologia trófica e o uso do habitat destas espécies costumam ser dispendiosos e de difícil execução, resultando em informações pouco representativas para o Atlântico Sul-Occidental. Todavia, o conhecimento sobre tais aspectos destes animais é imprescindível para a compreensão de seus papéis e nichos ecológicos na estrutura dos ecossistemas marinhos (Barlow, Kahru, & Mitchell, 2008).

A família Delphinidae, composta por 36 espécies, é a mais bem sucedida e diversificada entre todas as famílias de cetáceos (Cetartiodactyla), ocupando uma grande variedade de ecossistemas (LeDuc, 2009). As espécies desta família podem tanto apresentar uma ampla distribuição geográfica (e.g., orca), quanto uma distribuição restrita, e.g., golfinho-pintado-do-atlântico, que ocorre apenas em regiões tropicais e subtropicais do Oceano Atlântico (Lodi &

Borobia, 2013). Entre os delfinídeos de grande tamanho, as orcas (*Orcinus orca*) são os cetáceos mais amplamente distribuídos, habitando todos os oceanos. No entanto, são mais frequentes em águas costeiras temperadas e frias de alta produção marinha (Bastida et al., 2007). As orcas predam grandes quantidades de peixes, lulas e mamíferos marinhos, bem como aves e tartarugas marinhas, no entanto, seus hábitos tróficos e estratégias de predação costumam variar de acordo com as disponibilidades locais de alimento (Bastida et al., 2007). Alguns grupos de orcas evoluíram adaptando-se a nichos ecológicos específicos, formando diferentes ecótipos (Ford, 2009). Similarmente, as falsas-orca (*Pseudorca crassidens*) habitam todos os oceanos, embora ocorram principalmente em águas tropicais, subtropicais e temperadas, geralmente entre os 50°N e 50°S. Elas são comumente avistada em águas profundas, acima dos 1.000m de profundidade, e sua dieta baseia-se principalmente em peixes e lulas, embora existam registros de predação sobre pequenos cetáceos (Bastida et al., 2007). No Atlântico Sul-Occidental, há indícios de ocorrência de pelo menos dois ecótipos para *P. crassidens* (Botta et al., 2012). A baleia-piloto-de-peitorais-longas (*Globicephala melas*) se distribui por todo o hemisfério sul, desde a linha dos gelos flutuantes da Antártica, até aproximadamente os 20°-25°S, ocorrendo tanto em águas profundas como na plataforma continental, alimentando-se principalmente de lulas, embora complemente sua dieta com peixes (Bastida et al., 2007). O golfinho-de-Risso (*Grampus griseus*) é encontrado em águas oceânicas temperadas e tropicais do mundo todo, com uma aparente preferência por habitats íngremes de borda de plataforma, entre cerca de 400 e 1000m de profundidade (Baird, 2009). Esta

espécie é considerada uma consumidora quase exclusiva de lulas neríticas e oceânicas (Baird, 2009).

Entre os pequenos delfínídeos, o golfinho-de-dentes-rugosos (*Steno bredanensis*) distribui-se em águas tropicais e temperadas de todo o mundo, predominando em águas oceânicas profundas. Porém, no Brasil, também são avistados em águas menos profundas, entre 2 e 43m (Bastida et al., 2007). Sua dieta baseia-se em peixes e lulas, podendo preda peixes de diversos tamanhos, inclusive grandes, como o dourado (*Coriphaena hippurus*) (Bastida et al., 2007). O golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*) ocorre apenas em águas tropicais, subtropicais e temperadas do Oceano Atlântico, sendo frequentemente observado sobre a plataforma continental das regiões Sul e Sudeste, especialmente em torno da isóbata de 1000m (Lodi & Borobia, 2013). *Stenella frontalis* consome diversas espécies de peixes e cefalópodes (Bastida et al., 2007). O golfinho-listrado (*Stenella coeruleoalba*) ocorre em zonas tropicais, subtropicais e temperadas quentes de todos os oceanos. Poucas inferências podem ser feitas sobre sua distribuição no Atlântico Sul-Occidental devido ao baixo número de registros (Lodi & Borobia, 2013). O golfinho-comum-de-bico-curto (*Delphinus delphis*) é amplamente distribuído em quase todos os oceanos (Tavares et al., 2010). No Atlântico Sul-Occidental, eles consomem principalmente pequenos peixes pelágicos e lulas (Bastida et al., 2007). O golfinho-de-Fraser (*Lagenodelphis hosei*) possui distribuição pantropical, em torno de 30°N e 30°S, sendo frequente em áreas oceânicas tropicais do Atlântico, Pacífico e Índico, geralmente em águas com mais de 1.000m de profundidade (Bastida et al., 2007). Sua dieta compreende

principalmente lulas, crustáceos planctônicos e peixes de profundidade (Moreno et al., 2003).

A família Physeteridae é composta por uma única espécie, o cachalote (*Physeter macrocephalus*), a maior espécie de odontoceto. É largamente distribuído nos oceanos, dos trópicos às regiões polares, entre 60°N a 70°S, sendo frequentemente observado entre águas de 1.000 a 3.000m de profundidade (Lodi & Borobia, 2013). Os cachalotes mergulham a grandes profundidades para capturar sua principal presa, as grandes lulas oceânicas (Bastida et al., 2007). No Brasil, ainda pouco se conhece sobre sua biologia, ecologia e comportamento (Lodi & Borobia, 2013).

A família Kogiidae é formada por duas espécies congêneres. O cachalote-pigmeu (*Kogia breviceps*) é encontrado em regiões tropicais e temperadas de todos os oceanos, mas parece preferir águas mais temperadas e ocorre em águas após a plataforma continental (Lodi & Borobia, 2013). Sua dieta é composta principalmente por lulas de pequeno e médio tamanho, mas também por peixes e crustáceos de profundidade (Bastida et al., 2007). O cachalote-anão (*Kogia sima*) é encontrado em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes em ambos hemisférios, mas os registros sugerem maior preferência por águas quentes quando comparados ao cachalote-pigmeu (Lodi & Borobia, 2013). Geralmente ocorre próximo a borda da plataforma continental. Consome principalmente lulas, peixes e crustáceos de profundidade (Bastida et al., 2007). No Brasil, pouco se sabe sobre a biologia, ecologia e comportamento das espécies do gênero *Kogia* (Lodi & Borobia, 2013).

A família Ziphiidae, constituída por 21 espécies e cinco gêneros de baleias-bicuda, embora seja a segunda mais diversa, é a menos conhecida dentre os cetáceos (Mead, 2009). Isto deve-se aos seus hábitos tipicamente oceânicos, por permanecerem pouco tempo na superfície (pois realizam mergulhos profundos e de longa duração), e por evitarem embarcações (Lodi & Borobia, 2013; Mead, 2009). Consequentemente, existe pouca informação acerca da ecologia e comportamento das espécies desta família (Lodi & Borobia, 2013). Praticamente todo o conhecimento disponível sobre esses animais provém de seus raros encalhes, frequentemente encontrados em avançado estado de decomposição (Madsen et al., 2014). A baleia-bicuda-de-cuvier (*Ziphius cavirostris*) é a mais amplamente distribuída entre todas as baleias-bicudas, indo desde os trópicos até regiões polares de ambos hemisférios (Lodi & Borobia, 2013). Em análises de conteúdo estomacal, foram encontrados lulas e peixes de grande profundidade (Bastida et al., 2007). A baleia-bicuda-de-Arnoux (*Berardius arnuxii*) é uma das espécies de cetáceos menos conhecidas. É restrita ao hemisfério sul e possui uma distribuição circumpolar, em águas temperadas frias e subpolares. *Berardius arnuxii* ocorre principalmente sobre o talude, e a maioria dos registros é reportado ao sul dos 40°S, porém o limite norte de sua distribuição ainda é desconhecido (Lodi & Borobia, 2013). Sua dieta é pouco conhecida e, nos raros estudos, restos de lulas foram encontrados em seu estômago (Bastida et al., 2007). A baleia-bicuda-de-Blainville (*Mesoplodon densirostris*) distribui-se em áreas tropicais e temperadas quentes de todos os oceanos, sendo mais tropical e mais amplamente distribuída do que as demais espécies do gênero (Lodi & Borobia, 2013). Esta espécie alimenta-se basicamente de lulas e pequenos peixes

(Bastida et al., 2007). A baleia-bicuda-de-Gray (*Mesoplodon grayi*) possui distribuição circumpolar, em águas temperadas frias do hemisfério sul, principalmente entre 30°S e 55°S (Lodi & Borobia, 2013). Provavelmente a espécie se alimenta de lulas de águas profundas (Bastida et al., 2007). A baleia-bicuda-de-Layard (*Mesoplodon layardii*) distribui-se em águas temperadas frias e subantárticas do hemisfério sul, principalmente entre 25°S e 60°S (Lodi & Borobia, 2013). A sua dieta ainda é pouco conhecida, especialmente a dos machos adultos, pois estes possuem um par de dentes que erupciona do centro da mandíbula, de tal forma que cada dente cresce por cima da maxila, contornando-a (Bastida et al., 2007). Tal característica limita a abertura a boca em apenas poucos centímetros, provavelmente levando à predação de pequenas lulas, com menos de 100g (Bastida et al., 2007). Por último, a baleia-bicuda-de-Hector (*Mesoplodon hectori*) distribui-se em águas temperadas frias do hemisfério sul (Lodi & Borobia, 2013).

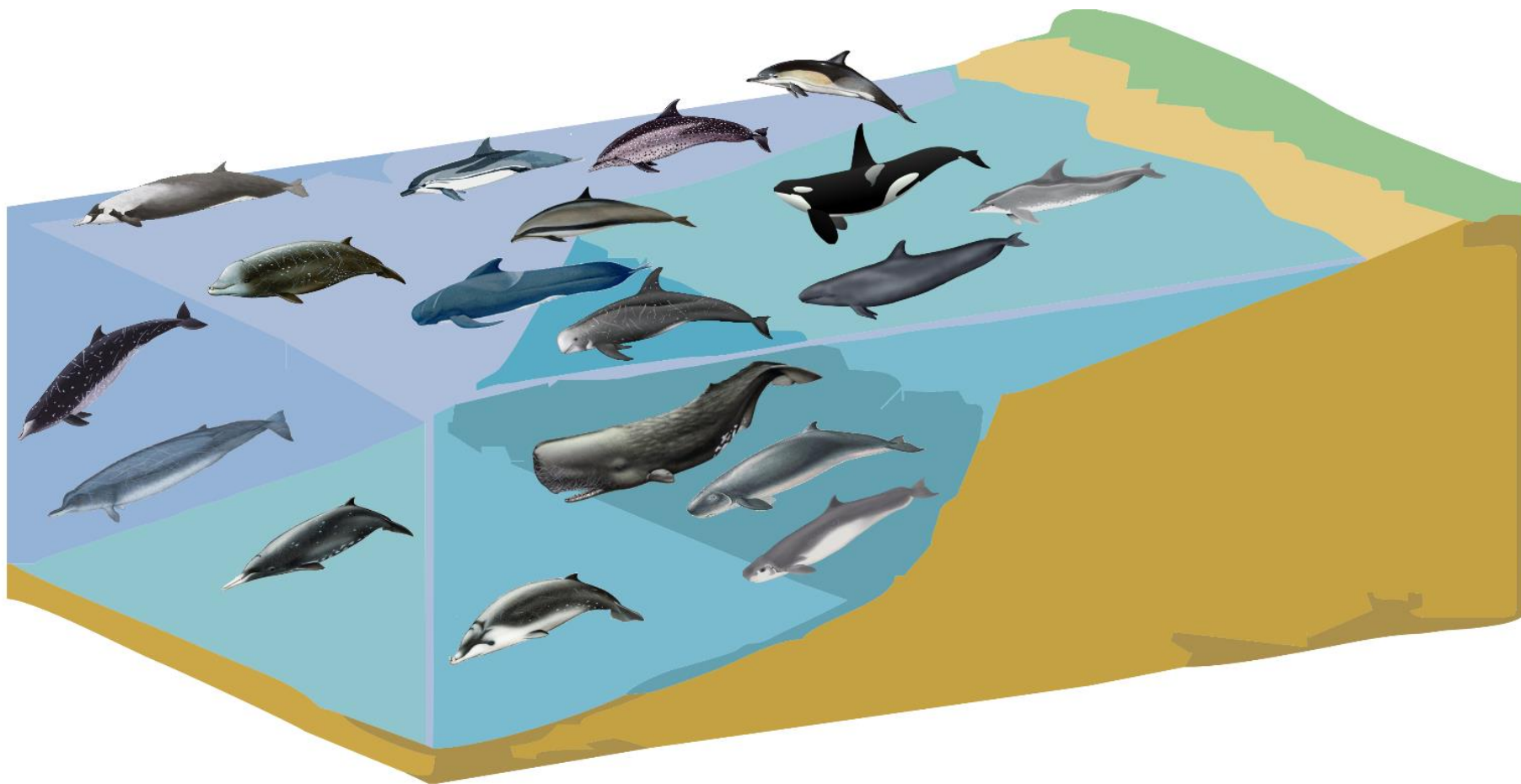


Figura 1. Diagrama representando o provável hábitat ocupado pelas espécies de odontocetos analisadas para o Atlântico Sul-Occidental, conforme sugerido pela literatura.

No Atlântico Sul-Occidental, várias destas espécies de odontocetos da plataforma e talude continental podem apresentar sobreposição de nicho trófico. Os pequenos golfinhos de hábitos pelágicos como, por exemplo, o golfinho-comum (*Delphinus delphis*) e o golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*) possivelmente compartilham os mesmos recursos, próximos à base da teia trófica, enquanto outros predam sobre presas de níveis tróficos mais elevados como a falsa-orca (*Pseudorca crassidens*) e a orca (*Orcinus orca*) (Botta et al., 2012). A baleia-piloto-de-peitorais-longas (*Globicephala melas*), o cachalote (*Physeter macrocephalus*), as duas espécies do gênero *Kogia*, e as baleias-bicuda da família Ziphiidae são predominantemente teutófagas, embora algumas delas predem sobre peixes e crustáceos demersais (Barros & Clarke, 2009). Dados de dieta (Pinedo & Rosas, 1989; Dalla Rosa et al., 2002; Tavares et al., 2010) e avistagens (Zerbini et al., 2004) sugerem que algumas destas espécies (e.g., falsa-orca, orca, golfinho-de-Fraser) ingressam na plataforma interna ocasionalmente, indicando que estes predadores exploram, oportunisticamente, uma extensa área de acordo com a variabilidade espaço-temporal na disponibilidade dos recursos.

1.2. Métodos de Estudo em Ecologia Trófica: diretos versus indiretos

Em relação aos métodos tradicionais de pesquisa sobre dieta, as análises de conteúdos estomacal e/ou fecal têm como principal limitação o fato de revelarem apenas os itens consumidos nas últimas refeições, que não são, necessariamente, os mesmos consumidos ao longo da vida do animal. Além disso, este método apresenta um risco inerente de superestimação e subestimação (e.g., cefalópodes e invertebrados, respectivamente) da

importância das presas encontradas, pois as estruturas que as identificam possuem tempos de digestão diferenciados (Santos et al., 2001). Outra desvantagem deve-se ao fato de que os itens encontrados em animais encalhados podem representar a dieta de animais debilitados, e não da população saudável. Por último, existe o risco de ingestão secundária, i.e., considerar como presa um item que tenha sido consumido pelas presas do predador analisado (Dehn et al., 2006; Hobson et al., 1994). A maior parte destas limitações pode ser evitada através de um número amostral significativo e que represente uma apropriada série temporal e espacial (Dunshea et al., 2013), o que é altamente improvável para espécies que forrageiam em habitats remotos.

Por sua vez, a aplicação de análises isotópicas de carbono e nitrogênio para responder questões fundamentais sobre a ecologia trófica e espacial de populações e comunidades teve uma expansão importante devido às suas diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais (Bisi et al., 2012). Análises isotópicas têm sido amplamente utilizadas em estudos sobre ecologia trófica e uso do habitat em mamíferos marinhos (Newsome et al., 2010). Este método indireto baseia-se na premissa de que as composições isotópicas dos consumidores refletem aquelas encontradas em suas presas de forma relativamente previsível (DeNiro & Epstein, 1978, 1981). As razões entre os isótopos estáveis pesado e leve de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$), em relação às razões encontradas em padrões isotópicos internacionais, e tipicamente expressos com a notação delta ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$), são as mais amplamente utilizadas (Newsome et al., 2010). O fator de discriminação trófica para o N varia tipicamente de +2 a +5‰ entre níveis tróficos (DeNiro & Epstein,

1981; Post, 2002). Assim, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ é considerado um indicador do nível trófico do predador analisado, permitindo uma comparação da posição trófica entre consumidores dentro de um determinado ecossistema (Post, 2002). Por outro lado, o fator de discriminação trófica do C varia tipicamente de 0,5 a 1‰ entre a dieta e os tecidos de um consumidor (DeNiro & Epstein, 1978). Desta forma, o $\delta^{13}\text{C}$ encontrado em um predador evidencia a composição dos produtores primários de seu habitat de forrageio.

Uma das principais vantagens do método refere-se às diferentes possibilidades de tempo de integração da informação isotópica. Assim, tecidos diferentes integram intervalos de tempo diferentes, que variam principalmente em função das diferentes taxas de renovação ou “*turnover*” dos tecidos do consumidor. Por exemplo, tecidos de rápida renovação, como pele, sangue e músculo, integram valores isotópicos obtidos pela dieta das últimas semanas ou meses. Em contraste, os tecidos considerados metabolicamente inertes (e.g., dentes) ou de crescimento contínuo (e.g., ossos), integram informações isotópicas de longo prazo ou mesmo da vida toda do animal, como é o caso dos dentes (Walker & Macko, 1999). Outra vantagem importante é que os valores isotópicos refletem somente a dieta que foi, de fato, assimilada pelo predador, evitando, assim, os vieses da superestimação/subestimação e ingestão secundária das presas (Bisi et al., 2012). Além disso, a análise das composições isotópicas dos dentes não é afetada pelo grau de decomposição do animal, fornecendo um método viável, tanto metodológica quanto economicamente, de se analisar um grande número de espécies/amostras em um período relativamente curto. Outra vantagem do método é a possibilidade de acesso às informações sobre dieta e uso do habitat de exemplares antigos,

através de amostras históricas ou mesmo paleontológicas, depositadas em museus ou coleções científicas (e.g., Walker & Macko, 1999; Newsome et al., 2010; Foote et al., 2013).

1.3. Gradientes Isotópicos no Ambiente Marinho

Diversos fatores geológicos, ambientais e biológicos atuando sobre processos biogeoquímicos, influenciam a distribuição espaço-temporal dos isótopos nos ambientes, gerando assim paisagens isotópicas ou “*isoscapes*” (Graham et al., 2010). No ambiente marinho, existe um gradiente costa-oceano, no qual os valores de $\delta^{13}\text{C}$ diminuem com a distância da costa basicamente em função da composição de produtores (France, 1995). Devido à variabilidade de produtores primários nos diversos habitats nos quais ocorrem, valores distintos de $\delta^{13}\text{C}$ são encontrados nas espécies que forrageiam em ambientes oceanográficos diferentes, possuindo valores tipicamente mais elevados em ambientes costeiros (cuja contribuição de produtores bentônicos é elevada) e diminuindo em direção às águas oceânicas (onde o fitoplâncton domina a produção primária) (Clementz & Koch, 2001).

Por sua vez, existe também um gradiente latitudinal nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ na base das redes tróficas, com os valores mais elevados em regiões tropicais e diminuindo em direção às altas latitudes (Rau et al., 1982). Em contraste, para o $\delta^{15}\text{N}$, os menores valores são encontrados em águas oligotróficas, onde a fixação de N_2 é a fonte de N mais importante para o fitoplâncton, enquanto que os valores mais elevados são encontrados em altas latitudes, onde o NO_3 é a principal fonte (Sigman & Casciotti, 2001). Estes gradientes isotópicos naturais (i.e., costa-oceano e latitudinais) encontrados nas bases das redes

tróficas e refletidos nos valores isotópicos dos tecidos de predadores (Graham et al., 2010), favorecem a distinção quanto aos habitats de forrageio utilizados pelas diferentes espécies de cetáceos.

1.4. Nicho Ecológico versus Nicho Isotópico

O nicho ecológico de uma determinada espécie pode ser definido como um espaço gráfico hipervolumétrico e n-dimensional, que inclui a amplitude de condições (e.g. temperatura, profundidade, distância da costa) e recursos (e.g. tipo ou tamanho de presa consumida) necessárias à sua sobrevivência, também chamados de limites de tolerância (Hutchinson, 1957). Entretanto, as dimensões do nicho ecológico são dinâmicas, podendo ser ampliadas ou reduzidas em função das interações com outras espécies. Segundo o princípio da exclusão competitiva, as espécies precisam diferir em alguma dimensão do nicho ecológico para que possam coexistir por longos períodos, de forma que possam minimizar a competição entre elas (Hardin, 1960). Assim, mesmo quando ocorrer sobreposição em alguma dimensão do nicho (e.g., distância da costa), se não houver sobreposição em outra dimensão (e.g., espécies predadas), logo, não haverá sobreposição de nicho.

O nicho isotópico, por sua vez, é definido por uma área (δ -espaço), bidimensional, cujos eixos são representados pelos valores isotópicos (Newsome et al., 2007). Estes eixos isotópicos fornecem informações sobre os habitats de forrageio ($\delta^{13}\text{C}$) e recursos consumidos ($\delta^{15}\text{N}$), podendo ser utilizados para estimar a sobreposição e/ou segregação espacial e trófica, inter e intraespecíficas (Newsome et al., 2007). No entanto, cabe ressaltar que o nicho isotópico corresponde a uma versão simplificada do conceito multidimensional de nicho ecológico, uma vez que o nicho isotópico representa

apenas duas dimensões do nicho ecológico de uma determinada espécie (Newsome et al, 2007). Além disso, a variação encontrada na amplitude dos nichos isotópicos permite a classificação das espécies em generalistas (elipses maiores) ou especialistas (elipses menores) (Jackson et al. 2011).

Mesmo dentro das dimensões fornecidas pelo nicho isotópico, algumas limitações inerentes ao método, tais como a não identificação dos itens predados, o consumo de presas distintas, mas que possuem valores isotópicos similares, bem como habitats ecologicamente similares, mas que apresentam diferentes valores isotópicos, devem ser levadas em consideração ao se fazer comparações entre os nichos isotópicos de diferentes espécies. Entretanto, estas limitações podem ser minimizadas ao se considerar o conhecimento ecológico prévio de cada espécie, i.e., utilizar os dados de nicho isotópico em conjunto com outras fontes de informação sobre os padrões de distribuição, habitats preferenciais e dados de conteúdo estomacal.

1.5. Limitações Metodológicas das Análises Isotópicas

Embora amplamente utilizada em estudos de ecologia de mamíferos marinhos, a análise de isótopos estáveis ainda apresenta algumas limitações metodológicas, com consequências imprevisíveis em seus resultados, dependendo do protocolo utilizado na preparação das amostras isotópicas (Newsome et al., 2010). Por exemplo, fatores como a presença de lipídeos e de carbonatos nos tecidos podem influenciar os valores isotópicos, persistindo ainda algumas dificuldades metodológicas na condução das análises. Deste modo, é de fundamental importância que tais vieses nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ sejam reduzidos sem causar alterações nos seus sinais isotópicos.

A presença de níveis elevados de lipídio nas amostras pode enviesar os resultados das análises, uma vez que os lipídios são empobrecidos em ^{13}C , podendo, assim, subestimar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras, além do conteúdo lipídico poder ser variável entre os tecidos analisados (DeNiro & Epstein, 1977; DeNiro & Epstein, 1978; Peterson & Fry, 1987). Tipicamente, a dentina é o tecido mais utilizado em análises isotópicas de odontocetos provenientes de encalhes, pois apresenta um processo de decomposição extremamente lento e conserva as informações isotópicas de toda a vida do animal, além de ser praticamente livre de lipídios em sua composição. Porém, no caso dos zifídeos, os quais são caracterizados por um número de dentes reduzido (Mead, 2009) e, muitas vezes, indisponíveis para as análises, o que impede o uso deste tecido para esta família de odontocetos. Neste caso, os ossos representam uma alternativa viável para a realização de análises isotópicas, desde que seu fator de discriminação isotópica seja considerado (Koch, 2007). Contudo, os cetáceos apresentam um grande depósito de gordura no tecido ósseo, com até 50% do peso úmido do esqueleto de um cetáceo podendo ser atribuído ao conteúdo lipídico (Rommel et al., 2006). Assim, considerar este efeito dos lipídios em análises isotópicas é especialmente importante em estudos que utilizam os valores de $\delta^{13}\text{C}$ como marcadores do habitat de forrageio das espécies. Negligenciar esses possíveis efeitos poderia levar à conclusões equivocadas acerca do uso do habitat do consumidor analisado (Kiljunen et al., 2006; Post et al., 2007; Lesage et al., 2010).

Existem dois tipos de tratamentos utilizados para se controlar a interferência dos valores de lipídios em amostras de $\delta^{13}\text{C}$: os químicos e os

matemáticos. Nos métodos químicos, é realizada a remoção química dos lipídios presentes nos tecidos, geralmente através de um solvente orgânico polar (e.g., clorofórmio:metanol) (Bligh & Dyer, 1959). As principais vantagens destes métodos são a eficácia na remoção dos lipídios e sua adequação para qualquer tipo de tecido, independentemente da quantidade de lipídio e, conseqüentemente, da razão C:N apresentada. Contudo, alguns estudos reportaram que eles podem afetar de forma imprevisível os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (e.g. Mintenbeck et al., 2008; Ryan et al., 2012), podendo criar um viés adicional e prejudicar a validade e a precisão destes dados. Embora este inconveniente possa ser solucionado ao se processar separadamente as amostras para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, esta alternativa aumenta os custos operacionais e o tempo de preparação das amostras. Por outro lado, nos métodos matemáticos, são empregadas equações de normalização para corrigir, *a posteriori*, os valores de lipídios presentes no $\delta^{13}\text{C}$, sem afetar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ ou aumentar os custos operacionais. No entanto, é crucial uma correta escolha da equação, pois se esta não for adequada para o conjunto de dados, corre-se o risco de subestimar ou superestimar o teor de lipídios (e.g., Mintenbeck et al., 2008).

Outro tratamento comumente empregado em amostras isotópicas é a acidificação das amostras, cujo objetivo é a remoção dos carbonatos (CaCO_3) do tecido (Jacob et al., 2005; Pomerleau et al., 2014; Walker & Macko, 1999). Este procedimento é convencionalmente realizado porque as diferentes origens do carbono orgânico e do carbonato incorporados nos tecidos de um organismo também podem ser fontes de viés metodológico na interpretação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Fry, 1988; Pomerleau et al., 2014). Embora amplamente

utilizado, tal procedimento pode eventualmente afetar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Jacob et al., 2005), uma vez que este isótopo é geralmente analisado simultaneamente com o $\delta^{13}\text{C}$. Além disso, existe a possibilidade de que o uso combinado deste tratamento com a extração química de lipídeos possa interagir, podendo criar novos vieses nas análises (Mintenbeck et al., 2008) e prejudicar a interpretação dos valores de $\delta^{13}\text{C}$. Contudo, poucos estudos buscaram testar esta interação em amostras para análises isotópicas até o momento. Uma padronização no protocolo de preparação dos tecidos para análises isotópicas em cetáceos permitirá uma comparação mais precisa entre os resultados de diferentes estudos (Newsome et al., 2010).

1.6. Hipóteses e Objetivos

Alguns trabalhos abordaram o uso do habitat e as relações tróficas interespecíficas entre odontocetos, principalmente da família Delphinidae, através do método de isótopos estáveis (e.g., Pinela et al., 2010; Riccialdelli et al., 2010). No Atlântico Sul-Occidental, um estudo utilizando sete espécies de delfínídeos, revelou possíveis padrões tróficos entre as espécies das plataformas média e externa (Botta et al., 2012). Nesse estudo, a existência de, ao menos, dois ecótipos de falsa-orca (um costeiro e um oceânico) foi sugerida e, posteriormente, confirmada com base em uma amostra mais robusta (Paro, 2013).

Através deste trabalho, pretendeu-se caracterizar alguns aspectos da ecologia trófica e do uso do habitat de 18 espécies de odontocetos, pertencentes a quatro diferentes Famílias (Delphinidae, Physeteridae, Kogiidae e Ziphiidae), as quais ocorrem em diferentes ambientes oceanográficos do

Atlântico Sul-Occidental. No caso das últimas três famílias, a ocorrência em ambientes pelágicos de águas profundas e inacessíveis limita a possibilidade de estudos sobre qualquer aspecto da biologia e ecologia das mesmas. Assim, a aplicação da análise de isótopos estáveis no estudo sobre a ecologia trófica e o habitat de forrageio destes predadores ofereceu uma alternativa confiável e acessível, resultando em importantes informações destes aspectos ecológicos, até o momento pobremente conhecidos para a maioria dos odontocetos do Atlântico Sul-Occidental.

1.6.1. Hipóteses

- **Hipótese 1:** Independente do seu padrão de distribuição, os grandes predadores (*O. orca* e *P. crassidens*) ocupam os níveis tróficos mais elevados e apresentam pequena amplitude em seus nichos isotópicos nas redes tróficas dos ecossistemas nos quais habitam.
- **Hipótese 2:** Os pequenos golfinhos de hábitos pelágicos (e.g., *D. delphis* e *Stenella frontalis*) compartilham os mesmos recursos e apresentam sobreposição em seus nichos isotópicos.
- **Hipótese 3:** Dentre as espécies tipicamente teutófagas (e.g., *G. melas*, *P. macrocephalus*, *K. breviceps* e espécies da família Ziphiidae), as diferenças em seus nichos isotópicos variam de acordo com seus padrões de distribuição e suas restrições fisiológicas e comportamentais.
- **Hipótese 4:** Tanto os tratamentos de extração de lipídios, quanto de acidificação, terão efeito significativo para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ em tecido ósseo de zifídeos.

- **Hipótese 5:** Os tratamentos químicos para correção dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ em tecido ósseo de zifídeos devem ter efeitos independentes, não havendo interação entre a extração lipídica e a acidificação.
- **Hipótese 6:** Os modelos matemáticos não-lineares de correção lipídica para os valores $\delta^{13}\text{C}$ em tecido ósseo de zifídeos devem ter um melhor ajuste aos dados empíricos, se comparados aos modelos lineares.

1.6.2. Objetivos

Objetivo Geral

Estudar a ecologia trófica e o padrão de uso do habitat de 18 espécies de cetáceos odontocetos do Atlântico Sul-Occidental.

Objetivos Específicos

- Identificar e comparar os padrões de uso do habitat de 18 espécies de cetáceos odontocetos;
- Investigar e comparar o nível trófico relativo destas espécies;
- Calcular e comparar a amplitude do nicho isotópico ocupado por estas espécies;
- Verificar a ocorrência de sobreposição de nicho isotópico entre as espécies;
- Verificar a existência de possíveis variações isotópicas intraespecíficas na ecologia trófica e/ou uso do habitat destas espécies.

- Verificar os efeitos da extração de lipídios, acidificação, e interação entre estes tratamentos em amostras de tecido ósseo para análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$;
- Avaliar a eficiência de modelos de normalização desenvolvidos para estimar valores de $\delta^{13}\text{C}$ lipídeo-normalizados a partir de valores de $\delta^{13}\text{C}$ não-tratados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

A região subtropical do Atlântico Sul Ocidental apresenta uma alta produtividade fitoplanctônica, sustentada tanto pelo aporte de água doce, proveniente da drenagem continental, quanto por processos de ressurgência na região de quebra de plataforma (Ciotti et al., 1995). A circulação na área de estudo é formada por duas correntes que apresentam características opostas. A Corrente do Brasil, de fluxo no sentido norte-sul, é caracterizada por águas quentes e oligotróficas. Por sua vez, a Corrente das Malvinas, de fluxo no sentido sul-norte, é caracterizada por águas mais frias e ricas em nutrientes (Legeckis & Gordon, 1982). O encontro dessas correntes é chamado de Convergência Subtropical do Atlântico Sul-Occidental (ou confluência Brasil-Malvinas). As águas da plataforma continental e talude no sul do Brasil e Uruguai são influenciadas pela Convergência Subtropical, a qual representa uma zona de transição oceanográfica entre as águas temperadas da Patagônia e águas tropicais brasileiras. Na zona nerítica, a circulação de águas frias e quentes e os processos de ressurgência (Castello & Möller, 1977; Muelbert et al., 2008) influenciam a produtividade, que pode ser considerada de moderada

a alta (Odebretch & Garcia, 1997). Além disso, esta região também recebe um aporte de águas fluviais do Estuário da Lagoa dos Patos e Rio da Prata, que juntamente com a Convergência Subtropical, torna esta região uma das mais produtivas do Brasil (Castello, 1998).

2.2. Amostragem

As amostras utilizadas foram obtidas de exemplares de cetáceos encontrados encalhados durante monitoramentos sistemáticos de praia realizados entre 1977 e 2014 em um trecho de aproximadamente 375Km no sul do Brasil (31°20'S, 51°05'W a 33°45'S, 53°22'W). Amostras de ossos de 6 espécies de zifídeos ($n = 13$) foram utilizadas no estudo referente ao manuscrito do Anexo I, enquanto que 122 amostras de tecidos duros (i.e., dentes e ossos) de 18 espécies, de quatro famílias de odontocetos, foram utilizadas no manuscrito do Anexo II. Sempre que possível, os animais foram medidos (comprimento total – CT) e sexados. Os exemplares considerados filhotes com base no CT foram excluídos das análises por possuírem valores mais enriquecidos em ^{15}N em relação aos juvenis e adultos (e.g., Mendes et al., 2007; Newsome et al., 2009; Newsome et al., 2010; Jansen et al., 2012). Foi escolhido um dente de cada exemplar, dando preferência a dentes da porção mediana da mandíbula ou maxila. No caso dos exemplares com baixa disponibilidade ou ausência de dentes na coleção, utilizou-se um fragmento de osso retirado da porção superior interna do crânio ou da mandíbula. Devido à semelhança nos valores isotópicos de dentes e ossos (diferenças de 0,2‰ e 0,3‰, para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, Foote et al., 2013), estes tecidos foram analisados conjuntamente.

2.3. Análises de Isótopos Estáveis

Os dentes foram secos em estufa a 60°C por 72h, lavados com água destilada e cortados longitudinalmente por meio de uma serra com lâmina diamantada para expor a dentina. Esta foi pulverizada com uma broca de ponteira metálica, conectada a uma micro-retífica (*Dremel® Rotary Tool*), de maneira que todas as camadas de crescimento fossem amostradas de forma homogênea, obtendo-se uma amostra capaz de representar a vida inteira do animal. As amostras de ossos foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 60°C por 24h. As amostras pulverizadas foram colocadas em recipientes do tipo *Eppendorf®*, acidificadas, por meio de defumação em dessecador com HCl a 30% durante 24h, e secas em estufa, por 2h, para a remoção da fração inorgânica do carbono, a qual pode alterar os valores do $\delta^{13}\text{C}$ orgânico (Knoff, Hohn, & Macko, 2008). As amostras com elevado conteúdo lipídico, verificadas pela elevada razão C:N (>3,5), tiveram o conteúdo lipídico extraído através de um extrator *Soxhlet*, sendo submetidas a ciclos de lavagem em solvente clorofórmio:metanol (2:1) durante 24h, seguidos de secagem em estufa por mais 24h e pulverização com graal e pistilo. Aproximadamente 1 mg de cada amostra foi pesada em cápsulas de estanho (*Costech*) e enviadas ao *Stable Isotope Core Laboratory, Washington State University* para a realização das análises (Figura 1). Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram obtidos através da análise em espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo, acoplado a um analisador de elementos. As razões isotópicas obtidas foram expressas pela notação δ em partes por mil (‰), e calculadas de acordo com a equação:

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

onde δ é a razão isotópica de ^{13}C ou de ^{15}N em cada indivíduo, R_{amostra} é a razão isótopo pesado/leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) encontrada na amostra e $R_{\text{padrão}}$ é a razão isótopo pesado/leve encontrada em padrões de internacionais de referência. Padrões internos de composições de carbono e nitrogênio conhecidos (acetanilida e queratina) foram analisadas entre as amostras para estimar a precisão do instrumento.



Figura 2. Sequência de procedimentos de preparação das amostras para as análises isotópicas. 1-2) Coleta do tecido (dente) dos espécimes encalhados; 3) Corte longitudinal dos dentes em serra metalográfica; 4) Vista do corte longitudinal do dente; 5) Retirada da amostra (pó) do dente por meio de uma ferramenta abrasiva rotativa; 6) Procedimento de extração de lipídios; 7) Acidificação da amostra em um dessecador com ácido clorídrico a 30%; 8) Cápsulas de estanho; 9) Pesagem das amostras.

2.4. Modelos de Normalização Lipídica

No manuscrito relativo ao Anexo I, quatro modelos de normalização lipídica para os valores de $\delta^{13}\text{C}$, baseados nos valores $\delta^{13}\text{C}$ e C:N obtidos de amostras controle (cujos lipídeos não tinham sido extraídos), foram utilizados. Os valores gerados pelos modelos, sendo dois lineares e três não lineares foram, então, comparados com os valores obtidos de amostras lipídio-extraídas quimicamente.

2.5. Análises Estatísticas

Após a verificação dos pressupostos, testes de comparações de médias foram utilizados para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em ambos os manuscritos em anexo. No anexo I, valores isotópicos de amostras controle foram comparados com amostras lipídio-extraídas, amostras acidificadas e amostras extraídas e acidificadas através de Análises de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida de testes *post hoc* de Tukey (Tukey's HDS test) para amostras de ossos de Zifídeos. Para testar a interação entre os tratamentos, i.e., acidificação e extração lipídica foi utilizada uma ANOVA bifatorial (ANOVA de duas vias) de medidas repetidas. Além disso, foram calculadas as eficiências de cinco modelos de correção matemática para o conteúdo lipídico. Assim, após rodar uma regressão linear simples entre os valores da razão C:N e de $\Delta\delta^{13}\text{C}$, bem como calcular os valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ indicados por cada modelo, sendo dois lineares e dois não-lineares, comparou-se a adequação de tais valores aos dados empíricos através de uma medida do coeficiente de determinação (R^2) e de eficiência do modelo (EF). O nível de significância adotado foi de 0,05.

Os dados utilizados no manuscrito relativo ao Anexo II atenderam aos pressupostos dos testes da ANOVA, ou foram corrigidos nos casos de variâncias desiguais, através do teste F de Welch. As médias dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio entre as espécies foram comparadas por meio de ANOVA, seguidas por comparações *post hoc* através do teste de Tukey. A existência de diferenças intraespecíficas entre os sexos foi verificada através de testes t de Student para aquelas espécies com tamanho amostral adequado. O nível de significância adotado foi 0,05. Uma análise de agrupamento, baseada nos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de cada espécie, foi utilizada para mensurar os agrupamentos isotópicos entre as espécies. Os nichos isotópicos foram estimados utilizando o método baseado na construção de elipses bivariadas através da ferramenta *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R – SIBER* (Jackson et al., 2011), incluída no pacote SIAR (Parnell & Jackson, 2010). O valor da área da elipse padrão (*Standard Ellipse Area*), ajustado para tamanhos amostrais pequenos (SEA_C), foi utilizado como uma medida de tamanho do nicho isotópico. Adicionalmente, a área de intersecção das elipses de diferentes espécies/ecótipos foi calculada e expressa em percentagem (%) como uma medida da sobreposição de nicho isotópico entre elas.

3. SÍNTESE DOS RESULTADOS

3.1. Ecologia trófica e habitat de forrageio: variações intraespecíficas (Capítulo 2)

Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das 18 espécies de odontocetos analisadas variaram de -20,6‰ a -9,7‰ e de 11,6‰ a 18,6‰, respectivamente (Tabela 1 do Capítulo 2).

Os exemplares de *O. orca* apresentaram variação isotópica intraespecífica, caracterizando três grupos isotópicos. O primeiro grupo (Oor1) apresentou valores mais altos tanto de $\delta^{13}\text{C}$ quanto de $\delta^{15}\text{N}$, seguido pelo segundo grupo (Oor2), com valores intermediários e, por fim, o terceiro grupo (Oor3) apresentou valores menores para ambos os isótopos. Resultados semelhantes foram identificados para *P. crassidens*, a qual também foi possível caracterizar três grupos isotópicos distintos. O primeiro grupo (Pcr1), apresentou os maiores valores para ambos os isótopos, seguido pelo segundo grupo (Pcr2), com valores intermediários e pelo terceiro (Pcr3), com os menores valores, tanto para $\delta^{13}\text{C}$ quanto para $\delta^{15}\text{N}$.

3.2. Ecologia trófica e habitat de forrageio: variações interespecíficas (Capítulo 2)

Foi verificado um gradiente isotópico no sentido costa-oceano para os valores de $\delta^{13}\text{C}$, com valores mais elevados para os delfinídeos costeiros (*O. orca* do grupo Oor1 e *P. crassidens* do grupo Pcr1) e os valores mais baixos em baleias-bicuda, como *Berardius arnuxii*, *Mesoplodon layardii* e *M. hectori*. Os valores isotópicos variaram significativamente entre as espécies, para $\delta^{13}\text{C}$ e para $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela 2 do Capítulo 2). Seis grupos foram identificados, entre as 18 espécies de odontocetos, a partir da análise de agrupamento. Estes grupos foram classificados como: 1) teutófagos oceânicos de águas frias/profundas; 2) predadores de níveis tróficos elevados, de plataforma; 3) teutófagos de

plataforma externa/talude; 4) predadores de níveis tróficos intermediários, de plataforma externa/talude superior e talude; 5) predadores de níveis tróficos intermediários, do talude e oceânicos; e 6) predadores oceânicos de níveis tróficos intermediários.

3.2.1. Nichos isotópicos

As amplitudes dos nichos isotópicos, assim como as áreas e os percentuais de sobreposições de nichos, foram calculadas para as espécies e grupos derivados de possíveis ecótipos. Dentre as 14 espécies analisadas (quatro tiveram que ser excluídas destas análises, devido aos seus tamanhos amostrais reduzidos), seis espécies apresentaram sobreposição de nicho isotópico com, pelo menos, outra espécie (ver Tabela 3, Capítulo 2). As espécies com maior sobreposição de nicho foram *K. breviceps* e *S. frontalis*. *Kogia breviceps* se sobrepôs com *P. macrocephalus*, *S. frontalis*, *G. melas* e *L. hosei*, ficando esta última inteiramente contida dentro da área de elipse de *K. breviceps*. Por sua vez, *S. frontalis* se sobrepôs com *D. delphis*, *P. macrocephalus*, *K. breviceps* e *L. hosei*. As espécies de zifídeos analisadas não apresentaram sobreposição de nicho isotópico, tampouco os pequenos delfinídeos *S. bredanensis* e *S. coeruleoalba*, e os grandes delfinídeos *O. orca* do grupo Oor1 e os três grupos de *P. crassidens*.

3.3. Efeitos da acidificação, extração química e normalização lipídica sobre os valores isotópicos de carbono e nitrogênio (Anexo I)

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de tecido ósseo de 6 espécies de baleia-bicuda foram significativamente afetados pelo tratamento das amostras. Após a extração lipídica, houve um aumento nos valores de $\delta^{13}\text{C}$. Similarmente,

valores maiores de $\delta^{13}\text{C}$ foram obtidos após ambos os tratamentos, extração lipídica e acidificação. Tanto a extração lipídica, quanto a combinação de ambos os tratamentos, diminuíram a média da razão C:N e a variação entre as amostras. Em contraste, a acidificação sozinha não apresentou efeito sobre os valores de $\delta^{13}\text{C}$. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ não foram significativamente alterados por nenhum tratamento. Houve uma interação entre os tratamentos químicos para controle dos vieses nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, porém, não houve interação significativa para os valores de $\delta^{15}\text{N}$. Dada a relação linear entre os valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ lipídio extraídos e a razão C:N, os modelos lineares de normalização apresentaram um melhor ajuste do que os modelos não lineares para prever os valores de $\delta^{13}\text{C}$ sem a influência dos lipídeos.

4. CONCLUSÕES PRINCIPAIS

A partir desta pesquisa pode-se concluir que:

- O conteúdo lipídico de amostra de ossos de baleias-bicuda deve ser controlado para uma correta análise dos valores de $\delta^{13}\text{C}$, seja por extração lipídica, *a priori*, seja por normalização através de modelos matemáticos, *a posteriori*.
- Modelos lineares para a normalização lipídica foram mais precisos do que modelos não-lineares para prever os valores de $\delta^{13}\text{C}$ em amostras de ossos de baleias-bicuda.
- O procedimento de acidificação de amostras de ossos para a mensuração dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ mostrou-se desnecessário, principalmente quando associado ao procedimento de extração química de lipídios.

- Um gradiente costa-oceano, assim como uma variação latitudinal, foram demonstrados através dos valores isotópicos de carbono apresentados pelas espécies analisadas.

- Os grupos isotópicos formados por grandes predadores (*O. orca* e *P. crassidens*) apresentam pequena amplitude em seus nichos isotópicos. Contudo, *P. crassidens* do ecótipo Pcr3 são predadores de baixos níveis tróficos, enquanto que os grupos Oor2 e Oor3 de *O. orca* são predadores de níveis tróficos intermediários.

- Dentre os pequenos golfinhos pelágicos, *D. delphis* e *S. frontalis* apresentam sobreposição em seus nichos isotópicos. Espécies como *S. bredanensis* e *P. crassidens*, ocupam posições tróficas mais altas.

- Para as espécies tipicamente teutófagas, não foi encontrada uma relação entre a amplitude de seus nichos isotópicos com seus padrões de distribuição. Porém uma partição de nicho trófico foi encontrada entre algumas delas (i.e., *P. macrocephalus* e *G. melas*), enquanto *K. breviceps* foi caracterizada como uma espécie generalista.

- As variações isotópicas intraespecíficas permitiram classificar os exemplares de *O. orca* e *P. crassidens* em agrupamentos que possivelmente representem ecótipos distintos.

- As evidências isotópicas de longo prazo sobre o habitat de forrageio e hábito alimentar corroboram os registros observacionais e de conteúdo estomacal para as espécies de odontocetos do Atlântico Sul-Occidental.

- O oceano Atlântico Sul-Occidental pode ser considerado um ambiente-chave para o forrageio das espécies de odontocetos analisadas e,

mais precisamente, a plataforma externa e o talude podem ser consideradas áreas de grande importância ecológica para os odontocetos do Atlântico Sul-Occidental.

REFERÊNCIAS

- Baird, R. W. (2009). Risso's Dolphin. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 975–976). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00222-4
- Ballance, L. T. (2009). Cetacean Ecology. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 196–201). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00052-3
- Barlow, J., Kahru, M., & Mitchell, B. (2008). Cetacean biomass, prey consumption, and primary production requirements in the California Current ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 371, 285–295. doi:10.3354/meps07695
- Barros, N. B., & Clarke, M. R. (2009). Diet. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 311–316). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00076-6
- Bastida, R., Rodríguez, D., Secchi, E., & Silva, V. da. (2007). *Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida*. Buenos Aires: Vázquez Manzini Editores.
- Bisi, T. L., Lailson-Brito, J., & Malm, O. (2012). Ecologia alimentar em mamíferos marinhos: técnicas de estudo. *Oecologia Australis*, 16(02), 210–234. doi:10.4257/oeco.2012.1602.04
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917. doi:10.1139/o59-099
- Botta, S., Hohn, A. A., Macko, S. A., & Secchi, E. R. (2012). Isotopic variation in delphinids from the subtropical western South Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(8), 1689–1698. doi:10.1017/S0025315411000610
- Castello, H. P., & Möller, O. O. (1977). Sobre as condições oceanográficas no Rio Grande do Sul. *Atlântica*, (2), 25–110.
- Castello, J. P. (1998). Teleósteos pelágicos. In U. Seeliger, C. Odebrecht, & J. P. Castello (Eds.), *Os Ecossistemas Costeiros e Marinho do Extremo Sul do Brasil* (p. 341).

- Ciotti, Á. M., Odebrecht, C., Fillmann, G., & Moller, O. O. (1995). Freshwater outflow and Subtropical Convergence influence on phytoplankton biomass on the southern Brazilian continental shelf. *Continental Shelf Research*, 15(14), 1737–1756. doi:10.1016/0278-4343(94)00091-Z
- Clementz, M. T., & Koch, P. L. (2001). Differentiating aquatic mammal habitat and foraging ecology with stable isotopes in tooth enamel. *Oecologia*, 129(3), 461–472. doi:10.1007/s004420100745
- Dalla Rosa, L.; Secchi, E.R., Lailson-Brito Jr., J., Azevedo, A.F. (2002). A review of killer whales (*Orcinus orca*) in Brazilian waters. *IV International Orca Symposium and Workshops September 23-28 2002*, Villiers en Bois, France. pp 46-49.
- Dehn, L.-A., Sheffield, G. G., Follmann, E. H., Duffy, L. K., Thomas, D. L., & O'Hara, T. M. (2006). Feeding ecology of phocid seals and some walrus in the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30(2), 167–181. doi:10.1007/s00300-006-0171-0
- DeNiro, M., & Epstein, S. (1977). Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*, 197, 261–263. doi:10.1126/science.327543
- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495–506. doi:10.1016/0016-7037(78)90199-0
- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. doi:10.1016/0016-7037(81)90244-1
- Dunshea, G., Barros, N. B., Berens McCabe, E. J., Gales, N. J., Hindell, M. A., Jarman, S. N., & Wells, R. S. (2013). Stranded dolphin stomach contents represent the free-ranging population's diet. *Biology Letters*, 9(3), 20121036. doi:10.1098/rsbl.2012.1036
- Estes, J. (2007). *Whales, Whaling, and Ocean Ecosystems*. (J. Estes, Ed.). University of California Press. doi:10.1525/california/9780520248847.001.0001
- Foote, A. D., Newton, J., Ávila-Arcos, M. C., Kampmann, M., Samaniego, J. A., Post, K., ... Gilbert, M. T. P. (2013). Tracking niche variation over millennial timescales in sympatric killer whale lineages. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 280(1768), 20131481. doi:10.1098/rspb.2013.1481
- Ford, J. K. B. (2009). Killer Whale. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 650–657). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00150-4

- France, R. L. (1995). Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series*, 124(1-3), 307–312. doi:10.3354/meps124307
- Fry, B. (1988). Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnology and Oceanography*. doi:10.4319/lo.1988.33.5.1182
- Graham, B. S., Koch, P. L., Newsome, S. D., McMahon, K. W., & Aurioles, D. (2010). Using Isoscapes to Trace the Movements and Foraging Behavior of Top Predators in Oceanic Ecosystems. In *Isoscapes* (pp. 299–318). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-90-481-3354-3_14
- Hardin, G. (1960). The Competitive Exclusion Principle. *Science*, 131(3409), 1292–1297. doi:10.1126/science.131.3409.1292
- Hobson, K. A., Piatt, J. F., & Pitocchelli, J. (1994). Using Stable Isotopes to Determine Seabird Trophic Relationships. *The Journal of Animal Ecology*, 63(4), 786. doi:10.2307/5256
- Hooker, S. K. (2009). Toothed Whales, Overview. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 1173–1179). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00269-8
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22, 415–427. doi:10.1101/SQB.1957.022.01.039
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C., & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80(3), 595–602. doi:10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x
- Jacob, U., Mintenbeck, K., Brey, T., Knust, R., & Beyer, K. (2005). Stable isotope food web studies: A case for standardized sample treatment. *Marine Ecology Progress Series*, 287, 251–253. doi:10.3354/meps287251
- Jansen, O. E., Aarts, G. M., Das, K., Lepoint, G., Michel, L., & Reijnders, P. J. H. (2012). Feeding ecology of harbour porpoises: stable isotope analysis of carbon and nitrogen in muscle and bone. *Marine Biology Research*. doi:10.1080/17451000.2012.692164
- Kiljunen, M., Grey, J., Sinisalo, T., Harrod, C., Immonen, H., & Jones, R. I. (2006). A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models. *Journal of Applied Ecology*, 43, 1213–1222. doi:10.1111/j.1365-2664.2006.01224.x
- Knoff, A., Hohn, A., & Macko, S. (2008). Ontogenetic diet changes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science*, 24(1), 128–137. doi:10.1111/j.1748-7692.2007.00174.x

- Koch, P. L. (2007). Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. In *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science* (Vol. 64, pp. 99–154). doi:10.1002/9780470691854.ch5
- LeDuc, R. (2009). Delphinids, Overview. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 298–302). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00072-9
- Legeckis, R., & Gordon, A. L. (1982). Satellite observations of the Brazil and Falkland currents— 1975 1976 and 1978. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(3), 375–401. doi:10.1016/0198-0149(82)90101-7
- Lodi, L., & Borobia, M. (2013). *Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação*. Technical Books Editora e Livraria.
- Madsen, P. T., Aguilar de Soto, N., Tyack, P. L., & Johnson, M. (2014). Beaked whales. *Current Biology*, 24, R728–30. doi:10.1016/j.cub.2014.06.041
- Mead, J. G. (2009). Beaked whales, overview: Ziphiidae. In W. F. Perrin, B. Würsig, & J. G. M. Thewissen (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (2nd ed., pp. 94–97). New York: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00027-4
- Mendes, S., Newton, J., Reid, R. J., Zuur, A. F., & Pierce, G. J. (2007). Stable carbon and nitrogen isotope ratio profiling of sperm whale teeth reveals ontogenetic movements and trophic ecology. *Oecologia*, 151(4), 605–615. doi:10.1007/s00442-006-0612-z
- Mintenbeck, K., Brey, T., Jacob, U., Knust, R., & Struck, U. (2008). How to account for the lipid effect on carbon stable-isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$): Sample treatment effects and model bias. *Journal of Fish Biology*, 72, 815–830. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01754.x
- Moreno, I. B., Danilewicz, D., Borges-Martins, M., Ott, P. H., Caon, G., & Oliveira, L. R. (2003). Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei* Fraser, 1956) in southern Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 2(1). doi:10.5597/lajam00029
- Muelbert, J. H., Acha, M., Mianzan, H., Guerrero, R., Reta, R., Braga, E. S., ... Ramírez, F. (2008). Biological, physical and chemical properties at the Subtropical Shelf Front Zone in the SW Atlantic Continental Shelf. *Continental Shelf Research*, 28(13), 1662–1673. doi:10.1016/j.csr.2007.08.011
- Newsome, S. D., Clementz, M. T., & Koch, P. L. (2010). Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. *Marine Mammal Science*, (26), 509–572. doi:10.1111/j.1748-7692.2009.00354.x
- Newsome, S. D., Etnier, M. A., Monson, D. H., & Fogel, M. L. (2009). Retrospective characterization of ontogenetic shifts in killer whale diets via

- $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of teeth. *Marine Ecology Progress Series*, 374, 229–242. doi:10.3354/meps07747
- Newsome, S. D., Martinez del Rio, C., Bearhop, S., & Phillips, D. L. (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(8), 429–436. doi:10.1890/060150.1
- Odebretch, C., & Garcia, V. M. T. (1997). Coastal and Marine Environments and Their Biota: Phytoplakton. In U. Seeliger, C. Odebrecht, & J. P. Castello (Eds.), *Subtropical Convergence Environments: The Coast and Sea in the Southwestern Atlantic* (pp. 91–160). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-60467-6
- Parnell, A., & Jackson, A. L. (2010). siar: Stable Isotope Analysis in R. R package version 4.2.
- Paro, B. (2013). *Ecologia trófica da falsa-orca (Pseudorcacassidens) no sul do Brasil: análise de isótopos estáveis e conteúdos estomacais*. Universidade Federal do Rio Grande.
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 293–320. doi:10.1146/annurev.es.18.110187.001453
- Pinedo, M. C., & Rosas, F. C. W. (1989). Novas ocorrências de *Pseudorcacassidens* (Cetacea, Delphinidae) para o Atlântico Sul Ocidental, com observações sobre medidas cranianas e alimentação. *Atlântica*, (11), 73–83.
- Pinela, A., Borrell, A., Cardona, L., & Aguilar, A. (2010). Stable isotope analysis reveals habitat partitioning among marine mammals off the NW African coast and unique trophic niches for two globally threatened species. *Marine Ecology Progress Series*, 416, 295–306. doi:10.3354/meps08790
- Pomerleau, C., Winkler, G., Sastri, A., Nelson, R. J., & Williams, W. J. (2014). The effect of acidification and the combined effects of acidification/lipid extraction on carbon stable isotope ratios for sub-arctic and arctic marine zooplankton species. *Polar Biology*, 37(10), 1541–1548. doi:10.1007/s00300-014-1540-8
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methos, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703–718. doi:Doi 10.2307/3071875
- Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J., & Montaña, C. G. (2007). Getting to the fat of the matter: Models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152, 179–189. doi:10.1007/s00442-006-0630-x

- Rau, G. H., Sweeney, R. E., & Kaplan, I. R. (1982). Plankton $^{13}\text{C}:$ ^{12}C ratio changes with latitude: differences between northern and southern oceans. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(8), 1035–1039. doi:10.1016/0198-0149(82)90026-7
- Ricciardelli, L., Newsome, S. D., Fogel, M. L., & Goodall, R. N. P. (2010). Isotopic assessment of prey and habitat preferences of a cetacean community in the southwestern South Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 418, 235–248. doi:10.3354/meps08826
- Rommel, S. A., Costidis, A. M., Fernandez, A., Jepson, P. D., Pabst, D. A., Houser, D. S., ... Barros, N. B. (2006). Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *Journal of Cetacean Research and Management*, 7(3), 189–209.
- Santos, M. ., Clarke, M. ., & Pierce, G. . (2001). Assessing the importance of cephalopods in the diets of marine mammals and other top predators: problems and solutions. *Fisheries Research*, 52(1-2), 121–139. doi:10.1016/S0165-7836(01)00236-3
- Sigman, D. M., & Casciotti, K. L. (2001). Nitrogen Isotopes in the Ocean. In *Encyclopedia of Ocean Sciences* (pp. 1884–1894). Elsevier. doi:10.1006/rwos.2001.0172
- Tavares, M., Moreno, I. B., Siciliano, S., Rodríguez, D., De O. Santos, M. C., Lailson-Brito Jr, J., & Fabián, M. E. (2010). Biogeography of common dolphins (genus *Delphinus*) in the Southwestern Atlantic Ocean. *Mammal Review*, 40(1), 40–64. doi:10.1111/j.1365-2907.2009.00154.x
- Walker, J. L., & Macko, A. (1999). Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Marine Mammal Science*, 15, 314–334. doi:10.1111/j.1748-7692.1999.tb00804.x
- Zerbini, A. N., Secchi, E. R., Bassoi, M., Dalla Rosa, L., Higa, A., Sousa, L., ... Caon, G. (2004). Distribuição e abundância relativa de cetáceos na Zona Econômica Exclusiva da Região Sudeste-Sul do Brasil. In *Série de Documentos REVIZEE - Score Sul* (pp. 314–334). São Paulo: Instituto de Oceanografia.

CAPÍTULO 2

USO DO HABITAT, ECOLOGIA TRÓFICA E SOBREPOSIÇÃO DE NICO EM ODONTOCETOS DO ATLÂNTICO SUL-OCIDENTAL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Tatsch, A. C., Secchi, E. R. & Botta, S.

(Manuscrito a ser submetido em revista ainda não definida)

USO DO HABITAT, ECOLOGIA TRÓFICA E SOBREPOSIÇÃO DE NICHOS EM ODONTOCETOS DO ATLÂNTICO SUL-OCIDENTAL, ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

RESUMO

Visando investigar variações inter e intraespecíficas quanto ao habitat de forrageio e relações tróficas dos odontocetos do Atlântico sul-Occidental (ASO), foram conduzidas análises de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em dentina e colágeno ósseo de 122 exemplares, de 18 espécies de odontocetos. Foram calculadas as amplitudes e sobreposição dos nichos isotópicos das espécies. Os resultados mostraram dois gradientes de diminuição nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ das espécies: um no sentido costa-oceano e outro latitudinal. Diferenças nos habitats de forrageio e padrões de dieta indicaram a ocorrência de espécies costeiras (*Orcinus orca*) à oceânicas (e.g. *Physeter macrocephalus*), e de predadores de níveis tróficos elevados (e.g. *Pseudorca crassidens*) até predadores de baixos níveis tróficos (e.g. *Globicephala melas*). Foi confirmada a ocorrência de possíveis ecótipos para *O. orca* e *P. crassidens*. Verificaram-se diferenças nas amplitudes dos nichos isotópicos, ocorrendo, em geral, uma ausência ou pequena sobreposição de nicho para as espécies de plataforma interna e média (*O. orca* Oor1, *P. crassidens* Pcr1 e Pcr2, *Steno bredanensis*, *Stenella frontalis*, *Delphinus delphis*), plataforma externa, talude e oceano profundo (*P. crassidens* Pcr3, *G. melas*, *Lagenodelphis hosei*, *Stenella coeruleoalba*, *P. macrocephalus*, *Kogia breviceps*, *Ziphius cavirostris*) e oceânicas de altas

latitudes (*B. arnuxii*). Os resultados deste trabalho fornecem informações relevantes sobre o papel ecológico dos odontocetos no ASO.

PALAVRAS-CHAVE: Nicho isotópico, Cetarctiodactyla, gradientes isotópicos, habitat de forrageio, ecologia alimentar

INTRODUÇÃO

Os cetáceos odontocetos possuem grande importância ecológica, ocorrendo em diferentes zonas oceanográficas e ocupando um amplo espectro trófico (Ballance, 2009; Hooker, 2009). Estão representados por espécies que consomem desde o segundo nível da teia alimentar até predadores de topo (Barros & Clarke, 2009). O Atlântico Sul-Occidental (ASO) possui grande riqueza de odontocetos, dos quais a maior parte das espécies ocorre em regiões oceanográficas distantes da costa, como a plataforma média e externa, talude e regiões oceânicas profundas (Bastida et al., 2007; Lodi & Borobia, 2013). Assim, estudos sobre ecologia trófica e uso do habitat destas espécies costumam ser dispendiosos e logisticamente complexos. Todavia, este conhecimento é imprescindível para a compreensão de seus nichos e papéis ecológicos na estrutura dos ecossistemas marinhos (Barlow et al., 2008). Essas informações são importantes, por exemplo, para avaliar o grau de sobreposição ou segregação de nicho espacial e trófico entre os odontocetos do ASO. Entretanto, tais informações ainda são escassas para a maioria destas espécies no ASO.

No ASO, diversas espécies de odontocetos da plataforma e talude continental podem apresentar sobreposição de nicho trófico. Os pequenos delfínídeos de hábitos pelágicos, como o golfinho-comum (*Delphinus delphis*) e o golfinho-pintado-do-Atlântico (*Stenella frontalis*), possivelmente compartilham os mesmos recursos, enquanto os grandes predadores como a orca (*Orcinus orca*) e a falsa-orca (*Pseudorca crassidens*) provavelmente consomem presas de níveis tróficos mais elevados (Botta et al., 2012). Por sua vez, as espécies tipicamente oceânicas e teutófagas (Barros & Clarke, 2009), i.e., *G. melas*, *P. macrocephalus*, *K. breviceps*, *K. sima*, e as baleias-bicuda da família Ziphiidae, provavelmente compartilham ao menos parte de seus recursos. Alguns trabalhos abordaram o uso do habitat e as relações tróficas interespecíficas entre odontocetos, principalmente da família Delphinidae, através do método de isótopos estáveis (e.g., Pinela et al., 2010; Riccialdelli et al., 2010). Um estudo utilizando sete espécies de delfínídeos do ASO revelou possíveis padrões tróficos entre as espécies das plataformas média e externa e sugeriu dois ecótipos para falsa-orca (um costeiro e um oceânico) (Botta et al., 2012).

Métodos tradicionais de pesquisa em ecologia trófica, como análises de conteúdo estomacal, possuem algumas limitações, i.e., revelam apenas os itens consumidos nas últimas refeições. Também podem apresentar vieses relacionados a superestimação e/ou subestimação dos itens predados (Santos et al., 2001) e a ingestão secundária (Hobson et al., 1994; Dehn et al., 2006). Além disso, esse método é pouco útil para estudar espécies que forrageiam longe da costa, pois estas frequentemente encalham com o estômago vazio. Por sua vez, as análises isotópicas são amplamente utilizadas como uma alternativa ou complemento dos estudos tradicionais sobre ecologia trófica e

uso do habitat em mamíferos marinhos (e.g., Newsome et al., 2010; Riccialdelli et al., 2010; Bisi et al., 2012). Este método baseia-se na premissa de que as composições isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos dos consumidores refletem aquelas encontradas em suas presas (DeNiro & Epstein, 1978, 1981). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de um predador são considerados indicadores de seu nível trófico, permitindo uma comparação entre as posições tróficas dos consumidores de um determinado ecossistema (DeNiro & Epstein, 1981; Post, 2002).

Por sua vez, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados em um predador evidenciam a composição isotópica dos produtores primários de seu habitat de forrageio (DeNiro & Epstein, 1978). No ambiente marinho, existe um gradiente costa-oceano, no qual os valores de $\delta^{13}\text{C}$ diminuem com a distância da costa em função da composição isotópica dos produtores primários (France, 1995). Assim, valores de $\delta^{13}\text{C}$ são tipicamente mais elevados em espécies que forrageiam em ambientes costeiros, pois a contribuição de produtores bentônicos (mais enriquecidos em ^{13}C) é elevada, e mais baixos nas espécies que se alimentem em águas oceânicas, onde o fitoplâncton (mais empobrecido em ^{13}C) domina a produção primária (Clementz & Koch, 2001). Existe também um gradiente latitudinal nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ na base das redes tróficas, com os valores mais elevados em regiões tropicais e diminuindo em direção às altas latitudes (Rau et al., 1982). Estes gradientes isotópicos (Graham et al., 2010), favorecem a distinção quanto aos habitats de forrageio utilizados pelas diferentes espécies de cetáceos.

Entre as vantagens da análise de isótopos estáveis em relação aos métodos tradicionais está a possibilidade de investigar a dieta em diferentes

intervalos de tempo, dependendo do tecido analisado (Koch, 2007; Newsome et al., 2010). Tecidos metabolicamente inertes (e.g., dentes) ou de crescimento contínuo (e.g., ossos), integram informações isotópicas de longo prazo ou mesmo da vida toda do animal, como é o caso dos dentes em odontocetos (Walker & Macko, 1999). Além disso, os valores isotópicos refletem apenas a dieta assimilada pelo predador, evitando os vieses da superestimação e/ou subestimação e ingestão secundária das presas (Bisi et al., 2012). Em relação ao uso do hábitat, os dados de $\delta^{13}\text{C}$ em dentes também fornecem informação sobre a vida inteira dos animais, diferentemente dos registros de avistagem, que fornecem apenas dados de curto prazo (Newsome et al., 2009).

O nicho isotópico de uma determinada espécie corresponde a uma versão simplificada do conceito multidimensional de nicho ecológico (Hutchinson, 1957), uma vez que o nicho isotópico representa apenas duas dimensões do nicho ecológico de uma determinada espécie (Newsome et al., 2007). No nicho isotópico, os eixos são representados pelos valores isotópicos, fornecendo informações sobre os habitats de forrageio ($\delta^{13}\text{C}$) e recursos consumidos ($\delta^{15}\text{N}$), podendo ser utilizado para estimar a sobreposição e/ou segregação espacial e trófica, inter e intraespecíficas (Newsome et al., 2007).

O uso de técnicas alternativas para estudar a ecologia trófica e o uso do habitat de espécies que ocorrem em ambientes remotos é fundamental para ajudar a elucidar o papel ecológico dos odontocetos do ASO, que ainda carecem de informações ecológicas interespecíficas e de longo prazo. Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) investigar os habitats de forrageio e as relações tróficas de 18 espécies de odontocetos, 2) verificar a existência de variações isotópicas intraespecíficas na ecologia trófica e/ou uso do habitat

destas espécies, e 3) avaliar a amplitude e sobreposição dos nichos isotópicos ocupados por estas espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

Analisaram-se amostras de dentes ($n = 108$) e ossos ($n = 14$) de diferentes indivíduos de 18 espécies, de quatro famílias de odontocetos (Tabela 1). O material foi proveniente de exemplares encontrados encalhados durante monitoramentos sistemáticos de praia ao longo da costa do extremo sul do Brasil ($31^{\circ}20'S$, $51^{\circ}05'W$ a $33^{\circ}45'S$, $53^{\circ}22'W$) (Fig. 1) entre 1977 e 2014. Os animais foram medidos e, sempre que possível, o sexo foi determinado. Indivíduos considerados filhotes, com base no comprimento total, foram excluídos das análises por possuírem valores mais enriquecidos em ^{15}N em relação aos juvenis e adultos, devido à influência da lactação (e.g., Jansen et al., 2012; Mendes et al., 2007; Newsome et al., 2009, 2007). Foi escolhido um dente de cada exemplar, dando preferência a dentes da porção mediana da mandíbula ou maxila. No caso dos exemplares com baixa disponibilidade ou ausência de dentes na coleção (e.g. baleias-bicudas), utilizou-se um fragmento retirado da porção superior interna do crânio ou da mandíbula.

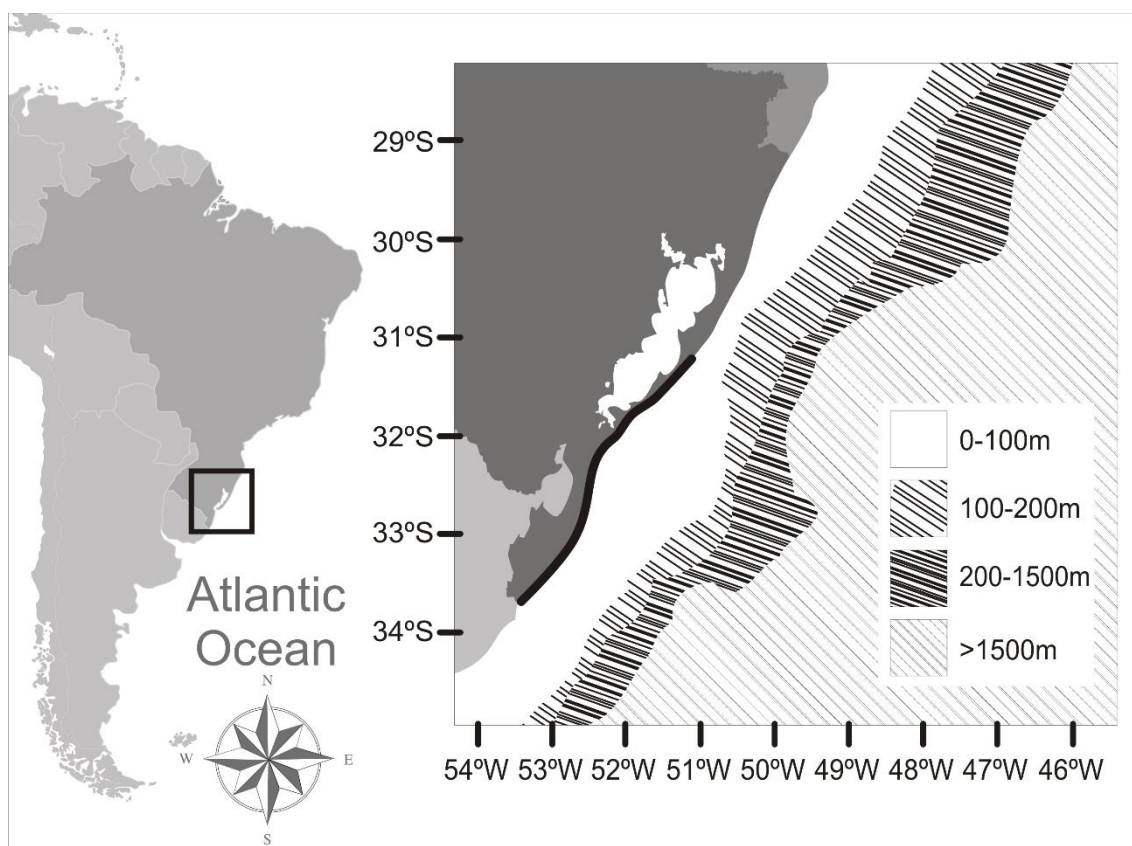


Figura 1. Área de estudo, Atlântico Sul-Occidental, costa do extremo sul do Brasil (31°20'S, 51°05'W à 33°45'S, 53°22'W). Área amostrada é apresentada em destaque.

Análises de isótopos estáveis

As amostras de dentes foram processadas conforme o protocolo de Knoff et al. (2008). Os dentes foram secos em estufa a 60°C por 72h, lavados com água destilada e cortados longitudinalmente por meio de uma serra com lâmina diamantada para expor a dentina. Esta foi pulverizada com uma broca conectada a uma micro-retífica (*Dremel® Rotary Tool*), de tal forma que todas as camadas de crescimento fossem amostradas de maneira homogênea, obtendo-se assim uma amostra representativa de toda a vida do indivíduo. As

amostras de ossos foram lavadas com água destilada e secas em estufa a 60°C por 24h.

A razão C:N das amostras foi calculada com a finalidade de verificar o teor de lipídeos em cada amostra (Post et al., 2007). Os lipídios são tipicamente empobrecidos em ^{13}C , resultando em valores de $\delta^{13}\text{C}$ enviesados em amostras com níveis elevados de lipídio (Peterson & Fry, 1987). As amostras de dentina apresentaram valores de C:N <3,5 (Tabela 1), compatíveis com quantidades desprezíveis de lipídeos (Post et al., 2007). Por outro lado, valores >3,5 foram observados nas amostras de osso dos exemplares de baleias-bicuda. Para estas amostras, o conteúdo lipídico foi extraído através de um extrator *Soxhlet*, sendo submetidas a ciclos de lavagem em solvente composto por clorofórmio:metanol (2:1) durante 24h, seguidos de secagem em estufa por mais 24h e pulverização com graal e pistilo.

Todas as amostras foram acidificadas, por meio de defumação em dessecador com HCl a 30% durante 24h, e secas em estufa, por 2h, para a remoção da fração inorgânica do carbono, a qual pode alterar os valores do $\delta^{13}\text{C}$ orgânico (Knoff et al., 2008). As amostras foram pesadas (0,7 - 1,0 mg) dentro de cápsulas de estanho (3x5 mm).

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foram obtidos através da análise das amostras em um espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (*Delta Plus XP, Thermo Finnigan Bremen, Stable Isotope Core Laboratory, Washington State University*) acoplado a um analisador de elementos (ECS 4010, *Costech Analytical, Valencia, CA*). As razões isotópicas obtidas foram

expressas pela notação δ em partes por mil (‰), e calculadas de acordo com a equação:

$$\delta X (\text{‰}) = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1$$

onde δ é a razão isotópica de ^{13}C ou de ^{15}N em cada indivíduo, X é o isótopo analisado (^{13}C ou ^{15}N), R_{amostra} é a razão isótopo pesado/leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) encontrada na amostra e $R_{\text{padrão}}$ é a razão isótopo pesado/leve encontrada em padrões de internacionais de referência (*Vienna Peedee Belemnite limestone* - VPDB para o Carbono e N_2 atmosférico para o Nitrogênio). A precisão analítica, com base no desvio padrão de réplicas das amostras e do padrão do laboratório (*Acetalinide*), foi $\leq 0,1\text{‰}$ para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Análises estatísticas

A normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. As médias dos valores isotópicos de carbono e nitrogênio entre as espécies foram comparadas por meio de análises de variância, seguidas por comparações *post hoc* através do teste de Tukey. Em casos de variâncias desiguais, utilizou-se o teste F de Welch. A existência de diferenças intraespecíficas entre os sexos foi verificada através de testes t de Student para aquelas espécies com tamanho amostral adequado. O nível de significância adotado foi 0,05. Uma análise de agrupamento (distância Euclidiana, método de ligação completa), baseada nos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ de cada espécie, foi utilizada para detectar agrupamentos isotópicos entre as espécies.

O nicho isotópico de cada espécie, dentro do conjunto de odontocetos analisados, foi determinado utilizando-se o método *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R – SIBER* (Jackson, Inger, Parnell, & Bearhop, 2011), incluído no pacote SIAR (Parnell & Jackson, 2010). O valor da *Standard Ellipse Area*, ajustado para tamanhos amostrais pequenos (*SEAc*), foi utilizado como uma medida de tamanho do nicho isotópico. Calculou-se também o percentual de sobreposição de nicho isotópico par-a-par entre as espécies.

Devido à similaridade isotópica entre os tecidos ósseo e dentário (diferenças de 0,2‰ e 0,3‰, para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente, Foote et al., 2013), estes tecidos foram analisados em conjunto, em todas as análises.

RESULTADOS

Os pressupostos dos testes foram verificados e todos os grupos analisados atingiram a normalidade. Não houve diferença entre sexos das espécies testadas (*P. crassidens*, *S. bredanensis* e *L. hosei*) nos valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ ($p=0,76$; $p=0,37$ e $p=0,51$, respectivamente) e $\delta^{15}\text{N}$ ($p=0,43$; $p=0,14$ e $p=0,88$, respectivamente).

Os exemplares de *O. orca* ($n=8$) apresentaram variação isotópica intraespecífica, caracterizando três grupos isotópicos (ANOVAs, $\delta^{13}\text{C}$: $F_{(2,5)}=101,7$, $p<0,0001$ e $\delta^{15}\text{N}$: $F_{(2,5)}=90,35$, $p<0,0001$; testes *post hoc* HSD de Tukey foram significativos para os três grupos, em ambos os isótopos). O primeiro grupo (Oor1, $n=4$) apresentou os mais altos valores de $\delta^{13}\text{C}$ ($-9,7 \pm 0,5$ ‰) e de $\delta^{15}\text{N}$ ($17,4 \pm 0,3$ ‰), seguido pelo segundo grupo (Oor2, $n=2$) com valores intermediários ($\delta^{13}\text{C}$: $-12,1 \pm 0,2$ ‰; $\delta^{15}\text{N}$: $15,8 \pm 0,2$ ‰). Já o terceiro grupo (Oor3, $n=2$) apresentou valores bem mais baixos, tanto de $\delta^{13}\text{C}$ ($-14,9 \pm$

0,2 ‰), quanto de $\delta^{15}\text{N}$ ($14,3 \pm 0,1$ ‰) (Tabela 1, Fig.2). Similarmente, os dados de *P. crassidens* (n=25) também caracterizaram três grupos isotópicos (ANOVAs, $\delta^{13}\text{C}$: $F_{(2, 22)}=101,4$, $p<0,0001$ e $\delta^{15}\text{N}$: $F_{(2,22)}=229,9$, $p<0,0001$). Para o $\delta^{13}\text{C}$, os testes *post hoc* HSD de Tukey foram significativos para os três grupos. Contudo, para o $\delta^{15}\text{N}$, apenas as comparações entre os grupos Pcr1 e Pcr2 não foram significativas. O primeiro grupo (Pcr1, n=12), apresentou os mais altos valores de $\delta^{13}\text{C}$ ($-10,7 \pm 0,1$ ‰) e de $\delta^{15}\text{N}$ ($18,57 \pm 0,72$ ‰). O segundo grupo (Pcr2, n=5) apresentou valores intermediários ($\delta^{13}\text{C}$: $-11,9 \pm 0,3$ ‰; $\delta^{15}\text{N}$: $18,1 \pm 0,3$ ‰) e o terceiro (Pcr3, n=8) apresentou os mais baixos valores, tanto de $\delta^{13}\text{C}$ ($-12,2 \pm 0,3$ ‰), quanto de $\delta^{15}\text{N}$ ($11,6 \pm 0,9$ ‰) (Tabela 1, Fig.2).

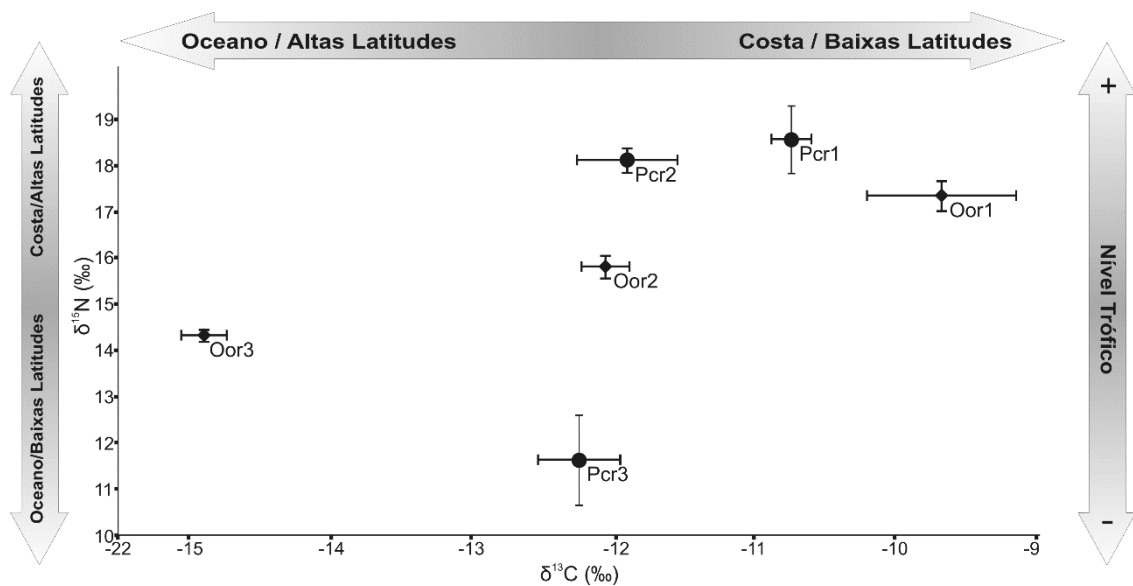


Figura 2. Média $\pm$ SD dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da dentina de exemplares de orca, *Orcinus orca* e *Pseudorca crassidens* encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil. Ambas as espécies apresentaram valores isotópicos que permitiram separá-las em 3 grupos, de acordo com a similaridade nos seus valores isotópicos. *O. orca*: Oor1 (n=4), Oor2 (n=2) e Oor3 (n=2); e *P. crassidens*: Pcr1 (n=12), Pcr2 (n=5) e Pcr3 (n=8).

Tabela 1. Média $\pm$ DP dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ e razão C:N em tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil (31°20'S, 51°05'W à 33°45'S, 53°22'W) (n=122). * Valores de C:N lipídio-extraídos.

Espécies	Nome comum	n	Tecido	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	C:N
Delphinidae						
<i>Steno bredanensis</i>	Golfinho-de-dentes-rugosos	19	Dente	-11,9 $\pm$ 0,6	16,9 $\pm$ 0,9	3,02
<i>Delphinus delphis</i>	Golfinho-comum	9	Dente	-12,2 $\pm$ 0,5	15,6 $\pm$ 0,3	3,47
<i>Stenella frontalis</i>	Golfinho-pintado-do-Atlântico	10	Dente	-12,6 $\pm$ 0,7	15,2 $\pm$ 0,7	3,40
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Golfinho-listrado	3	Dente	-13,7 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 0,1	3,45
<i>Lagenodelphis hosei</i>	Golfinho-de-fraser	12	Dente	-13,0 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,5	3,07
<i>Grampus griseus</i>	Golfinho-de-risso	1	Dente	-12,4	11,9	3,37
<i>Globicephala melas</i>	Baleia-piloto-de-peitorais-longas	7	Dente	-13,5 $\pm$ 0,5	13,3 $\pm$ 0,3	2,92
<i>Pseudorca crassidens</i>	Falsa-orca					
Pcr1		12	Dente	-10,7 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,7	2,77
Pcr2		5	Dente	-11,9 $\pm$ 0,3	18,1 $\pm$ 0,3	2,89
Pcr3		8	Dente	-12,2 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,9	2,70
<i>Orcinus orca</i>	Orca					
Oor1		4	dente	-9,7 $\pm$ 0,5	17,3 $\pm$ 0,3	2,95
Oor2		2	dente	-12,0 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,2	2,93
Oor3		2	dente	-14,9 $\pm$ 0,2	14,3 $\pm$ 0,1	2,96
Physeteridae						
<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	7	dente (6) osso (1)	-13,1 $\pm$ 0,3 -14,0	15,4 $\pm$ 0,5 15,3	2,82 3,32*
Kogiidae						
<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote-pigmeu	7	dente	-13,1 $\pm$ 0,5	14,1 $\pm$ 1,2	3,04
<i>Kogia sima</i>	Cachalote-anão	1	dente	-14,4	13,9	3,02
Ziphiidae						
<i>Ziphius cavirostris</i>	Baleia-bicuda-de-cuvier	4	osso	-15,8 $\pm$ 1,0	14,3 $\pm$ 0,6	4,00*
<i>Berardius arnuxii</i>	Baleia-bicuda-de-arnoux	3	osso	-20,6 $\pm$ 1,2	11,5 $\pm$ 0,4	3,59*
<i>Mesoplodon densirostris</i>	Baleia-bicuda-de-blainville	2	osso	-13,9 $\pm$ 0,1	13,4 $\pm$ 0,3	3,90*
<i>Mesoplodon grayi</i>	Baleia-bicuda-de-gray	2	osso	-15,2 $\pm$ 0,7	15,2 $\pm$ 1,2	3,62*
<i>Mesoplodon layardii</i>	Baleia-bicuda-de-layard	1	osso	-17,8	12,5	3,25*
<i>Mesoplodon hectori</i>	Baleia-bicuda-de-hector	1	osso	-18,9	11,7	3,56*

Valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ das 18 espécies de odontocetos analisadas variaram de -20,6 ‰ a -9,7 ‰ e de 11,6 ‰ a 18,6‰, respectivamente (Tabela 1, Fig. 3). Foi verificado um gradiente isotópico no sentido costa-oceano para os valores de $\delta^{13}\text{C}$, com os valores mais elevados

em delfínídeos costeiros (*O. orca* do grupo Oor1 e *P. crassidens* do grupo Pcr1) e os valores mais baixos em baleias-bicudas como *Berardius arnuxii*, *Mesoplodon layardii* e *M. hectori*. Os valores isotópicos variaram significativamente entre as espécies, para ambos os isótopos (ANOVAs, $\delta^{13}\text{C}$: $F_{(16,83, 100)}=108,2$, $p<0,0001$ e $\delta^{15}\text{N}$: $F_{(17,54, 100)}=148,4$, $p<0,0001$) (Tabela 2). Espécies com $n=1$ não foram incluídas nesta análise.

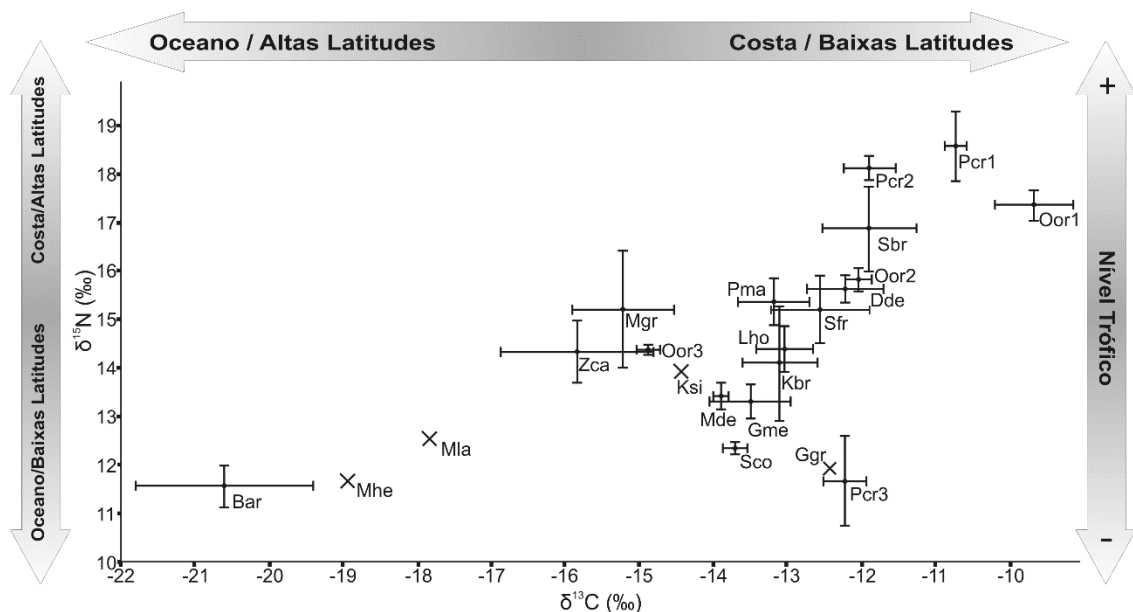


Figura 3. Média $\pm$ SD dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil. *Orcinus orca* (Oor1, Oor2 e Oor3), *Pseudorca crassidens* (Pcr1, Pcr2 e Pcr3), *Steno bredanensis* (Sbr), *Delphinus delphis* (Dde), *Stenella frontalis* (Sfr), *S. coeruleoalba* (Sco), *Lagenodelphis hosei* (Lho), *Grampus griseus* (Ggr), *Globicephala melas* (Gme), *Physeter macrocephalus* (Pma), *Kogia breviceps* (Kbr), *K. sima* (Ksi), *Ziphius cavirostris* (Zca), *Berardius arnuxii* (Bar), *Mesoplodon densirostris* (Mde), *M. grayi* (Mgr), *M. layardii* (Mla) e *M. hectori* (Mhe).

Tabela 2. Resultados do teste *post hoc* HSD de Tukey para comparações múltiplas de valores (‰) de $\delta^{13}\text{C}$ (acima, à direita) e $\delta^{15}\text{N}$ (abaixo, à esquerda) em tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil. *Physeter macrocephalus* (Pma), *Kogia breviceps* (Kbr), *Delphinus delphis* (Dde), *Stenella frontalis* (Sfr), *S. coeruleoalba* (Sco), *Steno bredanensis* (Sbr), *Lagenodelphis hosei* (Lho), *Globicephala melas* (Gme), *Pseudorca crassidens* (Pcr3, Pcr2 e Pcr1), *O. orca* (Oor3, Oor2 e Oor1), *Ziphius cavirostris* (Zca), *Berardius arnuxii* (Bar), *Mesoplodon densirostris* (Mde) e *M. gray* (Mgr). Valores de p significativos (<0,05) estão destacados em negrito

$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$																	
		Pma	Kbr	Dde	Sfr	Sco	Sbr	Lho	Gme	Pcr3	Pcr2	Pcr1	Oor3	Oor2	Oor1	Zca	Bar	Mde	Mgr
	Pma		1,00	0,47	0,97	0,99	0,07	1,00	1,00	0,49	0,06	<0,01	<0,01	0,19	<0,01	<0,01	<0,01	0,90	<0,01
	Kbr	0,46		0,63	0,99	0,97	0,13	1,00	1,00	0,65	0,12	<0,01	<0,01	0,30	<0,01	<0,01	<0,01	0,79	<0,01
	Dde	1,00	0,15		1,00	0,01	1,00	0,74	0,07	1,00	1,00	0,01	<0,01	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Sfr	1,00	0,70	1,00		0,18	0,94	1,00	0,51	1,00	0,93	<0,01	<0,01	0,99	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	<0,01
	Sco	<0,01	0,04	<0,01	<0,01		<0,01	0,94	1,00	0,01	<0,01	<0,01	0,16	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	1,00	0,01
	Sbr	0,18	<0,01	0,51	0,08	<0,01		0,19	<0,01	1,00	1,00	0,15	<0,01	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Lho	0,86	1,00	0,48	0,97	0,01	<0,01		1,00	0,75	0,17	<0,01	<0,01	0,40	<0,01	<0,01	<0,01	0,69	<0,01
	Gme	0,01	0,97	<0,01	0,02	0,86	<0,01	0,71		0,07	<0,01	<0,01	0,03	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	1,00	<0,01
	Pcr3	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,99	<0,01	<0,01	0,08		1,00	0,01	<0,01	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Pcr2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,47	<0,01	<0,01	<0,01		0,17	<0,01	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Pcr1	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	1,00		<0,01	0,06	0,30	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Oor3	0,77	1,00	0,38	0,93	0,01	<0,01	1,00	0,80	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01	0,50	<0,01	0,41	1,00
	Oor2	1,00	0,05	1,00	1,00	<0,01	0,79	0,23	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,17		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Oor1	0,01	<0,01	0,05	<0,01	<0,01	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	0,98	0,53	<0,01	0,15		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Zca	0,78	1,00	0,38	0,93	0,01	<0,01	1,00	0,80	<0,01	<0,01	<0,01	1,00	0,17	<0,01		<0,01	<0,01	0,97
	Bar	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,98	<0,01	<0,01	0,05	1,00	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01
	Mde	0,01	0,99	<0,01	0,03	0,72	<0,01	0,85	1,00	0,04	<0,01	<0,01	0,91	<0,01	<0,01	0,91	0,02		0,05
	Mgr	1,00	0,68	1,00	1,00	<0,01	0,08	0,96	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,92	1,00	<0,01	0,92	<0,01	0,03	

Seis grupos foram identificados, entre as 18 espécies de odontocetos, a partir da análise de agrupamento (Fig. 4). Estes seis grupos foram classificados como: 1) teutófagos oceânicos de águas frias/profundas (*Berardius arnuxii*, *Mesoplodon layardii* e *M. hectori*); 2) predadores de níveis tróficos elevados, de plataforma (*O. orca* Oor1, *P. crassidens* Pcr1 e Pcr2); 3) teutófagos de plataforma externa/talude (*P. crassidens* Pcr3 e *G. griseus*); 4) predadores de níveis tróficos intermediários, de plataforma externa/talude superior (*S. bredanensis*, *O. orca* Oor2, *D. delphis*, *S. frontalis*) e talude (*P. macrocephalus*); 5) predadores de níveis tróficos intermediários, do talude (*L. hosei* e *K. breviceps*) e oceânicos (*S. coeruleoalba*, *G. melas* e *M. densirostris*); e 6) predadores oceânicos de níveis tróficos intermediários (*O. orca* Oor3, *K. sima*, *Z. cavirostris* e *M. grayi*).

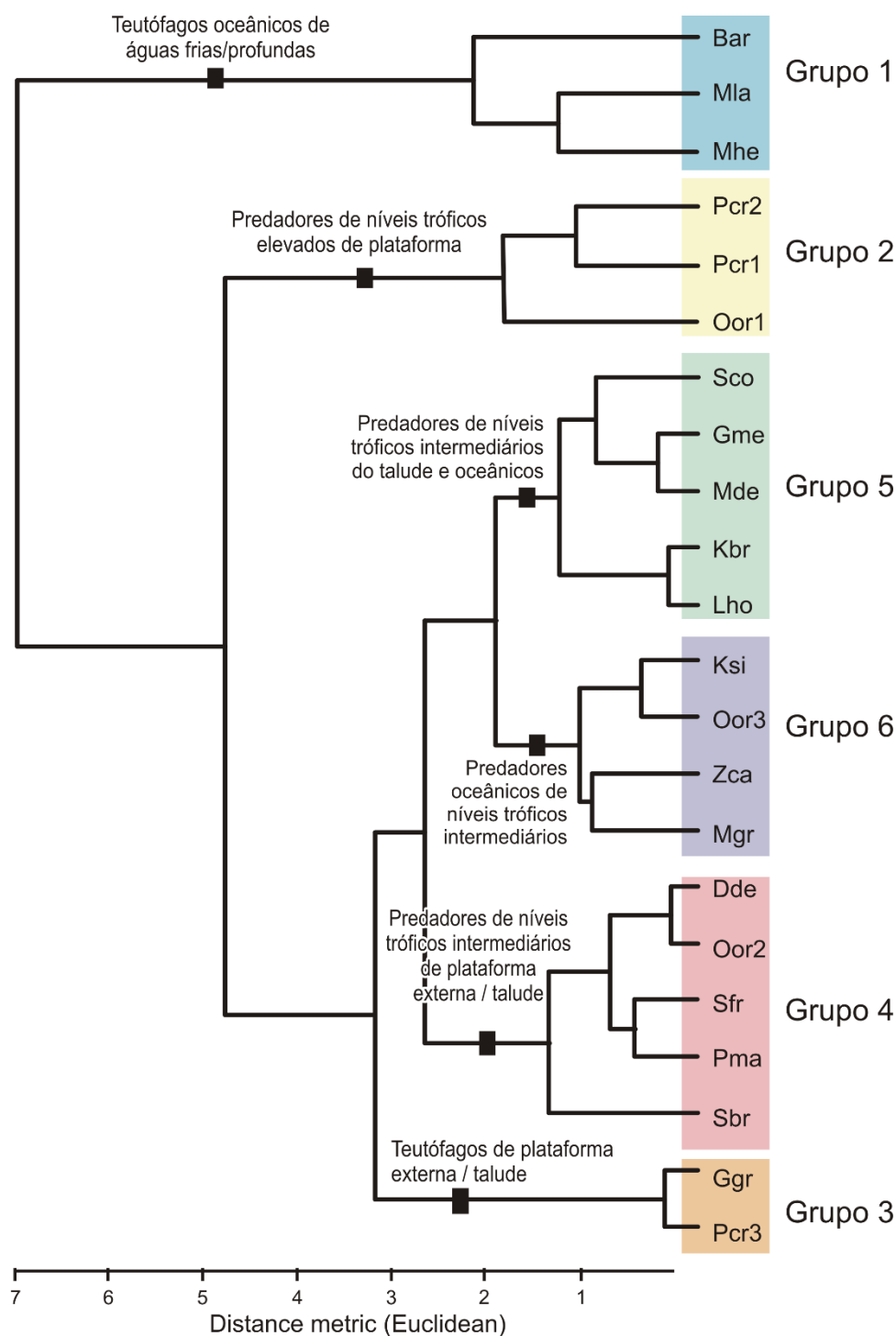


Figura 4. Resultados da análise de Cluster (algoritmo *Paired group*), a partir de valores (‰) de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil. *Orcinus orca* costeiras (Oor1), *O. orca* de plataforma (Oor2), *O. orca* oceânicas (Oor3), *Pseudorca crassidens* (Pcr1), *P. crassidens* (Pcr2), *P. crassidens* (Pcr3), *Steno bredanensis* (Sbr), *Delphinus delphis* (Dde), *Stenella frontalis* (Sfr), *S. coeruleoalba* (Sco), *Lagenodelphis hosei* (Lho), *Grampus griseus* (Ggr), *Globicephala melas* (Gme), *Physeter macrocephalus* (Pma), *Kogia breviceps* (Kbr), *K. sima* (Ksi), *Ziphius cavirostris* (Zca), *Berardius arnuxii* (Bar), *Mesoplodon densirostris* (Mde), *M. gray* (Mgr), *M. layardii* (Mla) e *M. hectori* (Mhe).

A amplitude de nicho isotópico (SEAc), assim como a área e os percentuais de sobreposição de nicho foram calculados para as espécies e grupos intraespecíficos com $n \geq 3$ (Tabela 3). Dentre os 14 grupos analisados, seis espécies apresentaram sobreposição de nicho trófico com, pelo menos, outra espécie (Tabela 3, Fig. 5). As espécies com maior número de sobreposição de nicho trófico foram *K. breviceps* e *S. frontalis*. *K. breviceps* se sobrepôs com *P. macrocephalus*, *S. frontalis*, *G. melas* e *L. hosei*, ficando esta última inteiramente contida dentro da área de elipse de *K. breviceps*. Por sua vez, *S. frontalis* se sobrepôs com *D. delphis*, *P. macrocephalus*, *K. breviceps* e *L. hosei*. As duas espécies de zifídeos analisadas não apresentaram sobreposição de nicho trófico, bem como os pequenos delfinídeos *S. bredanensis* e *S. coeruleoalba*, e os grandes delfinídeos *O. orca* do grupo Oor1 e os três grupos de *P. crassidens* (Fig. 5).

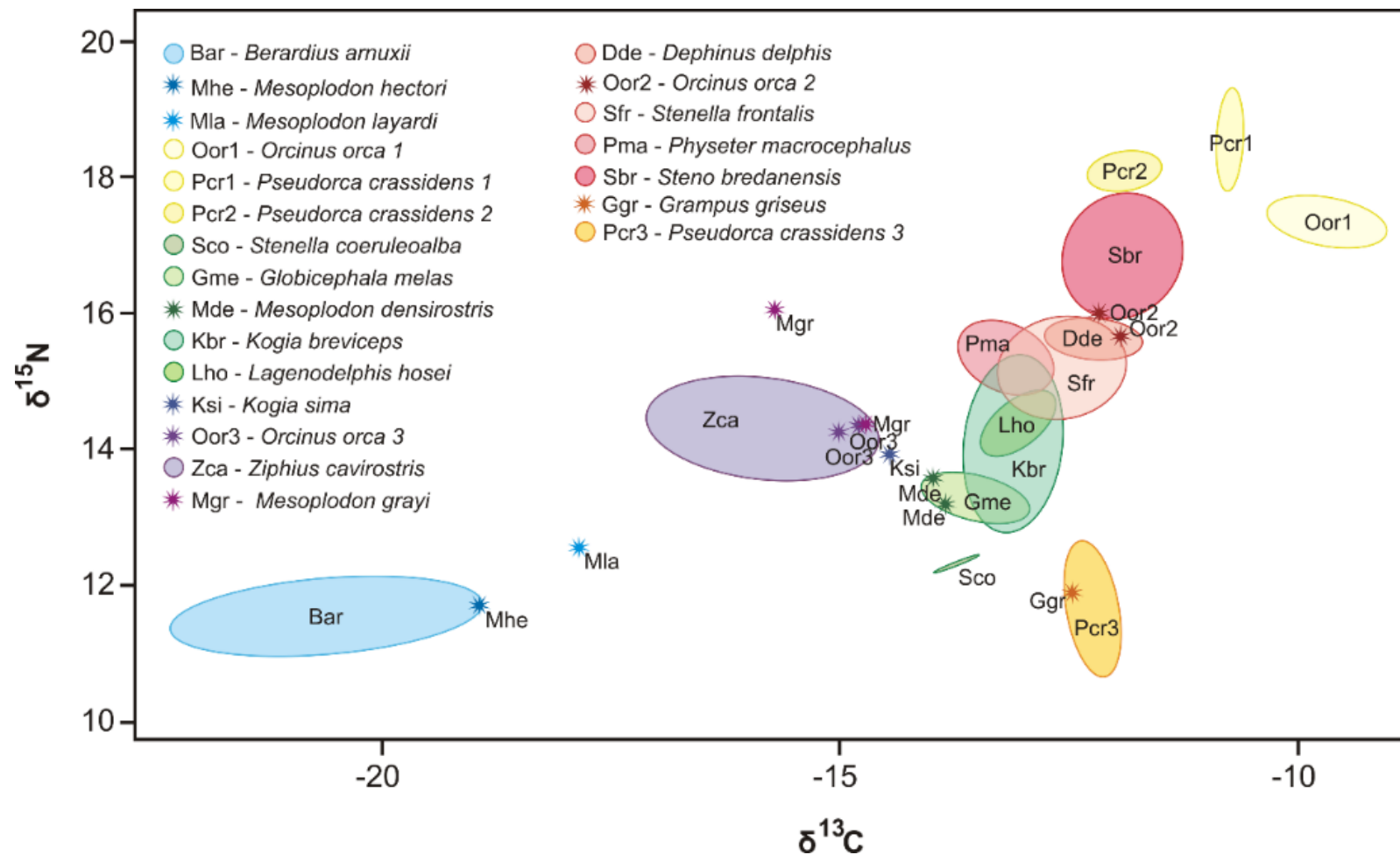


Figura 5. Resultados gerados através do *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R – SIBER*, um método de cálculo de elipses baseado em métricas de amplitude de nicho isotópico (Jackson et al., 2011), a partir de valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil. A representação da área da elipse padrão de nicho isotópico, ajustada para tamanhos amostrais pequenos (SEAc), é fornecida em diferentes cores. A sobreposição entre elipses indica a existência de sobreposição de nicho isotópico entre as espécies.

Tabela 3. Valores da área da elipse padrão de nicho isotópico, ajustada para tamanhos amostrais pequenos (SEAc), área de sobreposição (acima, à direita) e percentual de sobreposição de nicho isotópico (abaixo, à esquerda) entre espécies, calculados através do *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R – SIBER* (Jackson et al. 2011), a partir de valores (‰) de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em tecido ósseo e dentina de odontocetos encontrados encalhados ao longo da costa do extremo sul do Brasil, para avaliar seus nichos isotópicos. 0 indica ausência de sobreposição, *Physeter macrocephalus* (Pma), *Kogia breviceps* (Kbr), *Delphinus delphis* (Dde), *Stenella frontalis* (Sfr), *S. coeruleoalba* (Sco), *Steno bredanensis* (Sbr), *Lagenodelphis hosei* (Lho), *Globicephala melas* (Gme), *Pseudorca crassidens* (Pcr3), *P. crassidens* (Pcr2), *P. crassidens* (Pcr1), *O. orca* oceânicas (Oor3), *O. orca* de plataforma (Oor2), *Orcinus orca* costeiras (Oor1), *Ziphius cavirostris* (Zca), *Berardius arnuxii* (Bar), *Mesoplodon densirostris* (Mde), *M. gray* (Mgr).

%Área		Área de Sobreposição													
Percentual de Sobreposição (%)		Pma	Kbr	Dde	Sfr	Sco	Sbr	Lho	Gme	Pcr3	Pcr2	Pcr1	Oor1	Zca	Bar
	Pma		0,32	0	0,44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kbr	12		0	0,47	0	0	0,50	0,35	0	0	0	0	0	0
	Dde	0	0		0,39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sfr	21	14	22		0	0	0,14	0	0	0	0	0	0	0
	Sco	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sbr	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0
	Lho	0	23	0	7	0	0		0	0	0	0	0	0	0
	Gme	0	14	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
	Pcr3	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0
	Pcr2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0
	Pcr1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	Oor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
	COS														
	Zca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
	Bar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEAc		0,87	2,22	0,51	1,66	<0,01	1,90	0,50	0,63	0,91	0,38	0,35	0,73	3,00	2,99

DISCUSSÃO

Segundo o princípio da exclusão competitiva, as espécies precisam diferir em alguma dimensão do nicho ecológico para que possam coexistir por longos períodos (Hardin, 1960). Assim, ao considerar o conceito bidimensional de nicho isotópico (Newsome et al., 2007) como uma versão simplificada do conceito multidimensional de nicho ecológico (Hutchinson, 1957), verificou-se que a maioria das espécies analisadas possui pequena ou mesmo nenhuma sobreposição de nicho isotópico, ocupando níveis tróficos e/ou áreas de forrageio distintos, o que reduz a possibilidade de competição por presas. Neste estudo, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ permitiram elucidar os prováveis habitats de forrageio e as posições tróficas relativas, respectivamente, inter e intraespecíficas de 18 espécies de odontocetos do ASO. Cabe ressaltar que as variações isotópicas intraespecíficas encontradas em *O. orca* e *P. crassidens* não são devidas a variações temporais, uma vez que as datas de encalhes dos animais de quase todos os grupos são bem distribuídas ao longo do período de coleta. Apenas os exemplares do grupo *P. crassidens* Pcr3 provêm de um encalhe massivo.

$\delta^{13}\text{C}$ como indicador do habitat de forrageio

Dois tipos de gradientes puderam ser observados nos valores isotópicos de carbono, refletindo os habitats ocupados pelas espécies, tanto no sentido costa-oceano, como no sentido latitudinal. Adicionalmente, duas espécies (*O. orca* e *P. crassidens*) apresentaram diferenças intraespecíficas nas áreas de forrageio, com grupos predando em regiões costeiras e outros em regiões oceânicas. Variações isotópicas intraespecíficas, que sugerem diferenças

quanto ao uso do habitat e/ou tipo de dieta, foram reportadas para *P. macrocephalus* no Atlântico Norte-Oriental (Borrell et al., 2013), *O. orca* para o Mar do Norte (Foote et al., 2013) e *G. griseus* no ASO (Riccialdelli et al., 2010).

No sentido costa-oceano, valores mais enriquecidos em ^{13}C foram observados em espécies que estariam forrageando em regiões costeiras (e.g., alguns grupos de *O. orca*, Forney & Wade, 2007) comparados com os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados naquelas de hábitos oceânicos (e.g., *P. macrocephalus*, Zerbini et al., 2004, Bastida et al., 2007). Este padrão isotópico também foi observado para outros cetáceos, no extremo sul da América do Sul (Riccialdelli et al., 2010), na costa nordeste da África (Pinela et al., 2010) e sudeste do Brasil (Bisi et al., 2013). Tal gradiente ocorre porque alguns produtores primários dos ecossistemas costeiros, i.e., macrófitas e macroalgas, são tipicamente mais enriquecidos em ^{13}C do que os produtores dos ecossistemas oceânicos, essencialmente o fitoplâncton pelágico (France, 1995). Por outro lado, um padrão de diminuição nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ das espécies oceânicas de regiões de baixas latitudes em relação às de altas latitudes também pôde ser corroborado. Espécies tipicamente de altas latitudes (e.g., *B. arnuxii*, Kasuya, 2009; MacLeod et al., 2006) apresentaram os menores valores isotópicos de carbono, enquanto espécies de latitudes menores tiveram valores mais enriquecidos em ^{13}C (e.g., *L. hosei*, Bastida et al., 2007; Moreno et al., 2003). Este gradiente latitudinal ocorre devido à variação natural nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ na base das redes tróficas marinhas, cujos valores mais elevados são encontrados em regiões tropicais e diminuindo em direção às altas latitudes (Rau et al., 1982).

O nicho isotópico e a formação de guildas tróficas

Uma vez confirmada a existência de gradientes isotópicos nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, as diferentes guildas tróficas agrupando espécies (ou ecótipos de algumas delas) puderam ser evidenciadas em cada região oceanográfica (i.e., plataforma interna e média, plataforma externa, talude e oceano profundo, e regiões de altas latitudes).

Espécies de Plataforma Interna e Média

Duas espécies de grandes delfinídeos tiveram os valores isotópicos de carbono mais enriquecidos em ^{13}C (tabela 1), evidenciando, assim, seus hábitos costeiros: *O. orca* Oor1 e *P. crassidens* Pcr1. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ similares aos de *O. orca* Oor1 foram reportados para dentes de *Tursiops truncatus*, pertencentes a uma população residente que habita o estuário da Lagoa dos Patos e áreas costeiras adjacentes (Botta et al., 2012). Essas espécies também apresentaram os mais altos valores de $\delta^{15}\text{N}$, indicando, portanto, elevadas posições tróficas para estes predadores (Fig 3). Contudo, seus nichos isotópicos, representados pelas elipses geradas a partir dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, não apresentaram sobreposição (Fig. 5, tabela 3), indicando que algum tipo de partição de nicho possibilita a coexistência destes grandes predadores nesta região do oceano. *Pseudorca crassidens* tipicamente consome peixes e lulas, embora o consumo de pequenos cetáceos também já tenha sido reportado (Andrade et al., 2001; Baird, 2009a), o que poderia explicar os altos valores de $\delta^{15}\text{N}$ neste grupo. Similarmente, *O. orca* preda sobre peixes ósseos e cartilaginosos, bem como cefalópodes e mamíferos marinhos de águas

costeiras e oceânicas do ASO (e.g., Castello & Pinedo, 1986; Ott & Danilewicz, 1997; Santos & Netto, 2005).

Da mesma forma, outros predadores como *P. crassidens* Pcr2, *S. bredanensis* e *D. delphis*, apesar de mostrarem uma sobreposição em seus nichos espaciais (i.e., nos valores de $\delta^{13}\text{C}$), provavelmente não estão competindo por recursos, uma vez que não foi verificada uma sobreposição em seus nichos isotópicos (Fig. 5, tabela 3). Valores de $\delta^{15}\text{N}$ distintos entre cada uma delas indicaram que *P. crassidens* Pcr2 estaria ocupando uma posição trófica mais elevada, seguida de *S. bredanensis* e *D. delphis*, ocupando uma posição mais baixa (tabelas 1 e 2; Fig 3). No sudeste brasileiro, onde *S. brenadensis* apresenta uma distribuição mais costeira (Lodi & Hetzel, 1999), estudos revelaram apenas peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) em seu conteúdo estomacal (DiBeneditto et al., 2001). Na região sul, estudos sobre seu comportamento alimentar ainda são inexistentes, porém, dados isotópicos da espécie indicam um habitat mais afastado da costa (Botta et al., 2012). Em contrapartida, *D. delphis* e *S. frontalis*, apresentaram marcada sobreposição de nicho isotópico (fig. 5, tabela 3), provavelmente competindo por presas nas áreas onde se sobrepõem espacialmente. Porém, a amplitude de nicho isotópico de *S. frontalis* é maior do que a de *D. delphis*, definida pelas duas dimensões isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Esta variação, na qual *S. frontalis* apresentou menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ pode ser explicada como decorrente de um habitat de forrageio em regiões mais profundas do que *D. delphis*. Porém, este resultado estaria contradizendo o que se conhece para as espécies do ASO, onde os registros de *D. delphis* são, predominantemente, sobre a plataforma externa e talude, enquanto aqueles para *S. frontalis* são em

regiões mais costeiras (Jefferson et al., 2009; Moreno et al., 2005; Passadore et al., 2015; Tavares et al., 2010; Zerbini et al., 2004). Por outro lado, *S. frontalis* distribui-se principalmente em águas mais quentes, tendo ocorrência sazonal nas regiões ao sul (Moreno et al., 2005), o que explicaria os baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Sigman et al., 2009) porém não os de $\delta^{13}\text{C}$.

O grupo Oor2 de *O. orca* apresentou valores relativamente empobrecidos em ^{15}N , similares aos apresentados por *D. delphis*. Nesta região, a predação de *O. orca* sobre o espinhel pelágico é frequentemente reportada (Dalla Rosa & Secchi, 2007; Passadore et al., 2015; Secchi & Vaske Jr., 1998), o que resultaria em valores de $\delta^{15}\text{N}$ similares aos apresentados por *P. crassidens*. Contudo, uma possível explicação para os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de *O. orca* Oor2 seria uma dieta baseada no consumo de baleias, como verificado para outras regiões (e.g., Ford, 2009; Jefferson et al., 1991), ou ainda, por uma dieta mista de baleias e peixes. No ASO, existem registros de filhotes de *Eubalaena australis* que apresentam cicatrizes, possivelmente decorrentes de mordidas de *O. orca* (Rowntree et al., 2001). Assim, este balenídeo zooplantófago (Kenney, 2009) talvez seja, ao menos, uma das espécies de misticetos predada pelo grupo *O. orca* Oor2.

Espécies de Plataforma Externa, Talude e Região Oceânica Profunda

Grampus griseus é considerada uma espécie oceânica quase exclusivamente teutófaga (Baird, 2009b). Neste estudo, o único exemplar da espécie apresentou baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$, similares àqueles do grupo Pcr3 de *P. crassidens*. Todos os espécimes deste último provêm de um encalhe massivo ocorrido na área de estudo, cujos conteúdos estomacais continham

exclusivamente lulas oceânicas epipelágicas da espécie *Ommastrephes bartramii* (Andrade et al., 2001), sugerindo uma dieta predominantemente teutófaga para o grupo Pcr3 de *P. crassidens*. Estas evidências sugerem, conforme mencionado por Paro (2013), a presença de ecótipos especialistas para *P. crassidens*, que predam em baixos níveis tróficos, como sobre lulas oceânicas.

A análise de nicho isotópico demonstrou ainda a ausência de sobreposição de nicho isotópico entre o restante das espécies (*P. macrocephalus*, *L. hosei*, *G. melas* e *S. coeruleoalba*) que forrageiam nesta região oceanográfica, a exceção de *K. breviceps*, cujo nicho isotópico resultou em uma sobreposição parcial com *G. melas* e *P. macrocephalus* e total com *L. hosei*. O talude concentra uma elevada densidade de presas dos cetáceos, como peixes (e.g., Rossi-Wongtschowski et al., 2007) e cefalópodes (e.g. Santos & Haimovici, 2007). Além disso, a porção do ASO que compreende a região do extremo sul do Brasil até o sul do Uruguai e Argentina é influenciada diretamente pela confluência da corrente do Brasil e corrente das Malvinas, dando origem a uma zona de alta produtividade biológica, denominada Zona de Convergência Subtropical (Castello & Möller, 1977). Tais características, em conjunto, podem favorecer a ocorrência dessas e outras espécies de cetáceos na área nas quais coexistem, particionando seus nichos e, dessa forma, reduzindo a possibilidade de competição direta por recursos. Características específicas, tais como tamanho do corpo e outras diferenças morfológicas, bem como características comportamentais (e.g., modo de predação, se através dos dentes ou por sucção) e fisiológicas (tempo e profundidade de mergulho no qual capturam suas presas), permitem àquelas espécies que forrageiam nos

mesmos habitats uma relativa partição dos recursos (e.g., Praca & Gannier, 2008; Spitz et al., 2011). Tal partição pode reduzir a competição potencial e favorecer a coexistência destas espécies no ASO. *Physeter macrocephalus*, por exemplo, é uma espécie altamente adaptada para a realização de mergulhos profundos, capturando presas de grande tamanho e ocupando, assim, uma elevada posição trófica (Berta et al., 2007; Stewart, 2009). No outro extremo, *S. coeruleoalba* apresentou valores significativamente empobrecidos em ^{15}N (tabela 1, fig. 3). Apenas cefalópodes e pequenos peixes pelágicos foram encontrados nos conteúdos estomacais de *S. coeruleoalba* na Patagônia, Argentina (de Castro et al., 2011) e no sul do Brasil (Rosas et al., 2001). Tais achados estão em conformidade com os baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie.

Lagenodelphis hosei e *K. breviceps* apresentaram uma completa sobreposição em seus nichos isotópicos, sendo que o da segunda também se sobrepõe com o nicho de *G. melas* (fig. 5, tabela 3). Tal sobreposição pode ocorrer em função da parcela teutófaga da dieta destas espécies, uma vez que *K. breviceps* e *G. melas* se alimentam basicamente de lulas oceânicas, enquanto *L. hosei* consome este tipo de presa, além de peixes demersais e crustáceos (Santos & Haimovici, 2001; Moreno et al., 2003; Santos & Pinedo, 1994; Secchi et al., 1994). Entretanto, a maior amplitude de nicho de *K. breviceps* (fig. 5, tabela 3) pode indicar que ela é uma espécie generalista (ao contrário de *L. hosei* e *G. melas*) e que, devido a sua melhor adaptação para mergulhos profundos (Berta et al., 2007) que permite uma alimentação de presas inacessíveis para *L. hosei* e *G. melas*, como lulas e misidáceos de profundidade (e.g., Santos & Haimovici, 2001; Secchi et al., 1994).

Apesar do nicho isotópico de *M. densirostris* não ter sido calculado, a ocorrência de sobreposição com *G. melas* é bastante provável, pois seus valores de ambos isótopos são bastante similares e encontram-se sobrepostos (Fig. 3). E apesar destas espécies possuírem faixas de distribuição praticamente opostas (MacLeod et al., 2006; Taylor et al., 2008a, 2008b) existem algumas áreas de intersecção entre suas faixas de distribuição, e uma delas ocorre no ASO. *M. densirostris* aparentemente possui uma dieta mista, consumindo cefalópodes e pequenos peixes (Bastida et al., 2007; MacLeod et al., 2003). Outras espécies que forrageiam nesta região como *M. grayi*, *Z. cavirostris* e *K. sima* apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ ainda mais baixos, levando à suposição de um forrageio em regiões ainda mais distantes da costa (Fig. 3). No entanto, não é possível determinar se esta diferença resulta apenas das variações no gradiente decrescente costa-oceano para os valores de $\delta^{13}\text{C}$ (France, 1995). É possível, ao menos para algumas destas espécies, que suas áreas de forrageio sejam em latitudes mais altas (e.g., *M. grayi*, que possui uma distribuição mais austral, e *K. sima*, que tende a ter uma distribuição mais tropical, MacLeod et al., 2006; Muñoz-Hincapié et al., 1998). Todas estas espécies apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ variados, indicando que as mesmas ocupam diferentes posições dentro da rede trófica desta região (Fig. 3). *M. grayi* possui uma dieta predominantemente piscívora, enquanto *Z. cavirostris* possui uma dieta essencialmente teutófaga (MacLeod et al., 2003). Similarmente, *K. sima* consome cefalópodes de águas profundas, mas também peixes e, ocasionalmente, crustáceos (Mcalpine, 2009; Pinedo, 1987; Staudinger et al., 2014).

Espécies Oceânicas de Altas Latitudes

Um grupo formado exclusivamente por membros da família Ziphiidae, i.e., *B. arnuxii*, *M. layardii* e *M. hectori*, foi o mais diferenciado isotopicamente entre os demais grupos de odontocetos (Fig. 4). Estas espécies apresentaram baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (tabela 1), condizentes com o hábito teutófago desta família (MacLeod et al., 2003).

As espécies deste grupo também apresentaram os mais baixos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dentre todos os odontocetos analisados (tabela 1), indicando uma ocorrência oceânica. Entretanto, é preciso ressaltar que talvez este marcado empobrecimento no ^{13}C seja devido a um efeito combinado dos decréscimos nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ tanto no sentido costa-oceano (France, 1995), quanto pelo gradiente latitudinal (Rau et al., 1982). Essas três espécies, restritas ao Hemisfério Sul, apresentam uma distribuição austral similar, sendo que *M. hectori* ocorre em águas temperadas frias, enquanto que *M. layardii* e *B. arnuxii* vivem em águas temperadas frias/subantártica e subantárticas/antárticas, respectivamente (MacLeod et al., 2006). De fato, *B. arnuxii*, que apresentou os mais baixos valores de $\delta^{13}\text{C}$, é a espécie que possui a distribuição mais austral entre as espécies de zifídeos analisadas (Bastida et al., 2007; MacLeod et al., 2006).

Finalmente, o grupo Oor3 de *O. orca*, apresentou valores de $\delta^{13}\text{C}$ anormalmente baixos, mesmo considerando o hábito oceânico reportado para a espécie no ASO (Zerbini et al., 2004). Assim, o forrageio em regiões oceânicas mais austrais, tipicamente empobrecidas em ^{13}C (Rau et al., 1982) poderia explicar os valores encontrados. Um estudo utilizando orcas rastreadas com transmissores satelitais mostrou que esta espécie pode se deslocar de águas antárticas até águas subtropicais do Uruguai e Brasil (Durban & Pitman,

2012). Portanto, é possível que os grupos *O. orca* Oor2 e Oor3 forrageiem em áreas equivalentes do oceano (e.g., talude continental), porém em diferentes latitudes.

CONCLUSÃO

Através da análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio na dentina ou osso de odontocetos, as áreas de forrageio e níveis tróficos diferenciados foram evidenciados entre ecótipos e espécies, minimizando assim, a possibilidade de competição intra ou interespecífica, respectivamente. Um gradiente costa-oceano, bem como um gradiente latitudinal, foram demonstrados através dos valores isotópicos de carbono apresentados pelas espécies analisadas. Adicionalmente, duas espécies (*O. orca* e *P. crassidens*) apresentaram variações intraespecíficas em suas áreas de forrageio. Dentre as espécies que forrageiam sobre a plataforma interna (enriquecida em ^{13}C), dois grandes predadores (*O. orca* e *P. crassidens*) particionam seus nichos em níveis tróficos elevados. Em regiões mais afastadas da costa (valores de $\delta^{13}\text{C}$ intermediários) diversas espécies também coexistem, sem apresentar uma sobreposição nos seus nichos tróficos, ocupando desde posições tróficas elevadas (*P. crassidens*), intermediárias (*S. bredanensis*) e outras mais baixas como *D. delphis* e *S. frontalis*. Estas últimas apresentam uma sobreposição moderada em seus nichos tróficos. Duas espécies de regiões de plataforma externa, talude e zonas mais profundas, puderam ser identificadas em níveis tróficos baixos (*P. crassidens* e *G. griseus*), enquanto *P. macrocephalus* ocupa

a posição superior desta cadeia trófica. Esta última, assim como outras espécies de odontocetos (*L. hosei*, *S. coeruleoalba* e *G. melas*) também apresentaram uma diferenciação nos seus nichos, a exceção de *K. breviceps*, cujo amplo nicho isotópico teve sobreposição com a maior parte das espécies desta região oceanográfica. Zifídeos apresentaram baixos valores de $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$, coincidindo com seus hábitos teutófagos e sua ocorrência em águas oceânicas profundas. Dentre elas, as espécies tipicamente de altas latitudes apresentaram os menores valores de $\delta^{13}\text{C}$, em conformidade com o gradiente latitudinal decrescente das bases das redes tróficas tropicais em direção aos polos.

Este estudo analisou evidências isotópicas de longo prazo sobre o habitat de forrageio e hábito alimentar de odontocetos, corroborando os registros observacionais e de conteúdo estomacal e sugerindo que a plataforma externa e o talude são áreas de grande importância ecológica para os odontocetos do ASO, fornecendo informações relevantes sobre o papel ecológico dos odontocetos neste ecossistema.

REFERÊNCIAS

- Aguiar dos Santos, R., & Haimovici, M. (2001). Cephalopods in the diet of marine mammals stranded or incidentally caught along southeastern and southern Brazil (21–34°S). *Fisheries Research*, 52(1-2), 99–112. doi:10.1016/S0165-7836(01)00234-X
- Andrade, A. L. V., Pinedo, M. C., & Barreto, A. S. (2001). Gastrointestinal parasites and prey items from a mass stranding of false killer whales, *Pseudorca crassidens*, in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 61(1), 55–61. doi:10.1590/S0034-71082001000100008
- Baird, R. W. (2009a). False Killer Whale. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 405–406). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00097-3

- Baird, R. W. (2009b). Risso's Dolphin. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 975–976). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00222-4
- Ballance, L. T. (2009). Cetacean Ecology. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 196–201). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00052-3
- Barlow, J., Kahru, M., & Mitchell, B. (2008). Cetacean biomass, prey consumption, and primary production requirements in the California Current ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, 371, 285–295. doi:10.3354/meps07695
- Barros, N. B., & Clarke, M. R. (2009). Diet. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 311–316). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00076-6
- Bastida, R., Rodríguez, D., Secchi, E., & Silva, V. da. (2007). *Mamíferos acuáticos de Sudamérica y Antártida*. Buenos Aires: Vázquez Manzini Editores.
- Berta, A., Sumach, J. L., & Kovacs, K. M. (2007). Marine mammals: evolutionary biology (second edition). *Polar Research*, 26(1). doi:10.3402/polar.v26i1.6210
- Bisi, T. L., Lailson-Brito, J., & Malm, O. (2012). Ecologia alimentar em mamíferos marinhos: técnicas de estudo. *Oecologia Australis*, 16(02), 210–234. doi:10.4257/oeco.2012.1602.04
- Borrell, A., Velásquez Vacca, A., Pinela, A. M., Kinze, C., Lockyer, C. H., Vighi, M., & Aguilar, A. (2013). Stable Isotopes Provide Insight into Population Structure and Segregation in Eastern North Atlantic Sperm Whales. *PLoS ONE*, 8(12), e82398. doi:10.1371/journal.pone.0082398
- Botta, S., Hohn, A. A., Macko, S. A., & Secchi, E. R. (2012). Isotopic variation in delphinids from the subtropical western South Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(8), 1689–1698. doi:10.1017/S0025315411000610
- Castello, H. P., & Möller, O. O. (1977). Sobre as condições oceanográficas no Rio Grande do Sul. *Atlântica*, (2), 25–110.
- Castello, H. P., & Pinedo, M. C. (1986). Sobre unos avistages en el mar de distintas espécies de cetáceos en el sur de Brasil. Buenos Aires: Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur.
- Clementz, M. T., & Koch, P. L. (2001). Differentiating aquatic mammal habitat and foraging ecology with stable isotopes in tooth enamel. *Oecologia*, 129(3), 461–472. doi:10.1007/s004420100745
- Dalla Rosa, L., & Secchi, E. R. (2007). Killer whale (*Orcinus orca*) interactions with the tuna and swordfish longline fishery off southern and south-eastern Brazil: a comparison with shark interactions. *Journal of the Marine*

- Biological Association of the UK*, 87(01), 135.
doi:10.1017/S0025315407054306
- De Castro, R. L., Leonardi, M. S., Grandi, M. F., García, N. A., & Crespo, E. A. (2011). Far from home: Record of a vagrant striped dolphin in Patagonia with notes on diet, parasites and age determination. *Mammalian Biology - Zeitschrift Für Säugetierkunde*, 76(4), 521–524.
doi:10.1016/j.mambio.2011.02.004
- Dehn, L.-A., Sheffield, G. G., Follmann, E. H., Duffy, L. K., Thomas, D. L., & O'Hara, T. M. (2006). Feeding ecology of phocid seals and some walrus in the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30(2), 167–181.
doi:10.1007/s00300-006-0171-0
- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42, 495–506. doi:10.1016/0016-7037(78)90199-0
- DeNiro, M. J., & Epstein, S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.
doi:10.1016/0016-7037(81)90244-1
- DiBeneditto, A. P. M., Ramos, R. M. A., Siciliano, S., Santos, R. A. dos, Bastos, G., & FagundesNetto, E. (2001). Stomach contents of delphinids from Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Aquatic Mammals*, 1(27), 24–28.
- Durban, J. W., & Pitman, R. L. (2012). Antarctic killer whales make rapid, round-trip movements to subtropical waters: evidence for physiological maintenance migrations? *Biology Letters*, 8(2), 274–277.
doi:10.1098/rsbl.2011.0875
- Foote, A. D., Newton, J., Ávila-Arcos, M. C., Kampmann, M., Samaniego, J. A., Post, K., ... Gilbert, M. T. P. (2013). Tracking niche variation over millennial timescales in sympatric killer whale lineages. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 280(1768), 20131481.
doi:10.1098/rspb.2013.1481
- Ford, J. K. B. (2009). Killer Whale. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 650–657). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00150-4
- Forney, K. A., & Wade, P. R. (2007). Worldwide Distribution and Abundance of Killer Whales. In J. A. Estes, D. P. Demaster, D. F. Doak, T. M. Williams, & R. L. Brownell Jr (Eds.), *Whales, Whaling, and Ocean Ecosystems* (pp. 145–162). Berkeley: University of California Press.
doi:10.1525/california/9780520248847.003.0012
- France, R. L. (1995). Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series*, 124(1-3), 307–312. doi:10.3354/meps124307

- Graham, B. S., Koch, P. L., Newsome, S. D., McMahon, K. W., & Aurioles, D. (2010). Using Isoscapes to Trace the Movements and Foraging Behavior of Top Predators in Oceanic Ecosystems. In *Isoscapes* (pp. 299–318). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-90-481-3354-3_14
- Hardin, G. (1960). The Competitive Exclusion Principle. *Science*, 131(3409), 1292–1297. doi:10.1126/science.131.3409.1292
- Hobson, K. A., Piatt, J. F., & Pitocchelli, J. (1994). Using Stable Isotopes to Determine Seabird Trophic Relationships. *The Journal of Animal Ecology*, 63(4), 786. doi:10.2307/5256
- Hooker, S. K. (2009). Toothed Whales, Overview. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 1173–1179). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00269-8
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22, 415–427. doi:10.1101/SQB.1957.022.01.039
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C., & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*, 80(3), 595–602. doi:10.1111/j.1365-2656.2011.01806.x
- Jansen, O. E., Aarts, G. M., Das, K., Lepoint, G., Michel, L., & Reijnders, P. J. H. (2012). Feeding ecology of harbour porpoises: stable isotope analysis of carbon and nitrogen in muscle and bone. *Marine Biology Research*. doi:10.1080/17451000.2012.692164
- Jefferson, T. A., Fertl, D., Bolaños-Jiménez, J., & Zerbini, A. N. (2009). Distribution of common dolphins (*Delphinus* spp.) in the western Atlantic Ocean: a critical re-examination. *Marine Biology*, 156(6), 1109–1124. doi:10.1007/s00227-009-1152-y
- Jefferson, T. A., Stacey, P. J., & Baird, R. W. (1991). A review of Killer Whale interactions with other marine mammals: predation to co-existence. *Mammal Review*, 21(4), 151–180. doi:10.1111/j.1365-2907.1991.tb00291.x
- Kasuya, T. (2009). Giant Beaked Whales: *Berardius bairdii* and *B. arnuxii*. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 498–500). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00117-6
- Kenney, R. D. (2009). Right Whales: *Eubalaena glacialis*, *E. japonica*, and *E. australis*. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 962–972). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00220-0
- Knoff, A., Hohn, A., & Macko, S. (2008). Ontogenetic diet changes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science*, 24(1), 128–137. doi:10.1111/j.1748-7692.2007.00174.x

- Koch, P. L. (2007). Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates. In *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science* (Vol. 64, pp. 99–154). doi:10.1002/9780470691854.ch5
- Lodi, L., & Borobia, M. (2013). *Baleias, botos e golfinhos do Brasil: guia de identificação*. Technical Books Editora e Livraria.
- Lodi, L., & Hetzel, B. (1999). Rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, feeding behaviors in Ilha Grande Bay, Brazil. *Biociências*, 7(1), 29–42.
- MacLeod, C. D., Santos, M. B., & Pierce, G. J. (2003). Review of Data on Diets of Beaked Whales: Evidence of Niche Separation and Geographic Segregation. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 83(3), S0025315403007616. doi:10.1017/S0025315403007616h
- MacLeod, C., WF, P., R, P., J, B., L, B., A, D., ... GT, W. (2006). Known and inferred distributions of beaked whale species (Cetacea: Ziphiidae). *Journal of Cetacean Research and Management*, (7), 271–286.
- Mcalpine, D. F. (2009). Pygmy and Dwarf Sperm Whales: *Kogia breviceps* and *K. sima*. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 936–938). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00212-1
- Mendes, S., Newton, J., Reid, R. J., Zuur, A. F., & Pierce, G. J. (2007). Stable carbon and nitrogen isotope ratio profiling of sperm whale teeth reveals ontogenetic movements and trophic ecology. *Oecologia*, 151(4), 605–615. doi:10.1007/s00442-006-0612-z
- Moreno, I. B., Danilewicz, D., Borges-Martins, M., Ott, P. H., Caon, G., & Oliveira, L. R. (2003). Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei* Fraser, 1956) in southern Brazil. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 2(1). doi:10.5597/lajam00029
- Moreno, I., Zerbini, A., Danilewicz, D., de Oliveira Sa, S., Simões-Lopes, P., Lailson-Brito, J., & Azevedo, A. (2005). Distribution and habitat characteristics of dolphins of the genus *Stenella* (Cetacea: Delphinidae) in the southwest Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 300, 229–240. doi:10.3354/meps300229
- Muñoz-Hincapié, M., Mora-Pinto, D., Palacios, D. M., Secchi, E. R., & Mignucci-Giannoni, A. A. (1998). First osteological record of the dwarf sperm whale in Colombia, with notes on the zoogeography of *Kogia* in South America. *Rev. La Acad. Columbiana Ciencias*, (22), 433–444.
- Newsome, S. D., Clementz, M. T., & Koch, P. L. (2010). Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. *Marine Mammal Science*, (26), 509–572. doi:10.1111/j.1748-7692.2009.00354.x
- Newsome, S. D., Etnier, M. A., Monson, D. H., & Fogel, M. L. (2009). Retrospective characterization of ontogenetic shifts in killer whale diets via

- $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of teeth. *Marine Ecology Progress Series*, 374, 229–242. doi:10.3354/meps07747
- Newsome, S. D., Martinez del Rio, C., Bearhop, S., & Phillips, D. L. (2007). A niche for isotopic ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(8), 429–436. doi:10.1890/060150.1
- Ott, P. H., & Danilewicz, D. (1997). Presence of franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) in the stomach of a killer whale (*Orcinus orca*) stranded in southern Brazil. *Mammalia*, (64), 605–609.
- Parnell, A., & Jackson, A. L. (2010). siar: Stable Isotope Analysis in R. R package version 4.2.
- Paro, B. (2013). *Ecologia trófica da falsa-orca (Pseudorcacrassidens) no sul do Brasil: análise de isótopos estáveis e conteúdos estomacais*. Universidade Federal do Rio Grande.
- Passadore, C., Domingo, A., & Secchi, E. R. (2015). Analysis of marine mammal bycatch in the Uruguayan pelagic longline fishery operating in the Southwestern Atlantic Ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 72(5), 1637–1652. doi:10.1093/icesjms/fsu250
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 293–320. doi:10.1146/annurev.es.18.110187.001453
- Pinedo, M. C. (1987). First record of a dwarf sperm whale from Southwest Atlantic, with reference to osteology, food habits and reproduction. *Sci. Rep. Whales Res. Inst.*, (38), 171–186.
- Pinela, A., Borrell, A., Cardona, L., & Aguilar, A. (2010). Stable isotope analysis reveals habitat partitioning among marine mammals off the NW African coast and unique trophic niches for two globally threatened species. *Marine Ecology Progress Series*, 416, 295–306. doi:10.3354/meps08790
- Post, D. M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, 83(3), 703–718. doi:10.2307/3071875
- Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J., & Montaña, C. G. (2007). Getting to the fat of the matter: Models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152, 179–189. doi:10.1007/s00442-006-0630-x
- Praca, E., & Gannier, A. (2008). Ecological niches of three teuthophageous odontocetes in the northwestern Mediterranean Sea. *Ocean Science*, 4(1), 49–59. doi:10.5194/os-4-49-2008

- Rau, G. H., Sweeney, R. E., & Kaplan, I. R. (1982). Plankton $^{13}\text{C}:$ ^{12}C ratio changes with latitude: differences between northern and southern oceans. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 29(8), 1035–1039. doi:10.1016/0198-0149(82)90026-7
- Ricciardelli, L., Newsome, S. D., Fogel, M. L., & Goodall, R. N. P. (2010). Isotopic assessment of prey and habitat preferences of a cetacean community in the southwestern South Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 418, 235–248. doi:10.3354/meps08826
- Rosas, F., Monteiro-Filho, E. L. A., Marigo, J., Santos, R. A. dos, Andrade, A. L. V., Rautenberg, M., ... Bordignon, M. (2001). The striped dolphin, *Stenella coeruleoalba* (Cetacea: Delphinidae), on the coast of São Paulo State, southeastern Brazil. *Aquatic Mammals*, 1(28), 60–66.
- Rossi-Wongtschowski, C., Almeida, M., & Bernardes, R. (2007). Estrutura de assembleias de peixes pelágicos na zona econômica exclusiva da região sudeste-sul do Brasil. In *Prospecção pesqueira de espécies pelágicas de pequeno porte na Zona Econômica Exclusiva da região Sudeste-Sul do Brasil*. São Paulo: Instituto Oceanográfico.
- Rowntree, V. J., Payne, R., & Schell, D. M. (2001). Changing patterns of habitat use by southern right whales (*Eubalaena australis*) on their nursery ground at Península Valdés, Argentina, and in their long-range movements. *J. CETACEAN RES. MANAGE*, 2(SPECIAL ISSUE), 133–143.
- Santos, M. ., Clarke, M. ., & Pierce, G. . (2001). Assessing the importance of cephalopods in the diets of marine mammals and other top predators: problems and solutions. *Fisheries Research*, 52(1-2), 121–139. doi:10.1016/S0165-7836(01)00236-3
- Santos, M. C. O., & Netto, D. F. (2005). Killer whale (*Orcinus orca*) predation on a franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in Brazilian waters. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 4(1). doi:10.5597/lajam00072
- Santos, R. A., & Haimovici, M. (2007). Composição de espécies, distribuição e abundância relativa de cefalópodes do ambiente pelágico da plataforma externa e talude superior da região Sudeste e Sul do Brasil. In R. A. Bernardes, C. L. D. B. R. Wongtschowski, & L. S. P. Madureira (Eds.), *Prospecção pesqueira de espécies pelágicas de pequeno porte na Zona Econômica Exclusiva da região Sudeste-Sul do Brasil* (pp. p. 131–165). São Paulo.
- Secchi, E. R., Campolim, M. B., & Moller, L. M. (1994). Notas sobre o encalhe de dois cachalotes pigmeus, *Kogia breviceps*, na costa sul do Rio Grande do Sul - Brasil. Valdivia: Anales de la Cuarta Reunion de Trabajos de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de America del Sur.

- Secchi, E. R., & Vaske Jr., T. (1998). Killer whale (*Orcinus orca*) sightings and depredation on tuna and swordfish longline catches in southern Brazil. *Aquatic Mammals*, 2(24), 117–122.
- Sigman, D. M., Karsh, K. L., & Casciotti, K. L. (2009). Nitrogen Isotopes in the Ocean. In J. Steele, K. Turekian, & S. Thorpe (Eds.), *Encyclopedia of Ocean Sciences* (2nd ed., pp. 40–54). Elsevier. doi:10.1016/B978-012374473-9.00632-9
- Spitz, J., Cherel, Y., Bertin, S., Kiszka, J., Dewez, A., & Ridoux, V. (2011). Prey preferences among the community of deep-diving odontocetes from the Bay of Biscay, Northeast Atlantic. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 58(3), 273–282. doi:10.1016/j.dsr.2010.12.009
- Staudinger, M. D., McAlarney, R. J., McLellan, W. A., & Ann Pabst, D. (2014). Foraging ecology and niche overlap in pygmy (*Kogia breviceps*) and dwarf (*Kogia sima*) sperm whales from waters of the U.S. mid-Atlantic coast. *Marine Mammal Science*, 30(2), 626–655. doi:10.1111/mms.12064
- Stewart, B. S. (2009). Diving Behavior. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 321–327). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.00078-X
- Tavares, M., Moreno, I. B., Siciliano, S., Rodríguez, D., De O. Santos, M. C., Lailson-Brito Jr, J., & Fabián, M. E. (2010). Biogeography of common dolphins (genus *Delphinus*) in the Southwestern Atlantic Ocean. *Mammal Review*, 40(1), 40–64. doi:10.1111/j.1365-2907.2009.00154.x
- Taylor, B. L., Baird, R., Barlow, J., Dawson, S. M., Ford, J., Mead, J. G., ... Pitman, R. . (2008a). *Globicephala melas*. Retrieved July 15, 2015, from www.iucnredlist.org
- Taylor, B. L., Baird, R., Barlow, J., Dawson, S. M., Ford, J., Mead, J. G., ... Pitman, R. . (2008b). *Mesoplodon densirostris*. Retrieved July 15, 2015, from www.iucnredlist.org
- Walker, J. L., & Macko, A. (1999). Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Marine Mammal Science*, 15, 314–334. doi:10.1111/j.1748-7692.1999.tb00804.x
- Walker, J. L., Potter, C. W., & Macko, S. A. (1999). The diet of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science*, 15(2), 335–350. doi:10.1111/j.1748-7692.1999.tb00805.x
- Zerbini, A. N., Secchi, E. R., Bassoi, M., Dalla Rosa, L., Higa, A., Sousa, L., ... Caon, G. (2004). Distribuição e abundância relativa de cetáceos na Zona Econômica Exclusiva da Região Sudeste-Sul do Brasil. In *Série de Documentos REVIZEE - Score Sul* (pp. 314–334). São Paulo: Instituto de Oceanografia.

ANEXO I

Effects of acidification, lipid removal and mathematical normalization on carbon and nitrogen stable isotope compositions in beaked whale (Ziphiidae) bone

Tatsch, A. C., Secchi, E. R. & Botta, S.

(Manuscrito em revisão no periódico *Rapid Communications in Mass
Spectrometry*)

Effects of acidification, lipid removal and mathematical normalization on carbon and nitrogen stable isotope compositions in beaked whale (Ziphiidae) bone

(*Running head:* Lipid extraction and acidification in stable isotopes of beaked whale bones)

Ana Carolina C. Tatsch*

Eduardo R. Secchi

and

Silvina Botta

Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Avenida Itália km 8 s/n, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

Laboratório de Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – ECOMEGA, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Avenida Itália km 8 s/n, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

*Corresponding author: A.C.C. Tatsch, ECOMEGA, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil; E-mail: carol.c.tatsch@gmail.com

RATIONALE: The analysis of stable isotopes in tissues like teeth and bones has been used to study long term trophic ecology and habitat use in marine mammals. However, carbon isotopes can be altered by the presence of lipids and/or carbonates. Lipid extraction and acidification are common treatments used to account for the presence of these compounds. However, their impact on carbon and nitrogen isotope values vary among tissues and/or species, requiring taxon-specific protocols to be developed.

METHODS: The effects of lipid extraction and acidification and their interaction on carbon and nitrogen isotope values were studied for beaked whale (Ziphiidae) bone samples. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were determined in quadruplicate samples: control, lipid-extracted, acidified and lipid extracted followed by acidification. Samples were analyzed by means of elemental analysis isotope ratio mass spectrometry. Further, the efficiency of five mathematical models developed for estimating lipid-normalized $\delta^{13}\text{C}$ values from untreated $\delta^{13}\text{C}$ values were tested.

RESULTS: Significant increases in $\delta^{13}\text{C}$ values were verified after lipid extraction. No significant changes in $\delta^{13}\text{C}$ were found in acidified samples. An interaction between both treatments was demonstrated for $\delta^{13}\text{C}$ but not for $\delta^{15}\text{N}$ values. No change was observed in $\delta^{15}\text{N}$ values for lipid extracted and/or acidified samples. Although all tested models presented good predictive power to estimate lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ values, linear models performed better.

CONCLUSIONS: Given the observed changes in $\delta^{13}\text{C}$ values after lipid extraction, we recommend *a priori* lipid extraction or *a posteriori* lipid normalization, through simple linear models, for beaked whale bones. Further, acidification seems to be an unnecessary step before stable isotope analysis, at least for bone samples of ziphiids.

Keywords: cetaceans, stable isotopes, lipids, mathematical lipid normalization, acidification.

Carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) stable isotope analysis by mass spectrometry is a widely used tool to investigate trophic relationships and habitat use (e.g. ^[1-3]). The method is based on the principle that the isotopic compositions in the tissues of consumers reflect those found in the mixture of assimilated food items ^[4,5]. Predator tissues, however, present higher ratios of heavy to light isotopes, being the stepwise enrichment in ^{15}N stronger (3-5‰) than in ^{13}C (0-1‰) ^[4-6]. Therefore, nitrogen isotope ratios are usually applied to infer trophic positions within a particular food web ^[7] while carbon isotopic values are used to trace primary carbon sources ^[8,9].

In the context of the current anthropogenic pressure that cetaceans are experiencing ^[10], the analysis of stable isotopes in archived tissues such as teeth and bones of marine mammals has been used to investigate long term changes in trophic interactions and patterns of habitat use due to human induced changes in their ecosystems (e.g., ^[11,12]). Due to their resistance to alteration and, in the case of odontocetes, the chronological deposition of discrete layers of dentine until death ^[13], teeth are the preferred material used (e.g. ^[14,15]). However, in cases where no teeth are available, bones become a valid alternative, if their differences in isotopic turnover and discrimination factors ^[16] are taken into account. This is especially important for the members of the beaked whales (Ziphiidae), which are characterized by a reduced number of teeth, commonly one or two pairs in the lower jaw ^[17].

A wide range of protocols are used for preparing bone samples for stable isotope analysis by mass spectrometry. The most routinely applied methods include the lipid

extraction and acidification of the samples before isotopic analysis ^[18]. The presence of lipids can potentially bias isotopic values because lipids are depleted in ¹³C relative to proteins ^[4,19,20]. In the case of bones, $\delta^{13}\text{C}$ values in lipids were found to be on average 8.4‰ more negative than the value of whole collagen ^[21]. Cetaceans present a considerable amount of fat in their bone tissue, contributing to up to 50% of their skeleton wet-weight ^[22,23], therefore the bias introduced by lipids in carbon stable isotope values may potentially affect their interpretation as tracers of trophic ecology in this group ^[24].

In order to address the problem of the variable lipid content of samples two types of treatments are used: *a priori* chemical lipid extraction and *a posteriori* mathematical lipid normalization. For lipid extraction prior to isotope analysis, chemical solvents (e.g., chloroform:methanol ^[25]) are used. However, the main concern with this method is that they can potentially and unpredictably affect $\delta^{15}\text{N}$ values (e.g., ^[26,27]). Indeed, several studies reported an enrichment in ¹⁵N as a result of lipid extraction (e.g., ^[28]) while others found negative or no effects on nitrogen isotope values ^[29,30]. As a surrogate, separate runs for carbon (lipid extracted samples) and nitrogen (non-lipid extracted samples) can be performed, however leading to higher analytical costs. Alternatively, models for mathematical lipid normalization of non-lipid extracted carbon isotope values were proposed for a diversity of tissues and organisms (e.g., ^[24,31,32]). These models are based on tissue carbon:nitrogen elemental ratio (C:N ratio) as an indicator of the lipid content, due to the greater relative proportion of carbon in lipids ^[31]. Although some early general models were developed for aquatic organisms (e.g., ^[24,31]), it has been recommended the development of taxon-specific models for lipid normalization of $\delta^{13}\text{C}$ values (e.g., ^[26,33]).

As stated earlier, acidification is a common procedure before analysis of samples that contain carbonates, such as bioapatites^[34]. The removal of carbonates is relevant due to their carbon different source, and hence, different carbon isotopic value, from the organic carbon incorporated into tissues^[34–36]. As in the case of the lipid extraction, altered nitrogen isotope values were reported for acidified samples (e.g.,^[26]). The combined effect of these two treatments was proved to bias isotopic results, both for $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values^[26]. Nevertheless, effects has not been addressed for cetaceans' bone and teeth yet and remains as a source of bias in carbon and nitrogen stable isotopes analysis of these tissues that conventionally involve acidification as a routine sample preparation procedure.

Given the increasing range of applications of isotopic analysis of bone and tooth collagen the establishment of a standard procedure for the preparation of these type of tissues for mass spectrometry is paramount for comparability, precision and accuracy of results. Therefore, the present study was undertaken aiming to (1) verify the effects of lipid extraction and acidification and their interaction in carbon and nitrogen stable isotope analysis of bone tissue and (2) to assess the efficiency of mathematical models developed for estimating lipid-normalized $\delta^{13}\text{C}$ values from untreated $\delta^{13}\text{C}$ values.

EXPERIMENTAL

Sample collection

Bone samples were obtained from the interior portion of the skull of 13 specimens of six species of beaked whales (Ziphiidae) collected along the southern coast of Brazil (31°20'S, 51°05'W to 33°45'S, 53°22'W) between 1977 and 2013. The sample included the Cuvier's (*Ziphius cavirostris*, n=4), Arnoux's (*Berardius arnuxii*, n=3), Blainville's

(*Mesoplodon densirostris*, n=2), Gray's (*M. grayi*, n=2), Layard's (*M. layardii*, n=1) and Hector's (*M. hectori*, n=1) beaked whales.

Sample preparation

Each bone fragment was washed with distilled water, dried in a 60°C oven for 24 hours and divided in four subsamples. One of them was not chemically treated and was used as control (bulk). The other samples were exposed to three treatments: lipid extraction (LE); acidification (A) and lipid extraction and acidification (LEA).

Lipids were extracted through a Soxhlet reflux using a chloroform/methanol (2:1) solution for 24h (modified from ^[25]). Lipid-extracted samples were then dried at 60°C for 24h and ground to a fine powder with a mortar and pestle. Acidification was performed by exposing previously powdered samples to vaporous 30% hydrochloric acid in a desiccator for 24h. Acidified samples were then dried for 2-4 h at 60°C ^[37].

Stable isotope analysis

Approximately 1 mg of powdered samples was weight into tin capsules and analyzed in an elemental analyzer (ECS 4010, Costech Analytical, Valencia, CA) coupled to a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta Plus XP, Thermo Finnigan Bremen) (Stable Isotope Core Laboratory, Washington State University). All isotopic measurements are reported in standard δ - notation in parts per thousand (‰) relative to the international standards (V-PDB and atmospheric N₂, for carbon and nitrogen isotopes, respectively). Internal standards of known carbon and nitrogen composition (acetanilide and keratin) were analyzed between samples in order to estimate instrument precision. The standard deviation of these internal standards were $\leq 0.1\text{‰}$ for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Values for C:N ratios are reported based on uncorrected percentage element data.

A proxy to estimate carbonate content of bone samples were used in order to evaluate its relationship with the effect of acidification on carbon stable isotope compositions. The proxy was proposed by Jacob et al. ^[35] and is calculated as:

$$\text{Carbonate proxy} = \frac{C:N_{\text{bulk}}}{C:N_A} - 1 \text{ (Eq. 1)}$$

where $C:N_{\text{bulk}}$ and $C:N_A$ are the C:N ratios in control and acidified samples, respectively. According to the authors, samples with carbonate proxy ≤ 0.03 can be considered as carbonate free.

Lipid correction models

Four published linear and non-linear normalization models for estimating lipid-corrected $\delta^{13}\text{C}$ values ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Mx}}$) from $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ and $C:N_{\text{bulk}}$ values were used. These values were then compared to those obtained from chemically lipid extracted samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}}$).

Model (1) is a non-linear equation proposed by McConnaughey & McRoy ^[31], developed from C:N and $\delta^{13}\text{C}$ values obtained from diverse marine organisms (including marine mammals):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{M1}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} + D * \left(I + \frac{3.9}{1 + \frac{287}{L}} \right) \text{ (Eq. 2)}$$

where $\delta^{13}\text{C}_{\text{M1}}$ is the lipid-normalized value of the sample; $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ is the value of the control sample; D is the isotopic difference between protein and lipid, where a value of 6‰ is assigned; I is a constant, assigned value of -0.207; and L is the proportional lipid content of the sample, calculated as:

$$L = \frac{93}{1+[0.246*(C:N)-0.775]^{-1}} \quad (\text{Eq. 3})$$

where C:N is the ratio between carbon and nitrogen in the bulk sample.

The second (Model 2 - M2) and third (Model 3 - M3) models considered are a reformulation of McConnaughey & McRoy ^[31] equations where the protein-lipid discrimination D and the constant I were re-estimated. Model 2 parameters were calculated for fish muscle ($D = 7.018\%$ and $I = 0.048$; Kiljunen et al. ^[38]) and Model 3 parameters were obtained for cetacean skin ($D = 6.386\%$ and $I = 0.004$; Lesage et al. ^[32]).

Model 4 (M4), proposed by Post et al. ^[24], is a linear equation fitted for tissues and whole organisms of a diverse group of terrestrial and aquatic animal species. The model has two parameters and is described as:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{M4}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} - 3.32 + 0.99 * \text{C:N} \quad (\text{Eq. 4})$$

Finally, a simple linear model (Model 5 - M5) was developed based on our bone sample data, using $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ and C:N_{bulk} , and comparing its accuracy with the four previous models.

Model's performance was assessed by comparing lipid-normalized carbon isotope values with those obtained from lipid-extracted samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$), through the coefficient of determination (R^2) and modeling efficiency (EF) ^[39], defined as follows:

$$EF = 1 - \frac{\sum(y_i - x_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

where y_i is the observed carbon isotope value of the lipid extracted sample ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$), x_i is the lipid-normalized value predicted by the different models ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Mx}}$), and $\bar{y}$ is the mean

of observed $\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ values. Modelling efficiency values vary between negative infinity and 1. Values close to 1 indicate an almost perfect fit, whereas values approaching 0 indicate a worse performance. Negative values indicate that the average of observed values ($\bar{y}$) is a better predictor than the model ^[39].

Statistical analyses

Shapiro-Wilk and Levene tests, were used to verify the normality and homogeneity of variances, respectively. Isotopic values of control samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{bulk}}$) were compared to those of lipid extracted samples, ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{LE}}$), acidified samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{A}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$) and lipid extracted and acidified samples ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{LEA}}$) through repeated measures ANOVA, followed by *post hoc* Tukey's test, for each $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. The interaction between lipid extraction and acidification was evaluated by a repeated measures factorial ANOVA (two-way). Values of $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$) and $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}}$ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$) were compared through paired t-tests.

For model evaluation, differences between lipid extracted and bulk $\delta^{13}\text{C}$ values ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$) and between modelled and bulk $\delta^{13}\text{C}$ values ($\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{Mx}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{Mx}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$) were calculated. These differences were plotted against C:N_{bulk} in order to visually evaluate which of the models performed better. Further, simple linear regressions were applied to paired $\delta^{13}\text{C}_{\text{Mx}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ values in order to further confirm model performances. In all cases, two-sided tests were considered with a significance level of 0.05. Statistical analyses were run in PAST ^[40].

RESULTS

Effects of lipid extraction and acidification

$\delta^{13}\text{C}$ values of beaked whale's bones were significantly affected by sample treatment ($F_{(3,12)} = 4.65$, $p = 0.008$). After lipid extraction, enriched $\delta^{13}\text{C}$ values were observed (Tukey's HSD test, $q = 4.17$, $p = 0.030$). Similarly, higher $\delta^{13}\text{C}$ values were obtained after lipid extraction followed by acidification (Tukey's HSD test, $q = 3.86$, $p = 0.046$). Both treatments (LE and LEA) decreased the average C:N and the variation among samples. Acidification, on the other hand, had no effect on $\delta^{13}\text{C}$ values (Tukey's HSD test, $q = 0.64$, $p = 0.970$). Indeed, most samples (62%) presented *carbonate proxy* values ≤ 0.03 . Further, nitrogen isotope values were not significantly affected by any of the treatments ($F_{(3,12)} = 1.25$, $p = 0.307$) (Table 1, Figure 1).

A significant interaction between lipid extraction and acidification was detected for $\delta^{13}\text{C}$ values ($F_{(1,12)} = 6.034$, $p = 0.030$), with an explained variance of 33.5%. A potential effect of this interaction on $\delta^{13}\text{C}$ values is suggested by the difference between $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}}$ ($t = 2.457$, $p = 0.030$). No significant effect of the interaction was observed for $\delta^{15}\text{N}$ ($F_{(1,12)} = 2.991$, $p = 0.109$) (Figure 2).

Lipid normalization

The linear regression between $\delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}}$ and C:N_{bulk} using the present beaked whale bone data set, was highly significant ($R^2 = 0.94$; $F_{(1,11)} = 166.3$; $p < 0.001$) and resulted in the following equation (Model 5 – M5):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{M5}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{bulk}} - 3.346 + 0.971 * \text{C:N}_{\text{bulk}} \quad (\text{Eq. 6})$$

A linear relationship between $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ and C:N_{bulk} was observed resulting in linear models performing better than non-linear models. The non-linear models tended to overestimate the change in $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values at lower (i.e. <5) C:N_{bulk} values. On the

contrary, these models underestimate $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values at high C:N_{bulk} values. The only exception is M1 that underestimates all predicted $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values (Figure 3, Table 2).

DISCUSSION

Chemical lipid extraction and acidification

Lipid extraction with chloroform:methanol increased $\delta^{13}\text{C}$ values, confirming the potential impact of ^{13}C depleted carbon isotope values in beaked whale bone samples that are not subjected to this procedure. The magnitude of this post-extraction enrichment varied with the lipid content of the sample, represented by the C:N ratio found in the control samples ^[24]. The two samples with the higher C:N values showed the highest difference in $\delta^{13}\text{C}$ values between extracted and non-extracted samples. According to McConnaughey & McRoy ^[31] any sample with C:N>4 would require to account for its lipid content. However, Post et al. ^[24], considered that the lipid content of the sample would have a potential impact on $\delta^{13}\text{C}$ values in samples from aquatic organisms with C:N > 3.5. Differences in $\delta^{13}\text{C}$ values observed in the present study following lipid extraction were significant even though most of the samples showed C:N values around 4, confirming the importance of accounting for ^{13}C -depleted lipids in cetacean bone samples.

Higgs et al. ^[23] reviewed the lipid content of some cetacean species and reported marked variations in oil content depending on the species and the skeletal element. A general trend of increasing lipid content from the tip of the upper jaw to the rear of the skull was suggested by the authors. All samples used in the present work were obtained from the interior back portion of the skull and most samples had C:N values around 4, indicating that they probably have low amounts of fat. However, at least two specimens from different species (*Ziphius cavirostris* and *Mesoplodon grayi*) had relatively high lipid

content with C:N values between 8-9, suggesting that some variations in bone lipid content may exist resulting from individual body fat condition ^[23], although inefficient skull cleaning procedures could not be discarded. Moreover, a rising number of studies are using historical bone samples stored in museums and scientific collections (e.g. ^[15,41,42]) that may have been subjected to different cleaning protocols (if any). Therefore, historical bone samples may present variable lipid content as a result of incorrect or incomplete outer soft tissues/fat elimination ^[43], which would lead to biases in carbon isotope values. Therefore, accounting for lipids should be advisable even when dealing with previously recognized low fat bone species, such as sperm whales, *Physeter macrocephalus*, or fin whales, *Balaenoptera physalus* ^[23].

Carbon and nitrogen stable isotopes have been traditionally applied to determine food sources and habitat use of marine organisms ^[44,45]. In this context lipid biased carbon isotope values may add a potential bias when estimating the contribution of the different food sources to the diet of the predator ^[46]. Although some individual differences in $\delta^{13}\text{C}$ values observed after lipid extraction in the present work were not biologically significant (i.e. similar in magnitude to the analytical precision), an overall mean increase of 1.13‰ was observed (Table 1). This shift in $\delta^{13}\text{C}$ values should be ecologically meaningful depending on the questions being addressed. For example, mixing models used to infer the composition of predator's assimilated diet rely on accurate carbon and nitrogen isotopic discrimination factors ^[46] that, in the case of carbon, are usually in the range of ~1‰ ^[4,6]. The difference found in the present work related to lipid extraction is similar in magnitude to this typical trophic factor of discrimination, which highlights the importance of accounting for lipids while inferring diet composition by mixing models ^[46]. Furthermore, meaningful shifts in carbon

isotope values could pose a significant problem for interpreting habitat use and movements of marine organisms, especially while dealing with fine scale isoscapes^[47].

Chemically lipid extracted samples showed not significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ values with non-extracted samples. Similarly, Medeiros et al.^[48] did not observed an impact on marine turtle bone $\delta^{15}\text{N}$ values after lipid extraction using the same solvents (chloroform:methanol). This result is particularly encouraging as finding modified $\delta^{15}\text{N}$ values after lipid extraction would mean that separated runs for C and N (using lipid extracted and non-lipid extracted samples, respectively) would be necessary, duplicating laboratory work and costs^[26,27,49]. Other solvents used for lipid extraction such as dichloromethane:methanol^[50] or petroleum ether^[51] reported significant shifts in $\delta^{15}\text{N}$ values, probably be due to extraction of non-lipid polar molecules such as structural proteins^[52]. Therefore, results presented here should be valid at least for lipid extracted samples following Bligh & Dyer^[25] protocol using chloroform:methanol as solvent.

Despite being a widely used procedure in stable isotope analysis of bones and teeth (e.g.,^[12,34]), acidification was proved to have no effect on $\delta^{13}\text{C}$ values of beaked whale bones. Similar findings were reported for other species^[53,54]. Skipping this step in bone sample preparation for stable isotope analysis is recommended to reduce costs and time. Low levels of inorganic carbon were predicted for beaked whale bone samples based on the carbonate proxy proposed by Jacob et al.^[35]. This is the most likely cause of the lack of differences found between acidified and non-acidified samples. Since this could not necessarily be the case for other species or similar tissues like teeth, testing the potential effect of acidification in such other cases might prove necessary.

Furthermore, a significant interaction was found between lipid extraction and acidification for $\delta^{13}\text{C}$ but not for $\delta^{15}\text{N}$ values. Mintenbeck et al.^[26] also found a

significant interaction between those treatments, although being significant only for $\delta^{15}\text{N}$ values. This finding reinforces the given advice against the acidification of cetacean bone samples previous to stable isotope analysis, at least for the species tested here. However, the cause for this interaction remains unclear.

Mathematical lipid normalization

The linear relationship between $\Delta\delta^{13}\text{C}$ and C:N_{bulk} resulted in linear performing better than non-linear correction models for obtaining lipid-free $\delta^{13}\text{C}$ values for beaked whales bone samples, at least over the range of C:N_{bulk} values analyzed in the present work. Moreover, although a preference is given to species and tissue specific lipid normalization models ^[30,32] in the case of these cetacean's bone samples a general linear model proposed by Post et al. ^[24] had the best performance over the other published models tested. This model, however, was developed for samples with C:N up to 6.9 which represents a lipid content of around 30% ^[24]. In the present work, the maximum C:N value found was 8.9, for which the model still performed well. However, linear normalization models would not perform well for species whose bones present higher lipid content. Indeed, it was demonstrated that non-linear perform better than linear models when applied for lipid normalization of $\delta^{13}\text{C}$ values of tissues that potentially show high C:N values (i.e. $\text{C:N} > 7-8$) due to their high lipid content (e.g. cetacean skin ^[32] and bird eggs ^[33]). Therefore, the lipid normalization of carbon isotope values with the linear model proposed by Post et al. ^[24] applied for cetacean bone samples that had C:N values exceeding the range observed in the present work is not recommended without testing its efficiency.

CONCLUSIONS

Given the observed changes in $\delta^{13}\text{C}$ values after lipid extraction, we recommend to account for lipid content of beaked whale bones either through lipid extraction or through a posterior normalization of $\delta^{13}\text{C}$ values. If the latter option is chosen, then the utilization of simple linear models (e.g. ^[24]) is advised, at least for samples in the range of the C:N values observed here. Moreover, acidification seems to be an unnecessary step before stable isotope analysis for beaked whale and potentially other species bone samples. Given the scarcity of beaked whale samples and the information provided by stable isotope analysis of archived bone material, the development of sample preparation protocols is strongly recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to all researchers and volunteers from the ECOMEGA-IO-FURG especially to Elisa Seyboth for her advice in sample processing. Special thanks go to Yaqu Pacha Foundation and CAPES/AuxPe for the financial support to this work. The “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq” (Brazil) provided scholarships to E.R.S. (PQ 307846/2014-8) and A.C.C.T. S.B. is currently postdoctoral fellow (CAPES-PNPD Institucional 2931/2011). This article is part of A.C.C. Tatsch’s Master of Science Dissertation in Biological Oceanography (Graduation Course in Biological Oceanography - IO - FURG, RS, Brazil) under the supervision of S. Botta and E.R. Secchi and is a contribution of the research groups “Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha-EcoMega/CNPq” and “Grupo de Análises de Isótopos Estáveis em Ambientes Aquáticos (GAIA-FURG)”.

REFERENCES

- [1] J. Kojadinovic, P. Richard, M. Le Corre, R. P. Cosson, P. Bustamante. Effects of Lipid Extraction on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Values in Seabird Muscle, Liver and Feathers. *Waterbirds* **2008**, 31, 169.

- [2] L. Riccialdelli, S. D. Newsome, M. L. Fogel, R. N. P. Goodall. Isotopic assessment of prey and habitat preferences of a cetacean community in the southwestern South Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2010**, 418, 235.
- [3] S. Botta, A. A. Hohn, S. A. Macko, E. R. Secchi. Isotopic variation in delphinids from the subtropical western South Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **2012**, 92, 1689.
- [4] M. J. DeNiro, S. Epstein. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1978**, 42, 495.
- [5] M. J. DeNiro, S. Epstein. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1981**, 45, 341.
- [6] S. Caut, E. Angulo, F. Courchamp. Variation in discrimination factors ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$): The effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J. Appl. Ecol.* **2009**, 46, 443.
- [7] D. M. Post. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* **2002**, 83, 703.
- [8] R. L. France. Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae: foodweb implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, 124, 307.
- [9] K. A. Hobson. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia* **1999**, 120, 314.
- [10] R. R. Reeves, Conservation efforts, in *Encyclopedia of Marine Mammals*, (Eds: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen). Academic Press, **2009**, pp. 275–289.
- [11] S. Rossman, N. B. Barros, P. H. Ostrom, C. A. Stricker, A. A. Hohn, H. Gandhi, R. S. Wells. Retrospective analysis of bottlenose dolphin foraging: A legacy of anthropogenic ecosystem disturbance. *Mar. Mammal Sci.* **2013**, 29, 705.
- [12] L. Zenteno, E. Crespo, D. Vales, L. Silva, F. Saporiti, L. R. Oliveira, E. R. Secchi, M. Drago, A. Aguilar, L. Cardona. Dietary consistency of male South American sea lions (*Otaria flavescens*) in southern Brazil during three decades inferred from stable isotope analysis. *Mar. Biol.* **2014**, 162, 275.
- [13] M. C. Maas, Bones and teeth, histology of, in *Encyclopedia of Marine Mammals*, (Eds: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen). Academic Press, **2009**, pp. 124–129.
- [14] K. A. Hobson, J. L. Sease. Stable isotope analyses of tooth annuli reveal temporal dietary records: an example using steller sea lions. *Mar. Mammal Sci.* **1998**, 14, 116.

- [15] S. D. Newsome, M. A. Etnier, D. H. Monson, M. L. Fogel. Retrospective characterization of ontogenetic shifts in killer whale diets via $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of teeth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2009**, 374, 229.
- [16] P. L. Koch, Isotopic study of the biology of modern and fossil vertebrates, in *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. **2007**, pp. 99–154.
- [17] J. G. Mead, Beaked whales, overview: Ziphiidae, in *Encyclopedia of Marine Mammals*, (Eds: W.F. Perrin, B. Würsig, J.G.M. Thewissen). Academic Press, New York, **2009**, pp. 94–97.
- [18] M. Riofrío-Lazo, D. Aurióles-Gamboa. Timing of isotopic integration in marine mammal skull: Comparative study between calcified tissues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 1076.
- [19] M. DeNiro, S. Epstein. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science (80-.)*. **1977**, 197, 261.
- [20] B. J. Peterson, B. Fry. Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **1987**, 18, 293.
- [21] S. H. Ambrose. Preparation and characterization of bone and tooth collagen for isotopic analysis. *J. Archaeol. Sci.* **1990**, 17, 431.
- [22] S. A. Rommel, A. M. Costidis, A. Fernandez, P. D. Jepson, D. A. Pabst, D. S. Houser, T. W. Cranford, A. L. van Helden, D. M. Allen, N. B. Barros. Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. *J. Cetacean Res. Management* **2006**, 7, 189.
- [23] N. D. Higgs, C. T. S. Little, A. G. Glover. Bones as biofuel: a review of whale bone composition with implications for deep-sea biology and palaeoanthropology. *Proc. Biol. Sci.* **2010**, 278, 9.
- [24] D. M. Post, C. A. Layman, D. A. Arrington, G. Takimoto, J. Quattrochi, C. G. Montaña. Getting to the fat of the matter: Models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* **2007**, 152, 179.
- [25] E. G. Bligh, W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911.
- [26] K. Mintenbeck, T. Brey, U. Jacob, R. Knust, U. Struck. How to account for the lipid effect on carbon stable-isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$): Sample treatment effects and model bias. *J. Fish Biol.* **2008**, 72, 815.
- [27] C. Ryan, B. McHugh, C. N. Trueman, C. Harrod, S. D. Berrow, I. O'Connor. Accounting for the effects of lipids in stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values) analysis of skin and blubber of balaenopterid whales. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 2745.

- [28] J. C. Hoffman, T. T. Sutton. Lipid correction for carbon stable isotope analysis of deep-sea fishes. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **2010**, 57, 956.
- [29] T. Ingram, B. Matthews, C. Harrod, T. Stephens, J. Grey, R. Markel, A. Mazumder. Lipid extraction has little effect on the $\delta^{15}\text{N}$ of aquatic consumers. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2007**, 5, 338.
- [30] J. M. Logan, T. D. Jardine, T. J. Miller, S. E. Bunn, R. A. Cunjak, M. E. Lutcavage. Lipid corrections in carbon and nitrogen stable isotope analyses: Comparison of chemical extraction and modelling methods. *J. Anim. Ecol.* **2008**, 77, 838.
- [31] T. McConnaughey, C. P. McRoy. Food-Web structure and the fractionation of Carbon isotopes in the bering sea. *Mar. Biol.* **1979**, 53, 257.
- [32] V. Lesage, Y. Morin, È. Rioux, C. Pomerleau, S. H. Ferguson, É. Pelletier. Stable isotopes and trace elements as indicators of diet and habitat use in cetaceans: Predicting errors related to preservation, lipid extraction, and lipid normalization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2010**, 419, 249.
- [33] D. Ehrich, A. Tarroux, J. Stien, N. Lecomte, S. Killengreen, D. Berteaux, N. G. Yoccoz. Stable isotope analysis: Modelling lipid normalization for muscle and eggs from arctic mammals and birds. *Methods Ecol. Evol.* **2011**, 2, 66.
- [34] J. L. Walker, A. Macko. Dietary studies of marine mammals using stable carbon and nitrogen isotopic ratios of teeth. *Mar. Mammal Sci.* **1999**, 15, 314.
- [35] U. Jacob, K. Mintenbeck, T. Brey, R. Knust, K. Beyer. Stable isotope food web studies: A case for standardized sample treatment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2005**, 287, 251.
- [36] C. Pomerleau, G. Winkler, A. Sastri, R. J. Nelson, W. J. Williams. The effect of acidification and the combined effects of acidification/lipid extraction on carbon stable isotope ratios for sub-arctic and arctic marine zooplankton species. *Polar Biol.* **2014**, 37, 1541.
- [37] A. Knoff, A. Hohn, S. Macko. Ontogenetic diet changes in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) reflected through stable isotopes. *Mar. Mammal Sci.* **2008**, 24, 128.
- [38] M. Kiljunen, J. Grey, T. Sinisalo, C. Harrod, H. Immonen, R. I. Jones. A revised model for lipid-normalizing $\delta^{13}\text{C}$ values from aquatic organisms, with implications for isotope mixing models. *J. Appl. Ecol.* **2006**, 43, 1213.
- [39] D. G. Mayer, D. G. Butler. Statistical validation. *Ecol. Modell.* **1993**, 68, 21.
- [40] Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **2001**, 4, 9.

- [41] J. L. Walker, C. W. Potter, S. A. Macko. The diet of modern and historic bottlenose dolphin populations reflected through stable isotopes. *Mar. Mammal Sci.* **1999**, 15, 335.
- [42] A. D. Foote, J. Newton, M. C. Ávila-Arcos, M. Kampmann, J. A. Samaniego, K. Post, A. Rosing-Asvid, M. S. Sinding, M. T. P. Gilbert. Tracking niche variation over millennial timescales in sympatric killer whale lineages. *Proc. Biol. Sci.* **2013**, 280, 20131481.
- [43] E. Guilminot, G. Lemoine, C. Pelé, L. Poisson, M. Surbled, I. Louvet, J. Y. Mevellec, L. Rémy. Re-treatment of whale bones - How to extract degraded fats from weakened bones? *J. Cult. Herit.* **2014**, 15, 128.
- [44] A. Tilley, J. López-Angarita, J. R. Turner. Diet reconstruction and resource partitioning of a Caribbean marine mesopredator using stable isotope Bayesian modelling. *PLoS One* **2013**, 8, e79560.
- [45] S. Rossman, E. Berens McCabe, N. B. Barros, H. Gandhi, P. H. Ostrom, C. A. Stricker, R. S. Wells. Foraging habits in a generalist predator: Sex and age influence habitat selection and resource use among bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Mar. Mammal Sci.* **2014**, 1, 155.
- [46] A. Tarroux, D. Ehrich, N. Lecomte, T. D. Jardine, J. Bêty, D. Berteaux. Sensitivity of stable isotope mixing models to variation in isotopic ratios: evaluating consequences of lipid extraction. *Methods Ecol. Evol.* **2010**, 1, 231.
- [47] S. Rossman, P. H. Ostrom, M. Stolen, N. B. Barros, H. Gandhi, C. A. Stricker, R. S. Wells. Individual specialization in the foraging habits of female bottlenose dolphins living in a trophically diverse and habitat rich estuary. *Oecologia* **2015**, 178, 415.
- [48] L. Medeiros, D. da Silveira Monteiro, R. Petitet, L. Bugoni. Effects of lipid extraction on the isotopic values of sea turtle bone collagen. *Aquat. Biol.* **2015**, 23, 191.
- [49] O. E. Jansen, G. M. Aarts, K. Das, G. Lepoint, L. Michel, P. J. H. Reijnders. Feeding ecology of harbour porpoises: stable isotope analysis of carbon and nitrogen in muscle and bone. *Mar. Biol. Res.* **2012**, 8, 829.
- [50] B. A. Murry, J. M. Farrell, M. A. Teece, P. M. Smyntek. Effect of lipid extraction on the interpretation of fish community trophic relationships determined by stable carbon and nitrogen isotopes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2006**, 63, 2167.
- [51] K. H. Elliott, M. Davis, J. E. Elliott. Equations for lipid normalization of carbon stable isotope ratios in aquatic bird eggs. *PLoS One* **2014**, 9, e83597.
- [52] C. J. Sweeting, N. V. C. Polunin, S. Jennings. Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 595.

- [53] A. Borrell, N. Abad-Oliva, E. Gómez-Campos, J. Giménez, A. Aguilar. Discrimination of stable isotopes in fin whale tissues and application to diet assessment in cetaceans. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26, 1596.
- [54] A. M. Pinela, A. Borrell, A. Aguilar. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ stable isotope values in common dolphins (*Delphinus* spp.) worldwide, with particular emphasis on the eastern North Atlantic populations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, 29, 855.

Figure captions

Figure 1. Comparisons between bulk and chemical treatment conditions (Bulk, control; LE, lipid extracted; A, acidified; LEA, lipid extracted and acidified) for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of beaked whales (*Ziphiidae*) cranial bone samples. Bars and lines represent mean and confidence interval (95%), respectively. * Significant post-hoc test results (Tukey's HSD test).

Figure 2. Interaction between a priori chemical treatments, lipid extraction and acidification, for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for beaked whales (*Ziphiidae*) cranial bone samples. A factorial repeated measures analysis of variance indicated an interaction between acidification and lipid extraction factors for $\delta^{13}\text{C}$, but not for $\delta^{15}\text{N}$ values.

Figure 3. Difference between normalized $\delta^{13}\text{C}$ values and $\delta^{13}\text{C}$ values from bulk (non-lipid extracted) cranial bone samples of 13 beaked whale (*Ziphiidae*) specimens ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) plotted against the ratio of carbon:nitrogen measured in bulk samples (C:N_{bulk}). Lines represent the linear (white symbols) and nonlinear (grey symbols) normalization equations. Black symbols represent $\Delta\delta^{13}\text{C}$ values obtained from the difference between chemically lipid extracted and bulk samples against C:N_{bulk} . Model Efficiency (EF) values are shown.

Table 1. Mean ($\pm$ SD) $\delta^{13}\text{C}$, $\Delta\delta^{13}\text{C}$ (difference in $\delta^{13}\text{C}$ between treated and bulk bone samples), $\delta^{15}\text{N}$, $\Delta\delta^{15}\text{N}$ (difference in $\delta^{15}\text{N}$ between treated and bulk bone samples) and C:N ratio for beaked whales (Ziphiidae) cranial bone samples under four pre-stable isotope analysis conditions: Bulk, control; LE, lipid extracted; A, acidified; LEA, lipid extracted and acidified.

Treatments	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\Delta\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\Delta\delta^{15}\text{N}$	C:N
Bulk	-18.0 ± 2.9		13.6 ± 1.4		4.61 ± 1.6
LE	-16.8 ± 2.5	1.1 ± 1.6	13.8 ± 1.4	0.2 ± 0.7	3.84 ± 0.3
A	-17.8 ± 2.8	0.2 ± 0.4	13.6 ± 1.3	0.1 ± 0.9	4.45 ± 1.6
LEA	-16.9 ± 2.6	1.0 ± 1.7	13.3 ± 1.5	-0.2 ± 1.2	3.72 ± 0.3

Table 2. Mean ($\pm$ SD) of lipid extracted ($\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$) and normalized $\delta^{13}\text{C}$ values ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MX}}$) obtained from linear and non-linear models (M1 to M5) for beaked whales (Ziphiidae) cranial bone samples. Model accuracy is indicated as the R^2 and EF values of the relationship between $\delta^{13}\text{C}_{\text{MX}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{LEA}}$ individual values. $p < 0.001$ for all correlations. Mean ($\pm$ SD) value for $\delta^{13}\text{C}_{\text{LE}}$ is -16.8 ± 2.5 ‰.

Lipid normalization models	$\delta^{13}\text{C}_{\text{M}}$ (‰)	R^2	EF
Present work – M5	-16.9 ± 2.8	0.99	0.97
Post et al. (2007) – M4	-16.7 ± 2.8	0.99	0.97
Lesage et al. (2010) – M3	-16.3 ± 2.9	0.93	0.86
McConnaughey & Mc Roy (1979) - M1	-17.7 ± 2.9	0.92	0.77
Kiljunen et al. (2006) – M2	-15.9 ± 2.9	0.94	0.75

Figure 1.

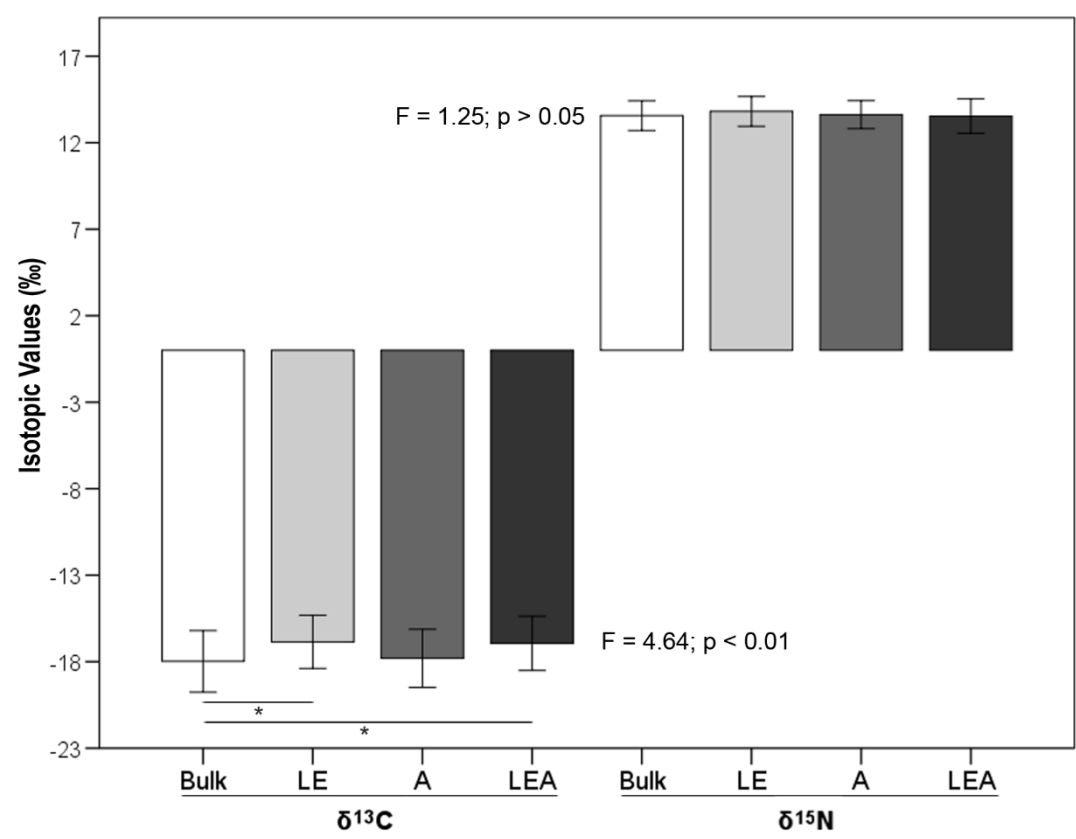


Figure 2.

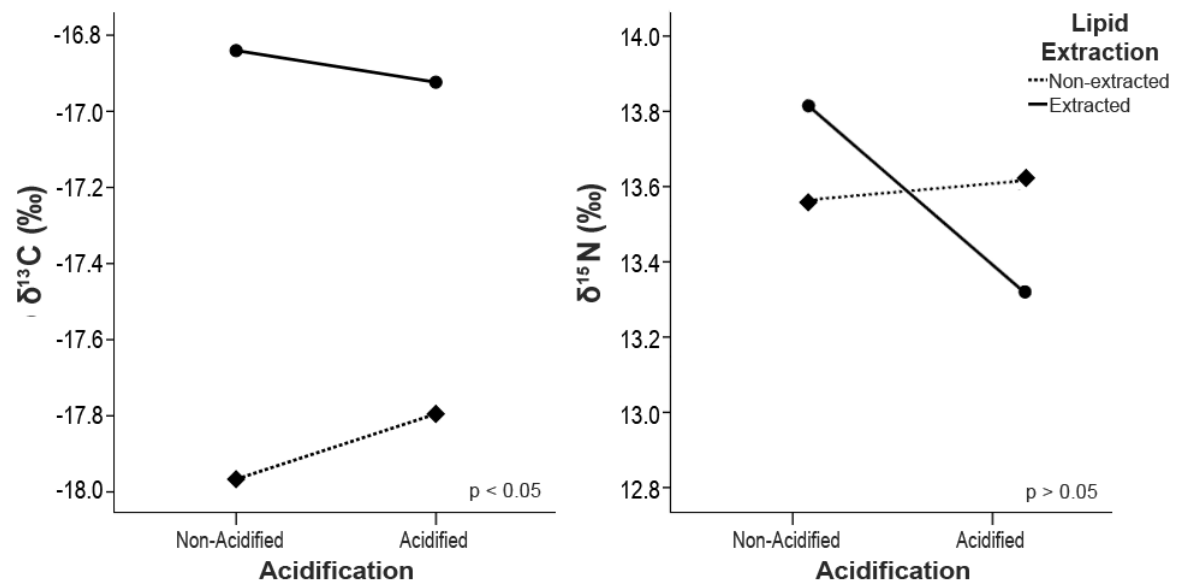


Figure 3.

