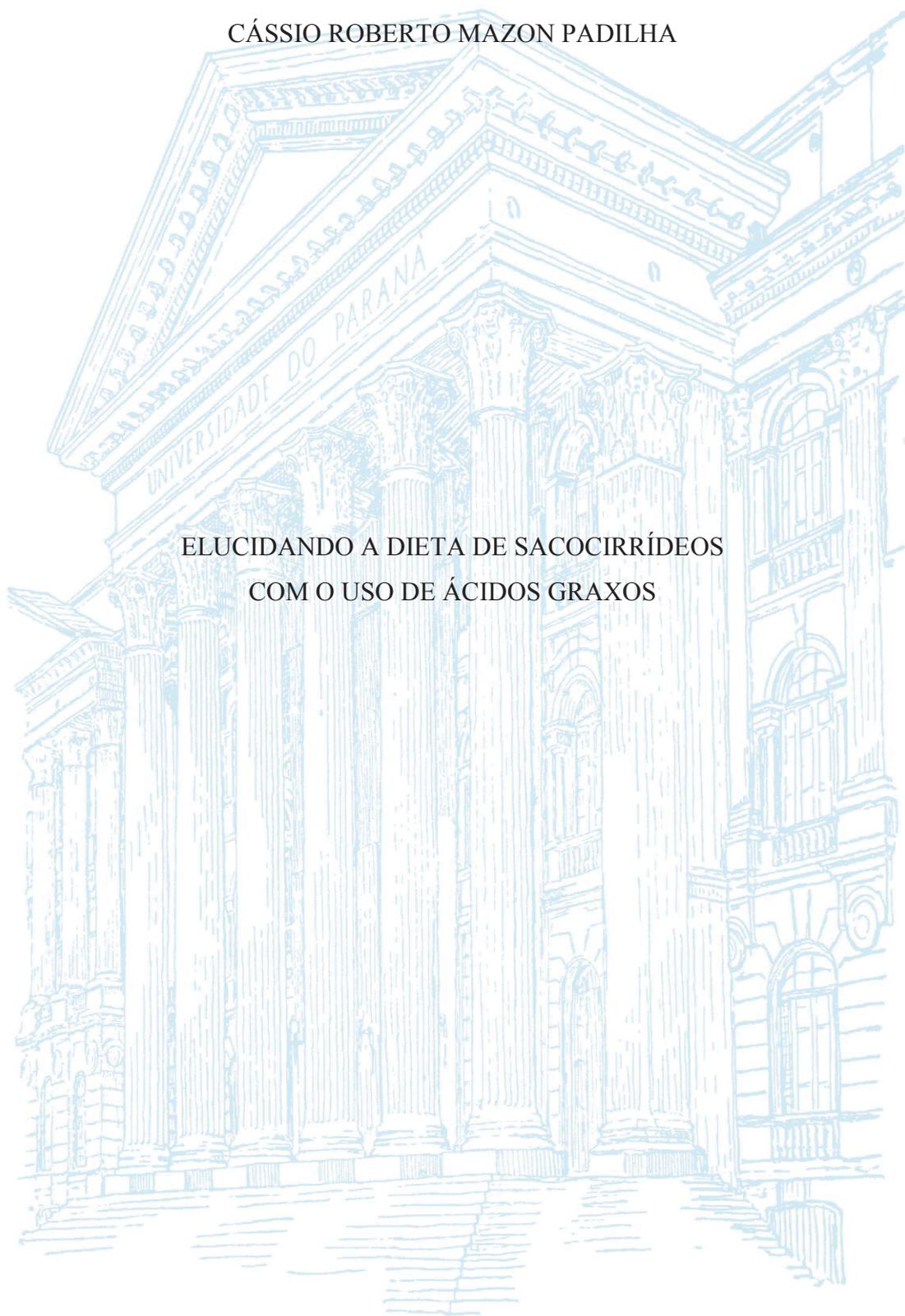


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CÁSSIO ROBERTO MAZON PADILHA

ELUCIDANDO A DIETA DE SACOCIRRÍDEOS
COM O USO DE ÁCIDOS GRAXOS



PONTAL DO PARANÁ

2019

CÁSSIO ROBERTO MAZON PADILHA

ELUCIDANDO A DIETA DE SACOCIRRÍDEOS
COM O USO DE ÁCIDOS GRAXOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, no curso de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos do Centro de Estudos do Mar, Campus Pontal do Paraná, vinculado à Reitoria da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Maikon Di Domenico

PONTAL DO PARANÁ

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar
Fernanda Pigozzi – CRB 9/1151

P123e Padilha, Cássio Roberto Mazon
Elucidando a dieta de sacocirrídeos com o uso de ácidos graxos. / Cássio Roberto Mazon Padilha. – Pontal do Paraná, 2019.
36 f.: il.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Maikon Di Domenico.
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Sandrini.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor Reitoria, Universidade Federal do Paraná.

1. Anelídeo. 2. Ácidos graxos. I. Título. II. Di Domenico, Maikon. III. Sandrini, Leonardo. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDD 592.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR REITORIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SISTEMAS COSTEIROS
E OCEÂNICOS - 40001016054P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **CÁSSIO ROBERTO MAZON PADILHA** intitulada: **Elucidando a dieta de sacocirrídeos através de ácidos graxos**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua A PROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Pontal do Paraná, 21 de Março de 2019.

MAIKON DI DOMENICO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RENATO DA SILVA CARREIRA

Avaliador Externo (PUC-RIO)

LEONARDO SANDRINI NETO

Avaliador Interno (UFPR)

RESUMO

São conhecidas duas espécies de sacocirrídeos na costa brasileira, as quais apresentam características morfológicas distintas, uma com faringe muscular, *Pharyngocirrus gabriellae*, e outra sem, *Saccocirrus pussicus*. Devido a essa diferença, esperamos que as duas espécies possuam preferências alimentares distintas. Nesse trabalho extraímos e analisamos os perfis de ácidos graxos de indivíduos das duas espécies coletados em diferentes locais da costa brasileira, e os comparamos com os perfis de ácidos graxos de outras espécies, de forma a elucidar as preferências em suas respectivas dietas. As comparações foram realizadas com análise de correspondência, onde cada espécie de cada localidade foi tratado como objeto e a frequência relativa dos ácidos graxos com descritores. Não foram detectados padrões distintos entre as dietas das duas espécies. A produção primária local foi a variável com maior correlação com os perfis de ácidos graxos. Os ácidos palmítico (C16), esteárico (C18) e margárico (C17), foram os mais frequentes nas duas espécies. Estes ácidos e suas proporções podem ser indicadores das diferenças nas preferências alimentares dos dois grupos de sacocirrídeos.

Palavras-chave: Sacocirrídeos, Perfil de Ácidos Graxos, Preferências Alimentares

ABSTRACT

Two species of saccocirrids are known from the Brazilian coast, both which are morphologically different, *Pharyngocirrus gabriellae* having a muscular pharynx, while *Saccocirrus pussicus* doesn't have one. Because of this difference, it is believed that both species possess different feeding preferences. In this study we extracted and analyzed the fatty acid profiles from individuals from the two species collected in different coastal locations, and compared them to fatty acid profiles of other species to elucidate the preferences in their respective diets. The comparisons were done by means of correspondence analysis, where each species in each locality was treated as an object and the relative frequency of the acids as descriptors. As a result, we verify larger frequency and quantity in the palmitic (C16), stearic (C18) and margaric (C17) acids, respectively. These acids and their proportions might be proxys of the differences in the feeding preferences from both groups of saccocirrids, since it is possible to make conjectures based on the known sources of the lipids in question.

Keywords: Saccocirrids, Fatty Acid Profiles, Feeding Preferences

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	METODOLOGIA.....	11
2.1	COLETA DE AMOSTRAS.....	11
2.2	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	14
2.3	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	15
2.4	ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	15
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
3	RESULTADOS.....	17
4	DISCUSSÃO.....	24
5	REFERÊNCIAS.....	27
	ANEXO 1 – QUADRO DE PARÂMETROS DE CONFIGURAÇÃO DO	
	CROMATÓGRAFO GASOSO.....	36

1 INTRODUÇÃO

São reconhecidos sete déficits globais do conhecimento de biodiversidade: identidade de espécie, distribuição específica, abundância específica, traços biológicos, história evolucionária, interações biológicas e requerimentos ambientais (Hortal et al. 2015). Uma vez que sacocirrídeos são considerados espécies intersticiais e meiofaunais, avançar no conhecimento desses déficits em animais pequenos de sedimentos marinhos pode ser desafiador, e exige técnicas de análises microscópicas e moleculares (Fonseca et al. 2017). Nesse trabalho, usaremos a família Saccocirridae, que possui estruturas associadas a alimentação distintas entre seus gêneros e espécies, como um modelo biológico-evolutivo para abordar o déficit ‘*Raunkiaeran*’, definido como a falta de conhecimento sobre traços ecologicamente relevantes sobre as espécies (Hortal et al. 2015). Esta lacuna de conhecimento trata não somente das variações intra (Kingsolver et al., 2001) e interespecíficas (Roy & Foote, 1997), como também a função ecológica resultante da presença de um traço funcional e de como estas funções são afetadas por interações com outros traços, e como essas interações funcionam em conjunto para executar funções ecossistêmicas específicas (Díaz et al. 2013, Hortal et al. 2015). Especialmente nos espaços intersticiais dos sedimentos marinhos, entender as funções ecológicas das suas diversas espécies exige o uso integrado de metodologias morfológicas e moleculares que permitam acessar a biodiversidade da meiofauna ao mesmo tempo que descrevam as regras biológicas gerais associadas as suas história de vida (Zeppilli et al. ,2015; Schratzberger and Ingels, 2017).

A família Saccocirridae Czerniavsky 1881, usada nesse trabalho como modelo biológico-evolutivo dos ambientes intersticiais, pertence ao filo Annelida, e consiste em 22 espécies pertencentes aos gêneros *Saccocirrus* Bobretzky 1872 e *Pharyngocirrus* Di Domenico, Martínez, Lana e Worsaae 2014 (Di Domenico *et al.*, 2014b). Duas espécies de sacocirrídeos são conhecidas na costa brasileira, *Pharyngocirrus gabriellae* (Du Bois Reymond Marcus, 1946, Di Domenico et al. 2014b, c), originalmente descrito como *Saccocirrus gabriellae*, e recentemente reclassificado em um novo gênero (*Pharyngocirrus*) (Di Domenico et al. 2014b), e *Saccocirrus pussicus* (Du Bois-Reymond Marcus, 1948, Di Domenico et al., 2014a, b, c). Ambas as espécies já foram registradas no Brasil no Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro (Di Domenico et al. 2014c; Omena et al. 2012). A família também foi registrada nas praias do Uruguai (Rodriguez et al. 2013). Sacocirrídeos são intersticiais e normalmente habitam areias grossas. *Pharyngocirrus* spp. são encontrados em

regiões entremarés ou submareais em áreas embainhadas, enquanto *Saccocirrus* spp. são encontrados no entremarés de praias oceânicas expostas (Di Domenico et al., 2014).

Os palpos apresentam maior funcionabilidade na alimentação em *Saccocirrus*, especificamente em *S. pussicus* encontrados em praias expostas (Di Domenico et al., 2014a), enquanto que *Pharyngocirrus* parecem usar sua ciliação ventral para sugar o alimento (Di Domenico et al., 2014b). As espécies do gênero *Pharyngocirrus* com ciliação ventral são, geralmente, herbívoras. A faringe muscular e dotada de um divertículo, parece possuir funções mecânicas de esmagamento e seleção. No entanto, grandes partículas de diatomáceas podem ser notadas no estômago dos espécimes, de forma que o papel exato da faringe no processo digestivo permanece incerto (Gray, 1969, Brown, 1981). Além de material fragmentado, incluindo bactérias, algas e diatomáceas, já foram encontrados tratos estomacais de *P. alanhongi* contendo copépodes e foraminíferos (Bailey-Brock et al. 2003), indicando que as espécies com faringe e ciliação ventral não são estritamente herbívoras.

Saccocirrus foram descritos como sendo muito ativos e carnívoros, se alimentando de espécimes menores da metazoários na areia (Rao & Ganapati, 1968). Tratos digestórios de *S. oahuensis* já foram descritos contendo foraminíferos, dos quais um exemplar medido era maior do que a metade do diâmetro do próprio saccocirrídeo, sugerindo que a capacidade de abertura da boca deve ser grande (Bailey-Brock et al., 2003).

Estudar individualmente a função ecológica de cada espécie de anelídeo é pouco eficiente. Jumars & Fauchald (1977, 1979, 2005) usaram a morfologia e a identidade taxonômica (famílias ou subgrupos dentro de famílias) de anelídeos para agrupar guildas funcionais (grupos de espécies que utilizam os mesmos recursos de modos similares). Estas guildas se basearam nos modos de alimentação (comedores de depósitos subsuperficiais, carnívoros, filtradores, herbívoros ou comedores de depósitos superficiais), motilidade (móveis, discretamente móveis ou sésseis), e estruturas alimentares (mandíbula, sucção, tentáculos ou outros). Esta classificação tem sido amplamente usada, principalmente como uma tabela de referência de funções tróficas de acordo com a identidade taxonômica. No caso da família Saccocirridae, vários autores definem dois grupos distintos de saccocirrídeos: membros do grupo representado por *Saccocirrus pussicus* (Figura 1) que possuem gônadas pareadas e a ausência de um órgão faringeal muscular e de cílios ventrais, enquanto os representados por *Pharyngocirrus gabriellae* (Figura 2) apresentam uma gônada não pareada, órgão faringeal muscular e cílios ventrais (Brown 1981, Bailey-Brock et al. 2003, Di Domenico et al. 2014c).

FIGURA 1: REGISTRO MICROSCÓPICO DE EXEMPLAR MACHO DE *SACCOCIRRUS PUSSICUS*, VISTA DORSAL DO ESPÉCIME INTEIRO E DA EXTREMIDADE ANTERIOR



FONTE: Adaptado de Di Domenico et al (2014)

FIGURA 2: REGISTRO MICROSCÓPICO DE EXEMPLAR JUVENIL DE *PHARYNGOCIRRUS GABRIELLAE*, VISTA DORSAL



FONTE: Adaptado de Di Domenico et al (2014)

Embora bem definidos no esquema de guildas no que diz respeito a motilidade e estruturas alimentares, os modos alimentares dos dois grupos ainda são suposições fundamentadas nas características morfológicas, sem dados específicos das suas dietas. Nesse trabalho, utilizamos a análise do conteúdo lipídico das duas espécies para encontrar uma

definição mais clara no que diz respeito à preferência de alimento. A literatura afirma que ambos os morfotipos são pequenos e dependem de material lábil. Ambos são capazes de alimentação superficial com os palpos ou diretamente com a boca, e de agarrar partículas de material suspenso com os palpos. Sugere-se que *Pharyngocirrus* spp. são mais herbívoras enquanto *Saccocirrus* spp. são mais carnívoras, mas provavelmente há sobreposição nas dietas (Jumars et al, 2005). *S. pussicus* são mais restritos a praia reflectivas, embora a preferência por zonas hidrodinâmicas (swash ou zona de surf) tenha apresentado dependência temporal, mostrando correlações com outros fatores, como ondas, inclinação, porcentagem carbonática (Di Domenico et al., 2014).

A análise de ácidos graxos é uma entre diversas metodologias que permitem entender o papel dos animais na cadeia trófica (De Troch et al., 2012; Guilini et al., 2013; Iken et al., 2001). Em contraste com análises de conteúdo estomacal, cujos resultados refletem atividade alimentar recente (segundos – horas), a investigação dos ácidos graxos nos permite acessar as fontes alimentares em um âmbito temporal mais extenso (semanas – meses), uma vez que se mesuram os nutrientes assimilados no tecido animal. Esta informação de longo prazo é essencial para entender os níveis tróficos em teias alimentares marinhas (Dalsgaard et al., 2003). O conceito de ácidos graxos como marcadores tróficos é baseado no fato de que cada grupo de organismos (ex.: bactérias, diatomáceas, dinoflagelados, zooplankton) apresentam conjuntos específicos de ácidos graxos que podem ser transferidos conservativamente, e portanto, podem ser reconhecidos nos tecidos de seus predadores seguindo a teia trófica. (Bergé e Barnathan, 2005; Dalsgaard et al., 2003). Aplicações desses tipos de biomarcadores assumem que produtores primários possuem ‘assinaturas’ relativamente consistentes, que podem ser traçadas níveis tróficos acima, uma vez que quando incorporadas pelos consumidores, estas assinaturas não variam, ou variam de formas previsíveis (Fry, 2007).

Os dois morfotipos sobrevivem de material suspenso e em decomposição. Ambos são onívoros, no entanto *Pharyngocirrus* spp. apresentam tendência à herbivoria enquanto *Saccocirrus* spp. apresentam tendência à carnivoria (Gray, 1969, Brown, 1981).

Os ácidos 20:4n-6 (ARA), 20:5n-3 (EPA) e 22:6n-3 (DHA) são conhecidos como ácidos graxos essenciais (EFAs) (Arts et al., 2001). Os ácidos com cadeias de carbono de número ímpar e ramificações iso- e anteiso- são associados a bactérias (BAFAs) e detritos (Harvey, 1994; Budge and Parrish, 1998), enquanto 18:2n-6 e 18:3n-3 são indicadores de plantas terrestres (Dalsgaard et al., 2003). Os ácidos graxos 16:1n-7 e a predominância de EPA são marcadores comuns de diatomáceas, enquanto o DHA é predominante em dinoflagelados (Parrish et al.,

2000; Dalsgaard et al., 2003). A concentração de DHA depende das espécies de fitoplâncton presentes, e portanto, não pode ser utilizada singularmente como um marcador de dinoflagelados, e portanto é utilizado em conjunto com a razão DHA/EPA, que reflete a predominância de dinoflagelados versus diatomáceas (Budge and Parrish, 1998; Reuss and Poulsen, 2002).

Propomos o uso dos ácidos graxos como marcadores qualitativos para traçar ou confirmar a relação presa-predador dos gêneros de Saccocirridae (Jumars *et al.*, 2015, Dalsgaard *et al.*, 2003). A intenção deste estudo é testar a hipótese de que há diferença nas tendências alimentares de *Pharyngocirrus gabriellae* e *Saccocirrus pussicus* e esta pode ser observada nos perfis de ácido graxo dos espécimes através das diferenças nas quantidades de ácidos graxos cujas fontes são conhecidas. Espera-se que o teor lipídico de *Pharyngocirrus* apresente predominância de ácidos graxos provenientes de diatomáceas e dinoflagelados, enquanto o perfil lipídico de *Saccocirrus* deve apresentar origem majoritariamente zooplanctônica e detritica/bacterial.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletados sedimentos para posterior separação dos espécimes em laboratório. Os locais de coleta foram escolhidos com base em amostragens e trabalhos pretéritos que confirmam a presença de Saccocirridae (Di Domenico et al., 2014, Omena et al., 2012). Distribuídos ao longo de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro, foram 5 locais para *Saccocirrus* e 7 locais para *Pharyngocirrus* (FIGURAS 3 e 4). Sobre cada local amostrado também foram reunidas a partir de descrições previamente existentes na literatura informações sobre características granulométricas e de energia de ondas. Para estimativas de produção primária dos locais de amostragem, utilizou-se valores de concentração média em profundidade mínima obtidos a partir das imagens disponíveis no site Bio-ORACLE (Tyberghein L, Verbruggen H, Pauly K, Troupin C, Mineur F, De Clerck O, 2012).

FIGURA 3: MAPA DO TERRITÓRIO BRASILEIRO. ESTADOS ONDE FORAM REALIZADAS AS COLETAS DESTACADOS EM CINZA.



FIGURA 4: LOCALIZAÇÕES APROXIMADAS DOS PONTOS DE COLETA NAS REGIÕES COSTEIRAS DE CADA ESTADO

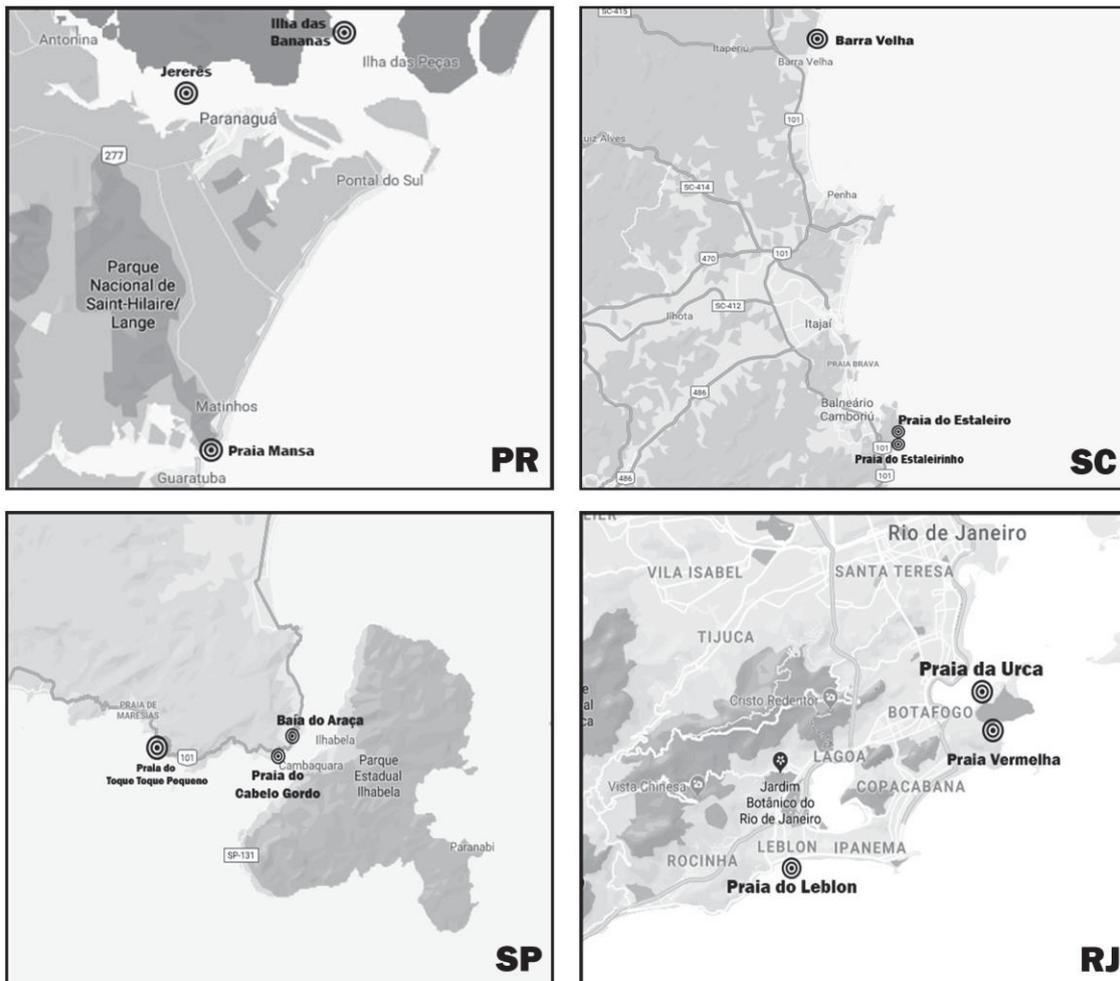


TABELA 1 - DESCRIÇÃO AMBIENTAL DAS LOCALIDADES AMOSTRADOS INDICANDO SUA POSIÇÃO GEOGRÁFICA, ESPÉCIE COLETADA NO LOCAL, DATA DE COLETA, CARACTERIZAÇÃO ENERGÉTICA MARINHA, ESTIMATIVA DE PRODUÇÃO PRIMÁRIA E CARACTERÍSTICAS GRANULOMÉTRICAS.

UF	Local	Coordenadas	Espécie	Caracterização energética marinha	Produção Primária (Concentração média em profundidade de mínima)	Tamanho médio de grão	Origem Sedimento	Data da Coleta
PR	Ilha de Jererê de Fora	25°29'02.4"S 48°34'53.7"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Baixa	0.0053	Fino	Marinho e Fluvial	Mai 2017
	Praia Mansa	25°50'58.4"S 48°32'12.9"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Média	0.106	Médio	Marinho	Mai 2017
	Ilha das Bananas	25°25'19.4"S 48°24'24.7"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Baixa	0.0053	Grosso	Marinho e Fluvial	Mai 2017
SC	Praia do Estaleiro	27°01'35.6"S 48°34'49.7"W	<i>Saccocirrus pussicus</i>	Alta	0.106	Médio	Marinho	Out 2017
	Praia do Estaleirinho	27°03'03.8"S 48°35'14.3"W	<i>Saccocirrus pussicus</i>	Alta	0.106	Médio	Marinho	Out 2017
	Barra Velha	26°36'49.4"S 48°40'36.6"W	<i>Saccocirrus pussicus</i>	Alta	0.256	Grosso	Marinho	Out 2017
SP	Praia de Toque Toque Pequeno	23°49'09.1"S 45°32'04.4"W	<i>Saccocirrus pussicus</i>	Alta	0.256	Médio	Marinho	Jun 2018
	Praia do Cabelo Gordo	23°49'40.6"S 45°25'22.0"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Média	0.256	Médio	Marinho	Jun 2018
	Praia Baía do Araça	23°48'47.2"S 45°24'31.9"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Baixa	0.256	Fino	Marinho	Jun 2018
RJ	Praia Vermelha	22°57'19.0"S 43°09'53.0"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Alta	0.256	Médio	Marinho	Set 2018
	Praia da Urca	22°56'52.4"S 43°09'48.4"W	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>	Baixa	0.256	Fino	Marinho	Set 2018
	Praia do Leblon	22°59'15.6"S 43°13'18.0"W	<i>Saccocirrus pussicus</i>	Alta	0.256	Médio	Marinho	Set 2018

O sedimento foi coletado com auxílio de baldes e pá. As amostras foram recolhidas todas ao longo da zona entre-marés. As porções de sedimento com volumes de $\frac{1}{4}$ do tamanho total do balde foram acondicionadas com água do mar do local para posterior triagem dos espécimes (Di Domenico *et al.*, 2014a).

Após a coleta, para extrair os sacocirrídeos dos sedimentos, utilizou-se solução isotônica de $MgCl_2$, seguindo metodologia proposta por Higgins e Thiel (1988). Para a extração de ácidos graxos, o máximo possível de indivíduos de cada ponto foi extraído e separado com pinças e agulhas estéreis. Alguns pontos permitiram a coleta de perto de um milhar de indivíduos, enquanto em outros foram em torno de 100. Após a separação os animais foram acondicionados em eppendorfs com volumes em torno de 3 ml de água e congelados. Para preparação da amostra para a esterificação, foi utilizado um liofilizador para secar completamente cada amostra para transporte.

2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

As amostras liofilizadas foram pesadas e maceradas e colocadas em tubos de teflon descontaminados. Foi preparada uma solução de extração 2:1 diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) e adicionou-se 5 mL a cada tubo. Acrescentou-se o ácido eicosanóico (C19-FAME) como padrão sub-rogado para a análise de ácidos graxos. Os tubos então passaram por banhos de ultrassom de 15 minutos seguidos de 4 minutos de centrifugação a 3000 rpm, processo este que foi repetido 4 vezes. Ao fim de cada centrifugação foi extraído o sobrenadante via pipeta pasteur, deixando apenas o extrato concentrado no fundo de cada tubo. Este extrato foi transferido a um balão de fundo plano para recuperação do solvente no rotoevaporador Buchi, de forma que 1 mL da amostra resultante foi transferido a vials individuais de 8 mL e reduzido sobre fluxo suave de N_2 .

Para a saponificação, adicionou-se 3 mL de solução KOH em metanol aquoso (0,1 M \rightarrow 5,63 g L^{-1} em MeOH:H₂O 9:1) para dissolução do extrato. Os vials então foram novamente colocados sob fluxo de N_2 por aproximadamente 1 minuto. A seguir, os mesmos foram levados a aquecimento em uma placa a 85 °C por 2 horas. Na sequência, os extratos foram resfriados em 10 minutos de banho de gelo para parar a reação. A seguir, as amostras foram extraídas 3 vezes com 2 mL de hexano e agitadas em vortex por cerca de 1 minuto e depois deixadas imóveis por 30 minutos para separar as fases em duas camadas. A fração neutra (camada superior) foi então transferida para um vial limpo de 8 mL. A camada inferior do extrato contendo os ácidos, como sais de K^+ , foi armazenada no freezer até as etapas de acidificação, metilação e fracionamento dos ácidos graxos.

Na etapa de acidificação, acidificou-se a fase aquosa no próprio tubo de saponificação através da adição de 2mL de HCl 3M. Após deixar esfriar, repetiu-se o processo de adição de 2 mL de hexano, agitação no vortex e espera para a separação de fases, por 3 vezes. A camada superior foi novamente pipetada a um vial de 8 mL, enquanto o extrato orgânico foi reduzido a aproximadamente 1 mL em fluxo suave de N_2 e rearmazenado no freezer.

A seguir, na etapa de metilação da fração ácida, adicionou-se 2 mL de BF₃-MeOH (3%) à fração resultante e misturou-se novamente através de vortex, sendo deixado 1 minuto sob o fluxo de N_2 na sequência. Após, a amostra foi aquecida a 85° C por 1 hora, e a seguir resfriada em banho de gelo. Então, o processo de extração com hexano (adicionar 2 mL, agitar

e separar a fase orgânica 3 vezes) foi repetido, e o volume do extrato foi reduzido sob fluxo suave de N₂ a aproximadamente 1 mL e armazenado no freezer.

Por fim, na última etapa, montou-se uma coluna de *cleanup* utilizando sílica ativada a 120° C e sulfato de sódio dentro de uma pipeta. Na ponta da pipeta, foi colocado lã de vidro descontaminada seguida de 4 cm de suspensão de sílica em hexano e 0.5 cm de sulfato de sódio. A amostra foi então eluída na coluna com aproximadamente 3 mL de diclorometano, cada uma para um vial de 4 mL. Reduziu-se o volume do extrato final sob fluxo suave de N₂ até aproximadamente 1 mL e armazenou-se o resultante no freezer até o momento de injeção no cromatógrafo.

2.3 CROMATOGRAFIA GASOSA

Antes da injeção, os extratos metilados foram levados à secagem sob fluxo de nitrogênio, reeluídos em 100 µL de n-hexano e neles adicionados 2500 ng de C24-d como Padrão. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio da injeção de padrões certificados (FAME 37 Mix da Supelco) para verificação do tempo de retenção de cada composto. As condições cromatográficas e configurações da rampa de temperatura do forno são descritas no ANEXO 1.

2.4 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS

A quantidade e composição dos ácidos graxos para cada ponto de coleta foram comparados através dos cromatogramas resultantes. Cada ácido graxo foi medido quantitativamente em nanogramas de ácido graxo/grama de massa seca e também como proporção do número total de ácidos graxos identificados em cada amostra (%TFA).

Através de agrupamentos dos ácidos graxos cujas fontes são conhecidas de acordo com a Tabela 2, foram criados índices para simplificar a representação das contribuições que podem ser interpretadas como originárias de diatomáceas, dinoflagelados, zooplâncton e bactérias e detritos.

TABELA 2 – RELAÇÃO DE TIPOS ESPECÍFICOS E PROPORÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS UTILIZADOS COMO ÍNDICES PARA DETERMINAÇÃO DE ORIGENS ALIMENTARES RETIRADOS DA LITERATURA

Ácidos Graxos	Fontes	Referências
20:5(n-3)–EPA 16:1 16:1(n-7)/16:0 > 1 22:6(n-3)/20:5(n-3) < 1	Diatomáceas	Budge and Parrish (1998), Dunstan et al. (1994), Dalsgaard et al. (2003)
22:6(n-3)/20:5(n-3) > 1 16:0 18:5(n-3) 18:4(n-3) 22:6 (n-3)–DHA	Dinoflagelados	Budge and Parrish (1998), Mansour et al. (1999), Dalsgaard et al. (2003)
18:1 (n-9) 18:2 (n-6) 20:4 (n-6)–ARA 22:6 (n-3)–DHA	Zooplankton	Kharlamenko et al. (2001), Zhukova and Kharlamenko (1999)
∑ Iso- and anteiso-C15 and C17 18:1(n-7)	Detritos / Bactérias	Mayzaud et al. (1989), Najdek et al. (2002)

Cada índice foi criado a partir da somatória dos valores dos ácidos graxos respectivos a cada grupo. As proporções que servem como indicadoras não entraram diretamente nos índices, mas foram levadas em conta para se analisar os resultados. Por fim, criaram-se dois índices gerais através da soma de pares dos índices anteriores de acordo com as tendências alimentares investigadas nesse estudo, de forma que resumiu-se em um índice a contribuição de diatomáceas e dinoflagelados e a outro a contribuição de zooplâncton, detritos e bactérias.

Estes índices também foram aplicados aos outros perfis levantados da literatura para comparação e interpretação de tendências alimentares.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para acessar a hipótese de que a alimentação das duas espécies é diferente independentemente da localização geográfica, foram comparados entre si os perfis de ácidos graxos das duas espécies de sacocirrídeos coletados em cada ponto. Os perfis resultantes das coletas também foram comparados com perfis de ácidos graxos dos outros animais marinhos. As comparações dos perfis foram executadas com análises de correspondência (CA). A CA

provê uma representação gráfica da correspondência entre as linhas e colunas de uma tabela de contingência, onde as linhas foram tratadas como objetos, as espécies em cada ponto amostral; e as colunas como descritores, as frequências relativas dos ácidos graxos. As análises foram realizadas dentro do ambiente R, através do pacote *FactoMineR* (SEBASTIEN, L. JOSSE, J. HUSSON, F., 2008) de análise exploratória multivariada de dados.

Para interpretação dos dados, outros fatores qualitativos levantados a partir de descrições prévias foram levados em conta, principalmente a granulometria de cada local amostrado. Perfis de ácidos graxos de outros grupos marinhos foram obtidos via levantamento da literatura pré-existente através das principais plataformas de busca de artigos científicos: Scopus, Web of Science e Google Acadêmico. Estes perfis foram utilizados para comparação com os perfis resultantes das análises e para a identificação de itens de dieta específicos, além de tendências alimentares, como herbivoria ou carnivoria.

Para testar se as dietas podem ser explicadas pelas espécies ou pelas variáveis ambientais uma análise de variância multivariada permutacional foi aplicada à matriz de frequência relativa dos perfis dos ácidos graxos. Foram usadas como preditores as espécies, granulometria, a caracterização hidrodinâmica energética, latitude e longitude e máximos de clorofila-a. As análises foram executadas com a função *adonis* no pacote *vegan*, e os dados foram previamente normalizados com a função *deconstand*, método “normalize”.

3 RESULTADOS

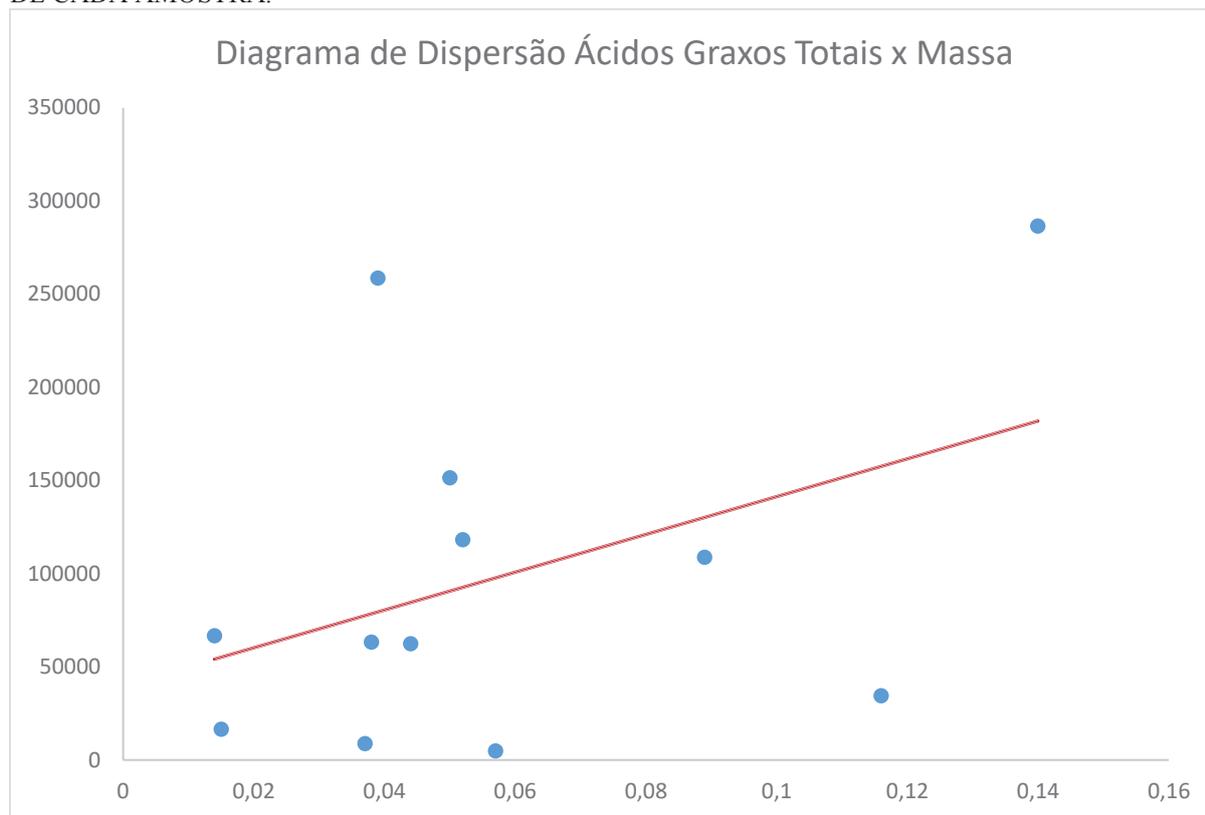
Em ambas as espécies os ácidos graxos encontrados em maior quantidade foram os saturados C16 e o C18, respectivamente. Enquanto C16 compõe a maior fração de todos os *P. gabriellae* (Tabela 3) menos uma amostra da Praia Vermelha (RJ), para os *S. pussicus* a fração de C18 foi a maior em mais da metade das amostras. C17 foi encontrado em quantidades intermediárias similares para as duas espécies, com exceção dos *Pharyngocirrus* da Praia Vermelha (RJ) e Araçá (SP) e dos *Saccocirrus* de Toque Toque Pequeno (SP), casos em que o C17 representou frações tão grandes quanto o C16 e C18. Estas três amostras e mais a da praia do Cabelo Gordo (SP) possuem em comum os menores valores de ácidos graxos totais e a menor variedade de ácidos graxos encontrados, implicando que em ambas as espécies o C16, C17 e C18 possivelmente representem as frações mais significativas de sua composição. Nas amostras de Praia Mansa, Araçá, Praia Vermelha e Toque Toque Pequeno, foram detectados apenas ácidos graxos saturados.

Nas amostras onde detectou-se mono-insaturados (MUFA), cuja contribuição total variou entre 10% e 19%, predominou o C18:1n9c, embora o mesmo só tenha exibido valores maiores nas amostras de Bananas, Estaleirinho e Barra Velha. A amostra da Urca foi a única a apresentar uma fração significativa de outro ácido mono-insaturado, o C16:1n7. Já os poli-insaturados (PUFAs) apresentaram contribuições variando entre 5% e 30%. Os EFAs (DHA, EPA e ARA respectivamente) representaram as maiores quantidades de poli-insaturados, embora o maior valor de todos tenha sido o C18:2n6 da amostra de Bananas, sendo portanto relativamente anômalo.

Os ácidos EPA e 16:1, associados à diatomáceas, quando detectados, tiveram contribuição total variando de 1,5% a 10%. Os dois maiores valores foram encontrados em amostras de *Pharyngocirrus* (Jererês e Urca), embora tenha sido encontrado mais vezes porém em menores quantidades nas amostras de *Saccocirrus*. A única amostra que indicou predominância de diatomáceas por conta da proporção de EPA e DHA foi a de Barra Velha. Dentre os ácidos graxos especificamente indicadores de dinoflagelados, apenas o 16:0 foi encontrado. 18:4n3 e 18:5n3 não foram encontrados em quantidades detectáveis em nenhuma amostra. Sendo o 16:0 o ácido graxo encontrado em maior abundância em todas as amostras, a variação da suposta contribuição de dinoflagelados nas amostras variou entre 27% e 56%, tendo os valores mais altos sido encontrados nas amostras de *Pharyngocirrus gabriellae*. A predominância de DHA sobre EPA na proporção dos dois ácidos, que também é um indicador da presença de dinoflagelados, pôde ser verificada nas amostras de Jererês, Bananas e Estaleiro.

Quanto ao conjunto de ácidos ARA, DHA, 18:1n-9 e 18:2n6, que servem de indicadores para a presença de zooplâncton, nas amostras em que foram encontrados apresentaram proporções que variaram entre 5% e 45%. Em 5 amostras nenhum destes ácidos foi detectado, sendo 4 de *Pharyngocirrus* (Praia Mansa, Araçá, Cabelo Gordo e Vermelha) além da de Toque Toque Pequeno. Os ácidos C15 e C17, associados a bactérias e material detritico, foram encontrados em todas as amostras, em proporções que variaram entre 3% e 35%, tendo os dois grupos de amostras apresentado valores máximos e mínimos.

FIGURA 5: ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS EM NANOGRAMAS DE ÁCIDO GRAXO / GRAMA DE MASSA DE CADA AMOSTRA.



Pontos cinzas representam a massa total dos espécimes coletados em cada local.

Uma possível relação entre o total de massa analisada e a quantia de ácidos graxos totais identificados foi testada mediante o uso de um diagrama de dispersão entre as duas variáveis (Figura 5). O diagrama indicou uma correlação positiva fraca, indicada pela linha de tendência ascendente e pelo espalhamento dos pontos. Algumas amostras retornaram valores elevados com menor massa, como por exemplo Bananas e Jererês (PR), enquanto outras que dispunham de maior peso amostral resultaram em quantias relativamente pequenas de ácidos graxos totais encontrados, como Estaleiro (SC), Toque Toque Pequeno, Cabelo Gordo e Araçá (SP). Algumas exibiram resultados aparentemente mais proporcionais a quantia de massa original, como Leblon e Vermelha (RJ), Estaleirinho e Barra Velha (SC).

	<i>Pharyngocirrus gabriellae</i>										<i>Saccocirrus pussicus</i>				
	Jererés	Praia Mansa	Bananas	Araça	Cabelo Gordo	Urca	Vermelha	Estaleirinho	Estaleiro	Barra Velha	Toque Toque Pequeno	Leblon			
Diatomáceas	10,12	0	1,52	0	0	10,8	0	1,57	6,43	5,07	0	2,53			
EPA	7,51	0	0,44	0	0	0	0	0	4,12	3,54	0	0			
C16:1	2,6	0	1,09	0	0	10,8	0	1,57	2,31	1,53	0	2,53			
C16:1(n-7)/C16:0 > 1															
DHA/EPA < 1		X		X	X	X	X	X		X	X	X			
Dinoflagelados	34,61	44,11	34,36	39,4	55,93	37,36	29,01	29,93	36,74	27,02	33,81	60,23			
DHA/EPA > 1	X		X						X						
C16:0	25,11	44,11	33,74	39,4	55,93	37,36	29,01	24,51	27,04	27,02	33,81	60,23			
C18:5(n-3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
C18:4(n-3)	9,5	0	0,63	0	0	0	0	5,41	9,7	0	0	0			
DHA															
Zooplankton	18,18	0	44,75	0	0	4,92	0	20,29	21,68	9,31	0	6,36			
18:1 (n-9)	5,29	0	16,85	0	0	0	0	11,47	6,59	8,15	0	4,17			
18:2 (n-6)	1,84	0	27	0	0	0	0	3,41	3,02	1,16	0	2,2			
ARA	1,55	0	0,28	0	0	4,92	0	0	2,37	0	0	0			
DHA	9,5	0	0,63	0	0	0	0	5,41	9,7	0	0	0			
Detritos e Bactérias	12,18	13,99	3,2	27,37	8,95	14,38	34,99	12,68	11,71	14,3	31,56	5,6			
Σ Iso- and anteiso-C15 and C17	12,18	13,99	3,2	27,37	8,95	14,38	34,99	12,68	11,71	14,3	31,56	5,6			
18:1(n-7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Diatomáceas + Dinoflagelados	44,72	44,11	35,89	39,4	55,93	48,16	29,01	31,49	43,17	32,09	33,81	62,76			
Zooplankton + Detritos/Bactérias	30,36	13,99	47,96	27,37	8,95	19,3	34,99	32,97	33,39	23,62	31,56	11,96			

TABELA 3: QUANTIDADE DE CADA ÁCIDO GRAXO PRESENTE NOS INDIVÍDUOS COLETADOS EM CADA PONTO AMOSTRAL, EM % DO TOTAL

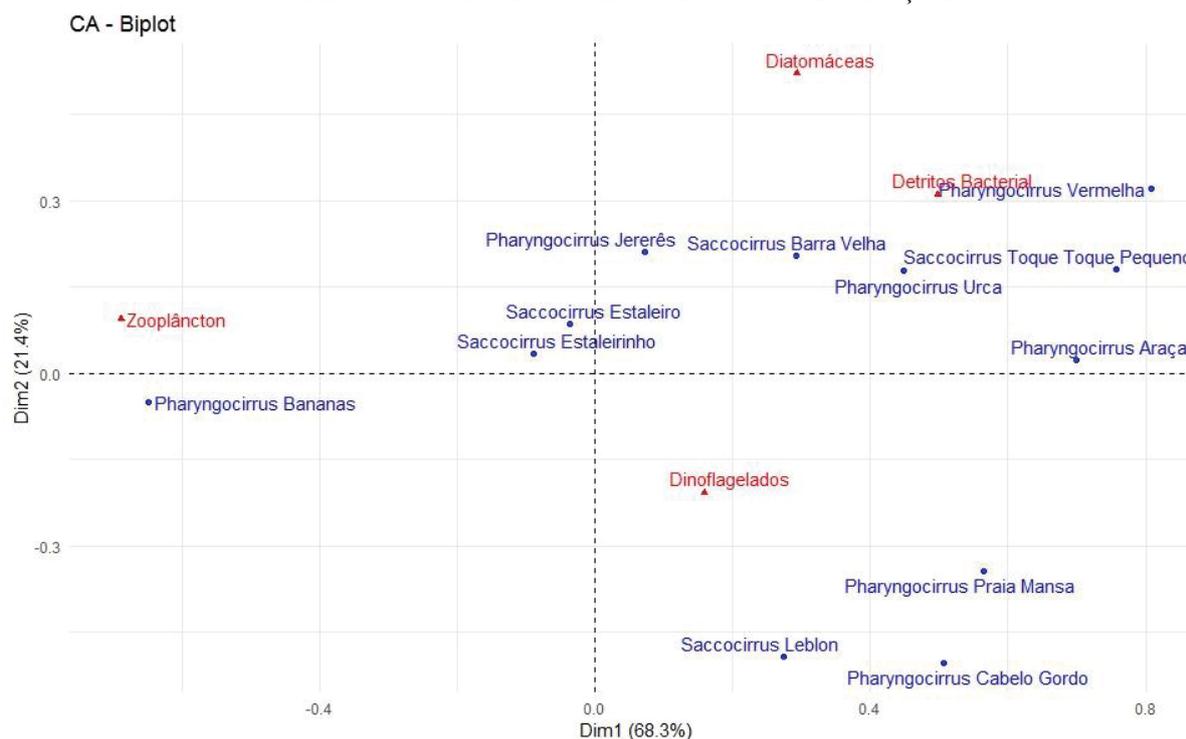
DE ÁCIDOS GRAXOS DE *SACCOCIRRUS PUSSICUS* E *PHARYNGOCIRRUS GABRIELLA*

	Phytoplankton			Krill		Copepod	Rhodophyceae		Chlorophyceae		Sardina Pichardus (a)	Anchova (Engraulis encrasicolus) (a)	Tuna (c)	Pacific bluefin tuna (d)	Squid oil (e)	Crude sardine oil (f)
	Euphausia superba	Euphausia tricantha	Euphausia frigida	Microarthridion littorale	P. cruentum		D. bioculata	D. minuta								
Diatomáceas	14,33	8,20	13,10	3,20	12,60	4,30	6,80	16,80	12,15	18,11	10,81	16,78	38,80			
EPA	9,28	6,70	10,90	0,00	8,30	0,00	0,00	10,70	7,80	12,40	6,90	12,40	28,20			
C16:1	5,05	1,50	2,20	3,20	4,30	4,30	6,80	6,10	4,20	5,40	3,70	4,20	9,58			
C16:1(n-7)/C16:0 > 1 DHA/EPA < 1		X						X							X	
Dinoflagelados	41,88	29,20	36,10	29,20	43,40	27,10	24,60	44,00	48,20	45,40	41,10	41,90	38,90			
DHA/EPA > 1	X	X	X					X								
C16:0	24,67	13,40	18,00	17,70	42,50	24,10	20,60	23,20	27,10	17,60	17,80	22,80	22,20			
C18:5(n-3)																
C18:4(n-3)	2,24	0,00	0,00	0,00	0,90	3,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
DHA	14,97	15,80	18,10	11,50	0,00	0,00	0,00	20,80	21,10	27,80	23,30	19,10	16,70			
Zooplankton	21,90	35,30	35,60	17,90	28,80	10,90	12,10	30,60	31,40	42,10	39,80	38,00	22,96			
18:1 (n-9)	4,87	17,70	15,30	2,40	1,40	4,10	4,10	7,10	8,50	12,40	15,50	17,20	5,23			
18:2 (n-6)	1,42	1,80	2,20	1,60	2,50	6,80	7,70	1,50	1,80	1,90	1,00	1,70	1,03			
ARA	0,64	0,00	0,00	2,40	24,90	0,00	0,30	1,20								
DHA	14,97	15,80	18,10	11,50	0,00	0,00	0,00	20,80	21,10	27,80	23,30	19,10	16,70			
Detritos e Bactérias	4,35	8,00	12,90	3,90	3,00	1,40	1,70	0,90	1,10	0,00	0,40	0,60	0,00			
∑ Iso- and anteiso-C15 and C17	1,45	0,00	0,00	1,00	1,10	0,60	0,60	0,90	1,10	0,00	0,40	0,60	0,00			
18:1(n-7)	2,90	10,50	12,90	2,90	1,90	0,80	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
Diatomáceas + Dinoflagelados	56,21	78,30	49,20	32,40	56,00	31,40	31,40	60,80	60,35	63,51	51,91	58,68	77,70			
Zooplankton + Detritos/Bactérias	26,25	42,80	48,50	21,80	31,80	12,30	13,80	31,50	32,50	42,10	40,20	38,60	22,96			

TABELA 4. PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DE DIFERENTES ESPÉCIES ADAPTADOS DE DIFERENTES FONTES EM % DO TOTAL DE ÁCIDOS GRAXOS

Fontes: a) Alkanani et al. (2007); b) Ju and Harvey (2004); c) North Inlet SC (June 1995); d) Viso and Marty (1993) a) Zlatanos and Laskaridis (2007); c) Ackman (2008); d) Nakamura et al. (2007); e) Lyberg and Adlercreutz (2008); f) Okada and Morrissey (2007).

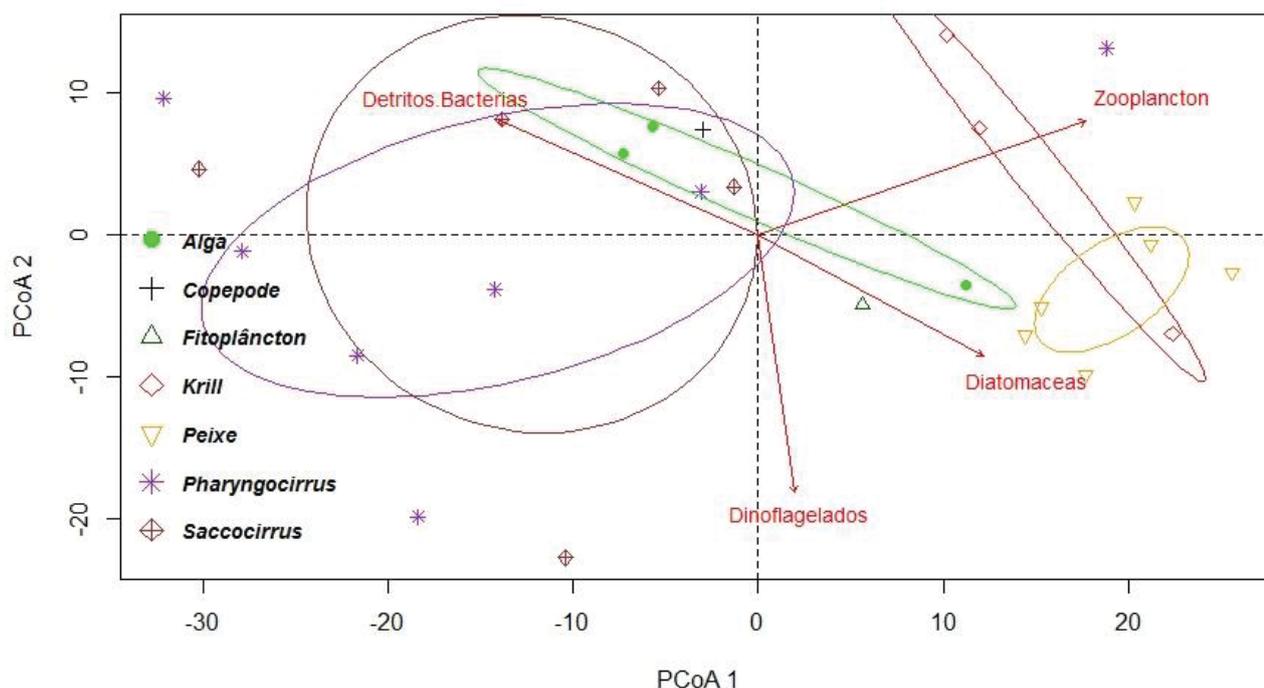
FIGURA 6: ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS PERFIS DOS ESPÉCIMES COLETADOS DE ACORDO COM ÍNDICES A PARTIR DAS CONCENTRAÇÕES



O chi quadrado de independência entre as duas variáveis é igual a 220989.9 (p-value = 0). Triângulos vermelhos representam os índices de ácidos graxos, enquanto as esferas azuis representam as amostras através da espécie *d* e saccocirrídeo acompanhada por seu local de amostragem.

A CA (FIGURA 6) evidencia quais perfis lipídicos apresentam valores similares nos índices de ácidos graxos. O valor chi-quadrado de 220989.9 e o p-valor de 0 indicam uma associação de alta significância entre as variáveis de índices e perfis lipídicos. O resultado da análise mostra que a tabela de contingência foi representada com sucesso no espaço bi-dimensional. As dimensões 1 e 2 explicam 89,7% da variação total contida nos dados. A maior variação na dimensão 1 está contida na dissimilaridade entre dinoflagelados e diatomáceas. Já a maior variação da dimensão 2 é caracterizada pela distância entre o índice de zooplâncton e os índices de detritos/bacterial e diatomáceas. As amostras apresentaram tendência a serem similares de acordo com a proximidade entre os locais de amostragem, o que pode ser visto na proximidade entre os perfis de Estaleiro, Estaleirinho e Barra Velha; a proximidade entre Toque Toque Pequeno e Araça; e a proximidade entre Vermelha e Urca. As exceções ficam por conta das três amostras de *Pharyngocirrus* coletadas no Paraná (Jererês, Bananas e Praia Mansa), que ficaram todas distantes entre si, além de outras desgarradas, como Leblon e Cabelo Gordo.

FIGURA 7: PCOA ENTRE TODOS OS PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS RELACIONADOS (%TAF)



A PCOA entre todos os perfis de ácidos graxos encontrados e selecionados para este trabalho em função das variações nas contribuições totais representadas por seus respectivos índices (Figura 7) mostra que há sobreposições entre os conteúdos lipídicos de alguns grupos. Os dois grupos de sacocirrídeos apresentam sobreposição entre si e com o copépode e o grupo de algas, um indicativo de similaridade entre os conjuntos. Os perfis de peixes e krill se mostraram distintos e ficaram segregados dos outros, apresentando um pouco de sobreposição entre si. Notam-se também correlações negativas entre o grupo de *Pharyngocirrus* e a variação no índice de zooplâncton e entre o grupo de *Saccocirrus* e a variação no índice de diatomáceas, evidenciado por seus posicionamentos em quadrantes opostos.

TABELA 5 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MULTIVARIADA PERMUTACIONAL COM DISTÂNCIA EUCLIDIANA SOBRE A VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DUAS ESPÉCIES COM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS

Variável	Df	R2	Pr(>F)	
Espécie	1	0.06005	0.2292	
Energia	2	0.19301	0.0657	.
Produção	2	0.3255	0.0214	*
TMG	2	0.18145	0.0689	.
Latitude	1	0.05911	0.2447	
Longitude	1	0.10478	0.0775	.
Residual	2	0.0761		

signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A análise de variância multivariada permutacional (Tabela 5) não indicou nenhuma variável ambiental com correlação de grande significância com a matriz de perfis lipídicos. A produção primária apresentou a correlação mais elevada, ainda que pouco significativa. A caracterização da energia hidrodinâmica, o tamanho médio de grão e a longitude também se mostraram marginalmente significativos.

4 DISCUSSÃO

O ácido palmítico (C16) é o ácido graxo saturado mais comum, encontrado em quantias variáveis mas sempre significativas em animais, plantas e microorganismos (Gunstone et al, 2007). Ácido esteárico (C18), o segundo mais comum, por sua vez, é mais abundante em gorduras animais (até 30%) do que em gordura vegetal (tipicamente < 5%) (Beare-Rogers et al, 2001). Embora o único exemplo que apresenta uma porção significativa de C18 sejam os copépodes, os perfis de espécimes mais complexos e situados mais acima na teia trófica apresentam teores maiores de outros ácidos mono-insaturados e poli-insaturados, o que é provavelmente resultado da ação enzimática dos mesmos.

Observando as proporções de C16 e C18 presentes em perfis de outros organismos (Tabela 4), nota-se que o C16 representa as maiores frações dos perfis de fitoplâncton e de algas rodófitas, e também frações significativas nos perfis de krill, algas clorófitas e do copépode. Destes, o único que apresenta uma quantia significativa de C18 são os copépodes. Já nos perfis de teleósteos, o C16 ainda representa geralmente a maior fração, embora seus percentuais sejam menores do que nos outros espécimes.

Contribuições significativas de ARA combinadas com presenças de DHA e EPA provavelmente refletem uma origem animal. Esta combinação de marcadores pode derivar de ciliados, flagelados heterotróficos (Silina and Zhukova, 2007) e zooplâncton (Frazer et al., 1989). Altas concentrações de ARA também foram identificadas em amostras de zooplâncton com maiores proporções de grupos carnívoros e onívoros do que grupos de zooplâncton herbívoros (Serrazanetti et al., 1994). As análises de correspondência mostraram que embora não haja uma distinção clara entre as duas espécies, há uma consistência entre os perfis da família Saccocirridae, com exceção da amostra anômala de *Pharyngocirrus gabriellae* da Ilha das Bananas no Complexo Estuarino de Paranaguá.

O valor alto no índice de zooplânctons resultante no perfil dos *Pharyngocirrus* coletados na Ilha da Banana pode se dever aos baixos índices de produção primária no setor interno da Baía de Paranaguá. Neste local os *Pharyngocirrus gabriellae* mostraram altos teores do lipídeo C18:2n6. Embora primariamente um indicador para zooplâncton, o ácido linoléico (18:2n-6) também pode ser indicador da presença de plantas terrestres (Budge and Parrish, 1998), gramas marinhas (Kharlamenko et al., 2001) ou alguns protozoa (Zhukova and Kharlamenko, 1999). Isso pode ser uma possível explicação para o valor de contribuição anômalmente alto deste ácido na amostra de Bananas, que segundo os índices utilizados neste trabalho representaria uma origem alimentar zooplânctonica. Tal pode também ser especulado como uma possível evidência da preferência herbívora do *Pharyngocirrus gabriellae*: devido a disponibilidade reduzida de alimento fitoplantônico, os *Pharyngocirrus* teriam ingerido maiores quantidades dos alimentos citados acima para manter sua dieta preferencial.

A análise de variância multivariada permutacional apontou a produção primária como o fator de maior significância dentre os fatores analisados para a variabilidade nos perfis de ácidos graxos das amostras coletadas, tendo ficado em segundo lugar com significâncias similares a energia hidrodinâmica, o tamanho médio de grão e a longitude. A produção primária, o tamanho de grãos e a energia hidrodinâmica dos locais eram fatores esperados de apresentarem significância considerável, uma vez que as preferências de alimentação e de habitat das duas espécies coletadas se distinguem também por estes mesmos critérios. No entanto, a longitude apresentar significância maior do que a latitude é um resultado inesperado, uma vez que a distância latitudinal entre os pontos de coleta era maior. Valores elevados de produção primária podem promover maiores proporções de C16 nos organismos locais (Ramirez, M. et al., 2001), o que pode ser uma das principais pistas sobre suas preferências alimentares por vegetais e organismos autotróficos.

A noção de que é possível determinar preferências alimentares de espécies com o uso da investigação do conteúdo lipídico abre caminhos para elaboração de inúmeros experimentos capazes de preencher estas lacunas de conhecimento, especialmente na micro e meiofauna, onde por vezes o estudo detalhado dos hábitos de um espécime é complexo. Ainda dentro da família Saccocirridae as possibilidades de continuidade e aprofundamento de experimentos de medição de ácidos graxos são vastas. A análise das gorduras de sacocirrídeos cultivados em ambientes com condições controladas pode ajudar a compreender como o organismo do espécime reage a ingestão de nutrientes, além de permitir visualizar de maneira mais íntima como fatores externos e internos ao animal afetam sua composição lipídica. A continuidade dos estudos sobre o tema e as espécies em questão pode levar a novas conclusões a respeito dos hábitos, modos e estruturas alimentares dos sacocirrídeos, permitindo-nos observar não somente as diferenças entre uma dieta e outra, como também se tais diferenças podem ser interpretadas como um sinal filogenético e/ou ecológico.

O resultado do estudo contribui para preencher o déficit 'Raukiaeran' (Hortal et al, 2015), no sentido de agregar novas informações e de gerar dados que podem ser explorados para além da análise empírica sobre as características das dietas dos sacocirrídeos, traços relevantes para compreender a função ecológica destas minhocas no ambiente, e também cria um precedente e um comparativo para a investigação dos mesmos aspectos em outras espécies de animais da meiofauna marinha.

5 REFERÊNCIAS

ABDULKADIR, S.; TSUCHIYA, M. One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 354, 1–8. 2008.

ACKMAN, Robert G. Fatty acids in fish and shellfish. **Fatty acids in foods and their health implications**, p. 155-185, 2008.

ALKANANI, T. et al. Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 348, n. 1-2, p. 33-45, 2007.

APPELTANS et al., The magnitude of global marine species diversity. *Curr. Biol.* 22, 2189–2202. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036](http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036). 2012

ARNAULT, S. Tropical Atlantic geostrophic currents and ship drifts. *Journal of Geophysical Research*, v.92, n.C5, p.5076-5088. 1987.

ASSIS, J., TYBERGHEIN, L., BOSH, S., VERBRUGGEN, H., SERRÃO, E. A., & DE CLERCK, O. Bio-ORACLE v2.0: Extending marine data layers for bioclimatic modelling. *Global Ecology and Biogeography*. (2017)

BAILEY-BROCK, JULIE H. Coral reef polychaetes of Guam and Saipan, Mariana Islands. *Micronesica*, v. 35, n. 36, p. 200-217, 2003.

BEARE-ROGERS, J.; DIEFFENBACHER, A.; HOLM, J.V. (2001). "Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report)". *Pure and Applied Chemistry*. **73** (4): 685–744.

BINGHAM, E.; COHRSSSEN, B.; POWELL, C.H.; Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001)., p. 829

BROWN, R. Saccocirridae (Annelida: Polychaeta) from the central coast of New South Wales. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 32: 439-456. 1981.

CANNON, J. T., VELLUTINI, B. C., SMITH, J., RONQUIST, F., JONDELIUS, U., HEJNOL, A., 2016. Xenacoelomorpha is the sister group to Nephrozoa. *Nature* 530, 89-93. <http://dx.doi.org/10.1038/nature16520>.

CIOTTI, A. M.; MAHIQUES, M.; MÖLLER, O. The meridional gradients of the S-SE Brazilian continental shelf: Introduction to the special volume. *Continental Shelf Research*, v. 89, p. 1-4, 2014.

CURINI-GALLETTI, M., ARTOIS, T., DELOGU, V., DE SMET, W.H., FONTANETO, D., JONDELIUS, U., ET AL. Patterns of diversity in soft-bodied meiofauna: dispersal ability and body size matter. *PLoS One* 7 (3), e33801. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033801>. 2012.

DALSGAARD, J.; JOHN, M.S.; KATTNER, G.; MÜLLER-NAVARRA, D.; HAGEN, W. Fatty Acid Trophic Markers in the Pelagic Marine Environment. In: SOUTHWARD, A. J. (ed) *Advances in Marine Biology Environment*, Academic Press, vol. 46, p. 225-340. 2003.

DE TROCH, M., BOECKX, P., CNUUDE, C., VAN GANSBEKE, D., VANREUSEL, A., VINCX, M., CARAMUJO, M.J. Bioconversion of fatty acids at the basis of marine food webs: insights from a compound-specific stable isotope analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 465, 53–67. 2012.

DERYCKE, S., REMERIE, T., VIERSTRAETE, A., BACKELJAU, T., VANFLETEREN, J., VINEX, M., MOENS, T. Mitochondrial variation and cryptic speciation within the free-living marine nematode *Pellioditis marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 300, 91-103. <http://dx.doi.org/10.3353/meps300091>. 2005.

DESVILETTES, C.; BOURDIER, G.; AMBLARD, C.; BARTH, B. Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshwater Biology* 38, 629–637. 1997.

DIAZ, R. J.; SOLAN, M.; VALENTE, R. M. A review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality. *Journal of Environmental Management*, v.73, n.3, p.165-181. 2004.

DI DOMENICO, M.; MARTÍNEZ, A.; ALMEIDA, T.C.M; MARTINS, M.O.; WORSAAE, K. Response of the meiofaunal annelid *Saccocirrus pussicus* (Saccocirridae) to sandy beach morphodynamics. *Hydrobiologia* 734:1–16. 2014

DI DOMENICO, M.; MARTINEZ, A; AMARAL, A. C. Z.; LANA, P. C.; WORSAAE, K. Saccocirridae (Annelida) from the southern and southeastern Brazilian coast. *Marine Biodiversity*, v. 44, n. 3, p. 313-325, 2014.

DI DOMENICO, M.; MARTINEZ, A; LANA, P. C.; WORSAAE, K.. Molecular and morphological phylogeny of Saccocirridae (Annelida) reveals two cosmopolitan clades with specific habitat preferences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 75:202-18. 2014.

DOMINGUEZ, J. M. L.; BITTENCOURT, A. C. S. P.; MARTIN, L. O papel da deriva litorânea de sedimentos arenosos na construção de planícies costeiras associadas às desembocaduras dos rios São Francisco (SE-AL), Jequitinhonha (BA), Doce (ES) e Paraíba do Sul (RJ). *Revista Brasileira de Geologia*, v.13, n.2, p.98-105. 1983.

DU BOIS-REYMOND MARCUS, E. On a New Archiannelid, *Saccocirrus gabriellae*, from Brazil. *Comunicaciones Zoológicas del Museu de Historia Natural de Montevideo* 37(2):1 - 11. 1946.

DU BOIS-REYMOND MARCUS E. Further archiannelids from Brazil. *Comunicaciones Zoológicas del Museu de Historia Natural de Montevideo* 2: 1-27. 1948.

DUNN, C.W., HEJNOL, A., MATUS, D.Q., PANG, K., BROWNE, W.E., SMITH, S.A., SEAVER, E., ROUSE, G.W., OBST, M., EDGEcombe, G.D., SORENSEN, M.V., HADDOCK, S.H.D., SCHMIDTRHAESA, A., OKUSU, A., KRISTENSEN, R.M., WHEELER, W.C., MARTINDALE, M.Q., GIRIBET, G. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–749. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06614>. 2008.

EDER, K / J. Chromatogr. B 671 113-131. 1995.

EKAU, W.; KNOPPERS, B. An introduction to the pelagic system of the Northeast and East Brazilian shelf. *Archive of Fishery and Marine Research*, v.47, n.2-3, p.113-132. 1999.

FAUCHALD, K.; JUMARS, P. A. The diet of worms: a study of polychaete feeding guilds. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review* 17,193-284. 1979.

FONSECA, V.G., CARVALHO, G.R., NICHOLS, B., QUINCE, C., JOHNSON, H.F., NEILL, S.P., LAMBSHEAD, J.D., THOMAS, W.K., POWER, D.M., CREER, S., Metagenetic analysis of patterns of distribution and diversity of marine meiobenthic eukaryotes. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 1293–1302. <http://dx.doi.org/10.1111/geb.12223>. 2014a.

FONSECA, G. Addressing biodiversity shortfalls in meiofauna. *Journal of Experimental Marine biology and ecology*. 2017

FONTANETO, D., BARRACLOUGH, T.G., Do species exist in Asexuals? Theory and evidence from Bdelloid rotifers. *Integr. Comp. Biol.* 55, 253–263. <http://dx.doi.org/10.1093/icb/iev024>. 2015.

FRY, B., *Stable Isotope Ecology*. Springer Science & Business Media. 2007.

FUJISAWA, T., BARRACLOUGH, T.G., Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Syst. Biol.*, syt033. 2013.

GRAY, J. S. (1969). A new species of *Saccocirrus* (Archiannelida) from the west coast of North America.

GUILINI, K.; VEIT-KÖHLER, G.; DE TROCH, M.; VANGANSBEKE, D. VANREUSEL, A. Latitudinal and temporal variability in the community structure and fatty acid composition of deep-sea nematodes in the Southern Ocean. *Progress in Oceanography*. 110,80–92. 2013.

GUNSTONE, F. D., John L. Harwood, and Albert J. Dijkstra. *The Lipid Handbook*, 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2007

HERMANS, C.O. The systematic position of the Archiannelida. *Syst. Biol.* 18, 85–102. 1969.

HEJNOL, A., OBST, M., STAMATAKIS, A., OTT, M., ROUSE, G.W., EDGECOMBE, G.D., MARTINEZ, P., BAGUÑA, J., BAILLY, X., JONDELIUS, U., ET AL. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 276, 4261–4270. 2009.

HIGGINS, R. P.; THIEL, H. Introduction to the Study of Meiofauna. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D. C. and London p. 488. 1988.

HORTAL, J., DE BELLO, F., DINIZ-FILHO, J.A.F., LEWINSOHN, T.M., LOBO, J.M., LADLE, R.J., Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 46, 523–549. 2015.

LIU, Ke-Shun. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 11, p. 1179-1187, 1994.

LYBERG, Ann-Marie; ADLERCREUTZ, Patrick. Lipase-catalysed enrichment of DHA and EPA in acylglycerols resulting from squid oil ethanolysis. **European journal of lipid science and technology**, v. 110, n. 4, p. 317-324, 2008.

MANSOUR, M. P., VOLKMAN, J. K., JACKSON, A. E., & BLACKBURN, S. I. 1999). the fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 35(4), 710–720. doi:10.1046/j.1529-8817.1999.3540710.x

IKEN. K., BREY, T., WAND, U., VOIGT, J., JUNGHANS, P., Food web structure of the benthic community at the Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic): a stable isotope analysis. *Prog. Oceanogr.* 50, 383–405. 2001.

JOUIN, C. Recherches sur les Archiannélides interstitielles: Systématique, anatomie et développement des Protodrilidae et des Nerillidae. *Thèse Doctorat, Faculté des Sciences des Paris*, 204 pages. 1970.

JU, Se-Jong et al. Understanding the trophic role of the Antarctic ctenophore, *Callianira antarctica*, using lipid biomarkers. **Polar Biology**, v. 27, n. 12, p. 782-792, 2004.

JUMARS, P. A.; DORGAN, K. M.; LINDSAY, S. M. Diet of Worms Emended: An Update of Polychaete Feeding Guilds. *Annual Review of Marine Science* Vol. 7: 497-520. 2015.

KINGSOLVER, Joel G.; GOMULKIEWICZ, Richard; CARTER, Patrick A. Variation, selection and evolution of function-valued traits. In: *Microevolution Rate, Pattern, Process*. Springer, Dordrecht, 2001. p. 87-104.

KNOPPERS, B.; EKAU, W.; FIGUEIREDO, A. G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. *Geo-Marine Letters*, v.19, p.171-178. 1999.

LEWIS, R. W. Fatty acid composition of some marine animals from various depths. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 24, n. 5, p. 1101-1115, 1967.

NAPOLITANO, G. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: ARTS, M.T; WAINMAN, B.C. (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*, pp. 21–44, Springer, New York. 1999.

NAKAMURA, Yoshi-Nori et al. Changes of proximate compositions and myoglobin content in the dorsal ordinary muscles of the cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* with growth. **Fisheries science**, v. 73, n. 5, p. 1155-1159, 2007.

OKADA, Tomoko; MORRISSEY, Michael T. Recovery and characterization of sardine oil extracted by pH adjustment. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1808-1813, 2007.

OMENA, E. P. et al. Spatial distribution of intertidal sandy beach polychaeta along an estuarine and morphodynamic gradient in an eutrophic tropical bay. **Marine pollution bulletin**, v. 64, n. 9, p. 1861-1873, 2012.

PELLIZZARI, Franciane Maria et al . Benthic marine algae from the insular areas of Paraná, Brazil: new database to support the conservation of marine ecosystems. **Biota Neotrop.**, Campinas , v. 14, n. 2, e20130011, 2014 .

PURSCHKE, G., & TZETLIN, A. B. (1996). Dorsolateral ciliary folds in the polychaete foregut: structure, prevalence and phylogenetic significance. *Acta Zoologica*, 77(1), 33-49.

RAMIREZ, M.; AMATE, L.; GIL, A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. **Early human development**, v. 65, p. S95-S101, 2001.

RAO, G. Chandrasekhara; GANAPATI, P. N. On some archiannelids from the beach sands of Waltair Coast. In: Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B. Springer India, 1968. p. 24-30.

ROY, Kaustuv; FOOTE, Mike. Morphological approaches to measuring biodiversity. Trends in Ecology & Evolution, v. 12, n. 7, p. 277-281, 1997.

RUESS, L., CHAMBERLAIN, P., The fat that matters: soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1898–1910. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.020>. 2010.

SCARPA, F., COSSU, P., SANNA, D., LAI, T., NORENBURG, J.L., CURINI-GALLETTI, M., CASU, M., An 18S and 28S-based clock calibration for marine Proseriata (Platyhelminthes). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 463, 22–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2014.10.020>. 2015.

SCHARTZBERGER, M., INGELS, J., Meiofauna matters: the roles of meiofauna in benthic ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* (in press). 2017.

SEBASTIEN, L. JOSSE, J. HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* (2008)

STRUCK, T.H., Progenetic species in polychaetes (Annelida) and problems assessing their phylogenetic affiliation. *Integr. Comp. Biol.* 46, 558–568. 2006.

STRUCK, T.H., WEY-FABRIZIUS, A.R., GOLOMBEK, A., HERING, L., WEIGERT, A., BLEIDORN, C., KLEBOW, S., LAKOVENKO, N., HAUSDORF, B., PETERSEN, M., ET AL. Platyzoan paraphyly based on phylogenomic data supports a noncoelomate ancestry of Spiralia. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1833–1849. 2014.

STRUCK ET AL., The Evolution of Annelids Reveals Two Adaptive Routes to the Interstitial Realm, *Current Biology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.007>. 2015.

STUBBS, C.D., SMITH, A.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 779 89. 1984.

TYBERGHEIN L, VERBRUGGEN H, PAULY K, TROUPIN C, MINEUR F, DE CLERCK O (2012) Bio-ORACLE: A global environmental dataset for marine species distribution modelling. *Global Ecology and Biogeography*, 21, 272–281

VISO, Anne-Catherine; MARTY, Jean-Claude. Fatty acids from 28 marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1521-1533, 1993.

WESTHEIDE, W., Progenesis as a principle in meiofauna evolution. *J. Nat. Hist.* 21, 843–854. 1987.

WESTHEIDE, W. Polychaetes: Interstitial families. *Synopses of the British Fauna*, New Series, 44, 152 pages. 2008.

WORSAAE, K., AND KRISTENSEN, R.M., Evolution of interstitial Polychaeta (Annelida). *Hydrobiologia* 179, 319–340. 2005.

ZEPELLI, D., SARRAZIN, J., LEDUC, D., ARBIZU, P.M., FONTANETO, D., FONTANIER, C., GOODAY, A.J., KRISTENSEN, R.M., IVANENKO, V.N., SORENSEN, M.V., VANREUSEL, A., Is the meiofauna a good indicator for climate change and anthropogenic impacts? *Mar. Biodivers.* 45, 505–535. 2015.

ZLATANOS, Spiros; LASKARIDIS, Kostas. Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish—sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 725-728, 2007.

ANEXO I – QUADRO DE PARÂMETROS DE CONFIGURAÇÃO DO CROMATÓGRAFO GASOSO

EQUIPAMENTO: Trace GC Ultra da Marca Thermo Scientific - Estação de dados: ChromQuest 4.1 Método: FAME			
PARÂMETROS DO FORNO			
	°C/min	°C	Manter (min)
Inicial		60	0
Rampa 1	30	170	0
Rampa 2	2	215	12
	20	240	15
Equilibration Time : 0,5 min. Tempo de corrida: 54,42 minutos			
PARÂMETROS DO INJETOR			
Volume injeção : 1 µL Temperatura do injetor : 240 °C Gás de arraste: He _(UP) (1,5 mL.min ⁻¹ , fluxo constante) Modo : <i>Splitless</i>			
PARÂMETROS DO DETECTOR: FID			
Aquecedor: 280 °C Desvio ignição: 0,3 pA			
PARÂMETROS DA COLUNA			
Descrição: DB-23 60m (P/N: 123-2362) Diâmetro interno: 0,32 mm Espessura do filme: 0,25 µm Temp. Máxima: 250°C			