



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DALIANA THAISA MARIA TELES DE OLIVEIRA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO
MUCO CLOACAL DAS TARTARUGAS MARINHAS - IPOJUCA/PE**

Recife

2018

DALIANA THAISA MARIA TELES DE OLIVEIRA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO
MUCO CLOACAL DAS TARTARUGAS MARINHAS - IPOJUCA/PE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ednilza Maranhão dos Santos

**Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Lourinalda Luiza Dantas da Silva
Selva de Oliveira**

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S729c Souza, Daliana Thaisa Maria Teles de Oliveira
Caracterização das propriedades químicas e biológicas do muco cloacal das tartarugas marinhas - Ipojuca/PE: / Daliana Thaisa Maria Teles de Oliveira Souza. - 2018.
92 f. : il.
- Orientadora: Ednilza Maranhão dos Santos.
Coorientadora: Lourinalda Luiza Dantas da Silva Selva de Oliveira.
Inclui referências e anexo(s).
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2019.
1. Tartarugas marinhas. 2. Conservação. 3. Contaminantes ambientais. I. Santos, Ednilza Maranhão dos, orient. II. Oliveira, Lourinalda Luiza Dantas da Silva Selva de, coorient. III. Título

DALIANA THAISA MARIA TELES DE OLIVEIRA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO
MUCO CLOACAL DAS TARTARUGAS MARINHAS - IPOJUCA/PE**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos exigidos para obtenção de conclusão de curso, pela banca examinadora representada pelos membros:

Data de Aprovação: ____/____/____

Nota: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Ednilza Maranhão dos Santos (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
Departamento de Biologia

Dra^a Luciana Carla Rameh de Albuquerque Zanotti
Zoológico Parque Estadual Dois Irmãos - PEDI/ Ecoassociados

MSc. Denisson da Silva e Souza
Zoológico Parque Estadual Dois Irmãos - PEDI

Prof^a. Dra^a Jozélia Maria de Sousa Correia
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
Departamento de Biologia

Dedico esse trabalho aos meus pais Joel (in Memória) e Maria das Graças por todo carinho e dedicação, a minha irmã Danylla e a todos que amam os animais e atuam na conservação destes.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus pelo seu infinito amor, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada e por estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço as pessoas que tornaram este projeto possível. Nenhuma batalha é vencida sozinha. No decorrer desta luta algumas pessoas estiveram ao meu lado e percorreram este caminho como verdadeiros soldados, estimulando que eu buscasse a minha vitória e conquistasse meu sonho.

Esta foi uma longa, divertida e, por muitas vezes, difícil jornada. Tenho realmente muito o que agradecer e consigo resumir tudo em uma única palavra: AMIZADE. Foram momentos tensos, angustiantes, mas sem dúvida nenhuma, o que mais houveram foram risadas, alegria e muito carinho.

Aos meus pais por me deixarem livre para fazer as minhas escolhas e seguir o caminho que eu escolhi para mim, me tornando corajosa e digna de enfrentar a vida.

Ao meu pai por me mostrar ainda em vida o quanto é importante fazer o que se gosta, e saber valorizar as pequenas coisas, despertando em mim esse amor pelos animais e o entendimento sobre realmente o que é a vida, seu significado e importância, seu legado permaneceu além da vida em terra.

A minha mãe por todo apoio nessa caminhada que não foi fácil, pela sua amizade, educação, valores, princípios e seu exemplo de garra e determinação.

A minha irmã Danylla Teles que mesmo não gostando da parte de campo, me ajudou bastante nas análises, nas demandas que surgiam, me escutando várias vezes nos momentos de insegurança e me dando muito apoio segurando a barra das coisas de casa, obrigada por existir e compartilhar a vida comigo.

A minha orientadora Dr^a Ednilza Maranhão por ser essa pessoa incrível e me acompanhar desde o início da graduação, me orientando em diversos trabalhos acadêmicos, contribuindo diretamente para meu crescimento profissional e mais uma vez acreditar no meu potencial topando encarar esse desafio da realização desse trabalho, sempre me fortalecendo e encorajando a ir em frente.

A minha Co-orientadora Dr^a Lourinalda Oliveira por abraçar a ideia desde início e me ajudar no amadurecimento do projeto, acreditando na minha capacidade, e sempre me acompanhando nas análises com toda paciência do mundo, sempre muito dedicada, o que me deu bastante forças para continuar.

A Arley por me aceitar na ONG Ecoassociados quando eu ainda estava no primeiro período da graduação, possibilitando uma vivência única recheada de aprendizados profissionais que também levo para vida, e por também aceitar em primeiro momento a missão da realização desse trabalho, me dando todo apoio necessário em campo.

Aos amigos da ONG Ecoassociados que estavam comigo nos momentos de campo entrando madrugada adentro para realizar o monitoramento e também as coletas, por muitas vezes várias noites sem dormir, onde o cansaço dominava, mas o amor e a determinação falavam mais alto, obrigada também pelo cuscuz, macarronadas e os momentos compartilhados que levarei comigo sempre.

A minha amiga Thyara que ao me fazer o convite de acompanhá-la nas coletas de campo do seu Doutorado, me proporcionou uma experiência de campo única e que me fez perceber que o que era apenas uma ideia, realmente poderia ser possível colocar em prática, agradeço também pelo apoio, pelas conversas construtivas, por me escutar quando eu achava que não ia dá certo, sempre me dando forças e palavras de incentivo me encorajando a ir até o final.

A todos amigos do LaQAF por todos ensinamentos, ajuda, e por me receber tão bem e sempre acreditando no sucesso desse trabalho.

Aos meus amigos do LIAR que passaram essa fase junto comigo em especial a Emerson Dias, compartilhando momentos e sofrimentos e sempre nos ajudando.

Ao pessoal do trabalho que nesses últimos dias foram muito compreensivos, me dando forças para concluir essa etapa.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram, com uma palavra amiga, um abraço, uma companhia, um momento, e que mesmo estando um pouco longe ou não entendendo muito bem, mas se mantêm por perto e me fortaleceram bastante, obrigada por fazerem parte dessa etapa decisiva da minha vida. Obrigada.

*“Às vezes é preciso dar um passo
atrás no caminho que você acha
que é certo para poder dar
dois passos à frente no caminho
que você tem certeza que é certo”*

- Jonatas Persan

RESUMO

As tartarugas marinhas são animais migratórios que percorrem longas distâncias e apresentam um ciclo de vida complexo. São animais bioindicadores e biocontrolados, contribuindo para a manutenção do ecossistema marinho. Esses animais exercem um grande esforço na escolha do local de desova com objetivo de garantir um sucesso reprodutivo. Das sete espécies que existem no mundo, cinco ocorrem no Brasil, e todas encontram-se classificadas em algum nível de ameaça de extinção. Muitas são as ameaças que as tartarugas enfrentam para poder chegar na fase adulta, uma delas está relacionada a poluição marinha, devido a compostos químicos que tem se tornado uma realidade cada vez mais comum para esses animais. No momento da desova a tartaruga libera um muco de cor clara que reveste todos os ovos, evitando assim o impacto entre um ovo e outro e mantendo a lubrificação da cloaca, todavia a caracterização das propriedades químicas e de toxicidade não foram documentadas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as propriedades químicas, a toxicidade da substância e identificar os metais pesados presentes no muco cloacal das Tartarugas Marinhas. Durante os meses de agosto de 2017 a outubro de 2018, foi realizada a coleta de forma manual do muco cloacal, aconteceu no momento logo após o início da desova, com um auxílio de um tubo falcon 15 ml posicionado abaixo da cloaca. Dez fêmeas foram amostradas, nove da espécie *Eretmochelys imbricata* e uma de *Chelonia mydas*, no litoral do Ipojuca/PE. Esses apresentaram um aspecto físico químico com turbidez em algumas amostras, o seu pH variou de 8,58 a 9,28 com tendência a ser alcalino, através do teste de toxicidade com *Artemias salina*, foi possível identificar uma variação na toxicidade do muco de muito tóxica a levemente tóxica, a quantidade de proteína variou nas amostras em concentrações de 0,27 mg a 5,17 mg. Para metais pesados as maiores concentrações se deu para o Alumínio (35,5 mg/L), seguido do Ferro (28,7 mg/L) e o Cobre com (26,9 mg/L) além desses foram analisados também Manganês (16,1mg/L), Chumbo (15,7 mg/L), Níquel (14 mg/L), Cádmio (13,5 mg/L) e Cromo (12,1 mg/L). As análises mostraram que o muco é um bom material biológico para análise de toxicidade e identificação de metais, todavia há muito o que caracterizar na sua composição química, necessitando a continuidade desse trabalho para monitoramento dos animais, bem como avaliar questões espaço-sazonal desses metais, podendo o muco ser um bom preditor de saúde animal e ambiental.

Palavras chaves: Declínio população, Conservação, Sucesso reprodutivo

ABSTRACT

Sea turtles are migratory animals that travel long distances and have a complex life cycle. They are bioindicators and biocontrol animals, contributing to the maintenance of the marine ecosystem. These animals exert great effort in choosing the spawning site to ensure reproductive success. Of the seven species that exist in the world, five occur in Brazil, and all are classified at some level of threat of extinction. There are many threats that turtles face in order to reach adulthood, one of which is related to marine pollution due to chemical compounds that have become an increasingly common reality for these animals. At the time of spawning the turtle releases a light-colored mucus that coats all eggs, thus avoiding the impact between one egg and another and maintaining cloaca lubrication, however the characterization of chemical properties and toxicity have not been documented. The objective of this work was to characterize the chemical properties, the toxicity of the substance and to identify the heavy metals present in the cloacal mucus of the sea turtles. From August 2017 to October 2018, manual collection of cloacal mucus was performed, which took place immediately after spawning, with the aid of a 15 ml falcon tube positioned below the cloaca. Ten females were sampled, nine from *Eretmochelys imbricata* and one from *Chelonia mydas*, in the coast of Ipojuca / PE. These had a physical chemical aspect with turbidity in some samples, their pH ranged from 8.58 to 9.28 with a tendency to be alkaline, through the mortality numbers of *Artemias salina* nauplii the mucus showed a variation in its toxicity of very Toxic to slightly toxic, the amount of protein varied in the samples in concentrations from 0.27 mg to 5.17 mg, for heavy metals the highest concentrations were for Aluminum (35.5 mg / L), followed by Iron (28 , 7 mg / L) and Copper with (26.9 mg / L) besides these were also analyzed Manganese (16.1 mg / L), Lead (15.7 mg / L), Nickel (14 mg / L), Cadmium (13.5 mg / L) and Chromium (12.1 mg / L). The analysis showed that mucus is a good biological material for toxicity analysis and metal identification, however there is much to characterize in its chemical composition, requiring the continuity of this work to monitor the animals, as well as to evaluate space-seasonal issues of these metals. Mucus may be a good predictor of animal and environmental health.

Keywords: Population decline, Conservation, Reproductive success

LISTA DE FIGURAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 01: *Chelonia mydas*, na praia de Porto de Galinhas – Ipojuca litoral de Pernambuco. 22

Figura 02: *Eretmochelys imbricata* desovando nas praias de Ipojuca/Pernambuco 23

Figura 03: Tartaruga atingida pelo vazamento de petróleo. Fonte: <http://tamar.org.br/interna.php?cod=108> Acesso: 30/07/2018 25

CAPÍTULO 1

Figura 01: Mapa do litoral de Ipojuca/PE. 58

Figura 02: Museu das Tartarugas marinhas, onde funciona a sede da ONG Ecoassociados em Ipojuca/PE Fonte: Ecoassociados 2018 58

Figura 03: Procedimento de coleta do muco cloacal, durante a temporada reprodutiva Agosto 2017 a Maio de 2018, Ipojuca/PE. (A): Verificando se a tartaruga já tinha iniciado a oviposição, afastando a areia. (B): Aguardando o momento que a tartaruga expele a quantidade de muco na hora da desova. (C) Tubo falcon de 15 mL localizado abaixo da cloaca, porém sem tocar na mesma, para não interromper a oviposição. 60

Figura 04: Par de anilhas usadas para marcação nas tartarugas marinhas. Fonte: Ecoassociados 2018 61

Figura 05: Análise das amostras de muco cloacal das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE. (A) Características do muco coletado, armazenado no tubo falcon (B) pHmetro. 61

Figura 06: Análise e organização das amostras do muco cloacal das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE. (1) Ovos de *Artemia salina* colocados para eclodir na água do mar durante um período de 24 horas. (2) Preparação das soluções estoques. (3) 1 mL do 63

muco no balão volumetrico de 10 mL. (4) Água salina usada para produção da solução, onde 1 mL era do muco e 9 mL de água salina. (5) Após adicionar os 10 náuplios em cada amostra, esperava-se 24 horas para contagem da quantidade de mortos.

- Figura 07:** Muco mais solução digestora, antes de ir para estufa. 64
- Figura 08:** Soluções após o período de digestão e 24 horas na estufa a 60°C 64
- Figura 09:** Ilustração de um destilador de Kjeldahl e ponto de viragem 65
- Figura 10:** Reação: Solução do muco após a adição do ácido nítrico 66
- Figura 11:** Amostras mantidas em recipientes de plástico e encaminhadas para o ICP/UFPE 66
- Figura 12:** Equipamento usado para as análises de metais pesado - ICP OES modelo Optima DV 7000 (Perkin Elmer, EUA) 67
- Figura 13:** Variação entre as concentrações demonstrando uma relação entre alguns metais 77
- Figura 14:** Amostras com concentrações mais elevadas de alguns metais pesados. 78

LISTAS DE TABELAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Tabela 01: Classificação da relação de toxicidade com a CE(I)50 33

CAPÍTULO 1

Tabela 01: Informações dos indivíduos coletados na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE, com informações sobre a marcação (anilhas), a praia que ocorreu o flagrante e coleta de material biológico, espécie coletada e CCC (Comprimento Curvilínea da Carapaça) e LCC (Largura Curvilínea da Carapaça) dos animais amostrados. 68

Tabela 02: Características físico químicas do muco cloacal das amostras de tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE, evidenciando a quantidade de muco coletado, o pH do muco e sua característica observada no momento da coleta. 69

Tabela 03: Toxicidade das amostras determinada através do número de mortalidade dos náuplios em cada amostra, quanto maior a mortalidade maior é a toxicidade, C.E é inversamente proporcional a esse valor das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE. 70

Tabela 04: Número de ovos totais, natimortos, ovos não eclodidos e sucesso de eclosão desses ninhos, relacionando com os resultados das análises de proteína bruta do muco. 72

Tabela 05: Resultados das concentrações de metais pesados encontrados no muco cloacal das tartarugas marinhas, através da Análise em Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). 75

Tabela 06: Variação dos intervalos encontrados entre a maior e a menor 75
concentração dos metais nas amostras de tartarugas marinhas registradas
na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE.

Tabela 07: Recaptura de dois animais, identificados através da anilha na 80
temporada 2017-2018, Ipojuca/PE e comparação dos principais metais com
o estudo de Simões (2016)

LISTAS DE QUADROS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Quadro 01 – Descrições das aplicações dos bioensaios de *Artemia salina* 32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REFERENCIAL TEORICO	19
2.1 - Tartarugas Marinhas	19
2.2 - Ameaças as tartarugas marinhas e estudos para sua conservação	23
2.3 - Fisiologia Reprodutiva	27
2.4 - Muco Cloacal	29
2.5 - Teste de toxicidade em sistemas biológicos	30
2.6 - Metais Pesados	33
3. OBJETIVOS	36
4. REFERÊNCIAS	37
CAPITULO 1	53
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1 - Área de estudo	57
2.2 - Coletas de material em campo	59
2.3 - Procedimento para análises	61
2.3.1 - Aspectos físico-químicos	61
2.3.2 - Análise de toxicidade	62
2.3.3 - Análise de proteína bruta	63
2.3.4 - Metais pesados	65
2.3.4.1 - Tratamento de Amostra	65
2.3.4.2 - Análise em Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)	67
2.3.5 - Análise estatísticas	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1 - Coleta de dados de campo	68
3.2 - Aspectos físico-químico	69
3.3 - Análise de toxicidade	70
3.4 - Análise de proteína bruta	71
3.5 - Metais pesados	73
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

5. REFERÊNCIAS	82
6. ANEXO I	89

1. INTRODUÇÃO GERAL

O muco é uma estrutura de origem fisiológica, que pode ser encontrado na forma de fluido ou gel, apresentando diferentes consistências, dependendo do organismo ou órgão que o produz (Vasconcelos, 2011). De forma geral, os mucos produzidos por órgãos animais desempenham funções protetivas, como uma barreira física contra microorganismos e injúria provocada por enzimas e substâncias químicas, prevenindo o estabelecimento de infecções. Algumas glicoproteínas (Mantle e Allen, 1981; Slomiany et al., 1983), oligossacarídeos (Degroote et al., 2003) e inibidor de protease (Ohlsson e Tegner, 1976) já foram isolados destes mucos. Os mucos de invertebrados apresentam um espectro de funções bem mais amplo do que o de vertebrados. Entre suas funções estão o revestimento, para defender contra predadores e contra a dessecação; a navegação, por conter substâncias que indicam direção de casa, acasalamento e predação; a alimentação, por ser uma importante fonte de nutrientes; a locomoção, a adesão e a excreção (Denny, 1989). Algumas proteínas já foram isoladas destes mucos, como uma lectina (Fountain e Campbell, 1984) e a epigramina (Li e Graham, 2007) ambas provenientes do muco de gastrópodes, glicoproteínas anti-adesivas do muco de equinodermos (Bavington et al., 2004), uma lectinamanoose específica da camada mucosa de um coral (Kljajic et al., 1987), uma glicoproteína (Meikle et al., 1987) e mucinas, ambas de mucos de corais (JATKAR et al., 2010).

O ambiente marinho cobre cerca de 70% da superfície da Terra e é um dos ecossistemas mais ricos em termos de diversidade biológica. De acordo com o Registro Mundial de Espécies marinhas (vermes) (Appeltans et al., 2010), cerca de 230.000 espécies marinhas são conhecidas pela ciência, a grande maioria dos quais compreende invertebrados bentônicos. Estes animais são continuamente envolvidos num grande número de interações ecológicas e, portanto, necessitam se defender de agentes patogênicos e predadores, assim como para competir para o espaço, a luz, e nutrientes (Harper et al., 2001). Esta vasta biodiversidade é refletida na diversidade química, o que constitui uma fonte quase ilimitada de novos compostos para a investigação biomédica e o desenvolvimento de potenciais medicamentos (Haefner, 2003).

Historicamente, certos produtos naturais de origem animal têm sido fonte de compostos bioativos que podem agir como drogas terapêuticas. Segundo (Shen et al., 2000) cerca de 30 compostos coletados de organismos marinhos estão sendo avaliados por instituições governamentais e universidades americanas. Para uma análise dos componentes químicos se faz necessário a aplicação de alguns testes para conhecimento, e um deles é a análise toxicológica das substâncias. A toxicologia envolve diversas áreas, como, por exemplo, sociais, biológicas, químicas e forense. A toxicologia estuda o efeito de determinadas substâncias em organismos vivos. Muitas pessoas utilizam diversas substâncias sem ao menos ter conhecimento sobre as suas propriedades. Segundo (Machado et. al. 2008), o conceito de substâncias tóxicas é bastante relativo, pois depende da dosagem e do indivíduo.

As tartarugas marinhas pertencem a mais antiga linhagem de répteis vivos, existindo relatos que comprovam sua presença na Terra há cerca de 180 milhões de anos, época correspondente ao período Triássico. (Lutz e Musick, 1997). Atualmente são encontradas sete espécies de tartarugas marinhas que sobrevivem no mundo sendo elas, *Caretta caretta* (Linnaeus,1758), *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus,1766), *Lepidochelys olivácea* (Eschscholtz,1829) e *Dermochelys coriácea* (Vandelli, 1761), essas se distribuem pelos oceanos tropicais, a *Lepidochelys kempfi* (Garman, 1880) é encontrada no norte da Austrália e a *Natator depressus* (Garman, 1880) é encontrada no golfo do México e Atlântico Norte (Marcovaldi; Laurent, 1996).

As tartarugas marinhas são répteis de vida longa, migradoras de grandes distâncias entre todos os oceanos do mundo. Frequentemente as áreas de alimentação e de reprodução não coincidem e elas devem migrar periodicamente entre elas. Apesar de carismáticas e de grande importância ecológica, são ameaçadas em todo o planeta por problemas diversos que incluem a pesca direcionada ou acidental, coleta de ovos, colisões com embarcações, poluição, doenças entre outros, são conhecidas também por transportar com frequência uma variedade de epibiontes (ICMBio, 2011). Esses animais em geral são conhecidos por voltar ao seu local de nascimento para se reproduzir, e são, portanto, fieis ao seu local de desova. Este comportamento é conhecido como filopatria (Carr,1975).

As atividades humanas são responsáveis por um grande declínio da diversidade biológica do mundo. Nos oceanos, a ameaça à vida ocorre de várias formas: despejo de poluentes, fragmentação de hábitat, introdução de espécies exóticas, atividades pesqueiras, dragagens e a mudança climática intensificada pelo aquecimento global (Derraik, 2002). Tanto tartarugas quanto mamíferos e algumas aves marinhas apresentam alta expectativa de vida e ocupam altos níveis na cadeia alimentar. Numerosos estudos foram realizados nestes grupos de vertebrados nos últimos anos, mostrando sua utilidade como indicadores biológicos de poluição química (Furness; Camphuysen, 1997; Storelli; Marcotrigiano, 2003). Exposição dos organismos marinhos aos metais pesados é um problema grave, pois pode levar a danos sub-letais, como mutações, disfunções endócrinas e imunodepressão, podendo levar o indivíduo à morte (Wallner-Kersanach; Bianchini, 2008; Santamarta, 2001). Metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio são elementos potencialmente tóxicos e que induzem desordens patológicas em organismos, mesmo em concentrações baixas (Storelli et al., 2005). Estudos com muco proveniente da desova, são elementos importante na manutenção dos ovos, sua caracterização química e toxicidade são muito incipientes, necessitando uma descrição.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as propriedades químicas e biológicas presentes no muco cloacal das tartarugas marinhas do litoral do Ipojuca/PE durante a temporada de desovas 2017/2018 no período de agosto 2017 à maio 2018, dando ênfase a análise qualiquantitativa de proteínas, seus aspectos físico-químicos, toxicidade e a presença de metais pesados em suas concentrações.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tartarugas Marinhas

As tartarugas marinhas apresentam fósseis de até 200 milhões de anos. As espécies e gêneros que existem atualmente têm origem entre 10 e 60 milhões de anos atrás. São animais distribuídos em todos os oceanos e mares do mundo,

especialmente em áreas tropicais e subtropicais, apresentando diferentes estágios de vida em áreas de alimentação e áreas de reprodução (Márquez, 1990).

Ao longo de sua evolução, várias modificações permitiram a sobrevivência e adaptação das tartarugas a novos ambientes: o número de vértebras foi reduzido, fusionaram-se as costelas e formou-se uma carapaça de revestimento coriáceo ou córneo. Enquanto algumas permaneceram vivendo em terra, outras buscaram água doce ou migraram para o mar. No caso das tartarugas marinhas, em particular, a carapaça tornou-se mais achatada, ficando mais leve e hidrodinâmica, e as patas transformaram-se em nadadeiras para moverem-se com mais eficiência debaixo d'água. Outra importante adaptação foi o surgimento de glândulas de sal, localizadas próximo aos olhos. As lágrimas observadas em fêmeas em reprodução são, na verdade, secreção de sal expelida através destas glândulas especiais (Lutz, 1997)

As tartarugas marinhas apresentam um ciclo de vida longo e complexo, envolvendo migrações transoceânicas, alternância de habitats e de recursos alimentares. Em linhas gerais, após atingirem a maturidade sexual, com cerca de 20 a 30 anos (Frazer&Ehrhart 1985), os animais adultos migram entre áreas de alimentação para áreas de reprodução (Limpus et.al. 1992). O acasalamento ocorre cerca de dois meses antes do início das desovas. Os machos regressam então às zonas de alimentação, enquanto as fêmeas permanecem nos sítios de desova por cerca de dois meses, período em que realizam de três a seis desovas, em média, com intervalos de cerca de quinze dias (Miller 1997). Porém, não se reproduzem em anos consecutivos (Rossi 2007).

No decorrer de seu processo reprodutivo, as tartarugas têm de buscar locais de desova que possam contar com fatores físicos que propiciem ao mesmo tempo abrigo relativamente seguro para seus ovos e o calor necessário para garantir a incubação e a eclosão dos filhotes (Junior 2009). Todas as espécies de tartarugas marinhas apresentam um mecanismo de determinação do sexo dependente da temperatura durante o período de incubação (temperaturas mais elevadas determinam o nascimento de fêmeas) e todas enfrentam várias ameaças durante o seu período de vida, sendo suscetíveis a impactos antropogênicos em todos os estágios de vida (Hamann et al., 2010).

No Brasil, ocorrem cinco espécies de tartarugas marinhas: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* e *Lepidochelys olivacea*, pertencentes à Família Cheloniidae, e *Dermochelys coriácea*, única representante da Família Dermochelyidae (Meylan&Meylan 2000). Todas são consideradas ameaçadas de extinção em âmbito nacional e mundial, encontrando-se no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do MMA (Ministério do Meio Ambiente), na Lista Vermelha de Espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) onde a *Dermochelys coriácea* e a *Eretmochelys imbricata* estão classificadas no nível mais elevado como criticamente em perigo e no Apêndice I da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*).

As espécies de tartarugas marinhas possuem características bem peculiares como a sua morfologia, habitat, hábitos alimentares e reprodução, o que diferencia uma da outra e contribuem de forma direta para sua identificação. As espécies abordadas no presente estudo, foram a *Chelonia mydas* e a *Eretmochelys imbricata*, duas das que escolhem o litoral de Ipojuca/PE para realizar sua desova.

A *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Figura 01) popularmente conhecida como tartaruga verde ou aruanã, são animais longevos e que possuem maturação sexual tardia (Bolten 1997, Miller 1997, Bjorndal et al., 2000, Chaloupka 2002, Almeida et al., 2011). Estes fatores, associados a um histórico global de exploração de sua carne e de seus ovos levaram à redução de alguns estoques populacionais (Frazier 1980, National Research Council, 1990, Witzell 1994, Limpus 1995, Seminoff et al., 2002). É a única tartaruga marinha herbívora (Brand-Gardner et al., 1999). Supõem que essa espécie na sua fase pelágica é onívora com uma forte tendência carnívora, tornando-se basicamente herbívora em sua fase juvenil a adulto (Chevalier&Lartiges, 2001; Fidelis et al., 2005). Segundo (Bjorndal 1997), a partir dos 25 a 35cm de Comprimento Curvilíneo da Carapaça (CCC) essa espécie inicia uma alimentação herbívora. Em um estudo realizado por (Ferreira 1968) no estado do Ceará, as algas marinhas bentônicas constituíram o alimento básico da *Chelonia mydas*, presente em 88,30% dos estômagos analisados. Apesar de apresentarem uma dieta primariamente herbívora, ocasionalmente essas tartarugas consomem invertebrados (Seminoff et al., 2002). (Castell et al., 2005) sugere que, dados os baixos valores de abundância de itens de invertebrados, presume-se ser um consumo incidental, devido a sua associação com espécies de algas. A dieta herbívora tem importante consequência

para os parâmetros da história de vida e probabilidade de sobrevivência das tartarugas verdes, e essa espécie apresenta importante efeito na ciclagem de nutrientes e na estrutura da comunidade de algas em seu habitat de alimentação (Bjorndal 1997). É também a espécie de tartaruga mais comum em áreas de alimentação no litoral do Brasil (Bellini 1996, Lima et al., 2007, Sanches & Bellini 1999, Godley et al., 2003, Gallo et al., 2006, Grossman et al., 2007).



Figura 01: *Chelonia mydas*, na praia de Porto de Galinhas – Ipojuca litoral de Pernambuco.

A *Eretmochelys imbricata* é conhecida popularmente no Brasil como tartaruga-de-pente, tartaruga-verdadeira ou tartaruga-legítima (Figura 02) e assim como todas as espécies de tartarugas marinhas, apresenta um ciclo de vida complexo, utilizando diferentes ambientes ao longo de sua história de vida, implicando em mudança de hábitos. Embora seja uma espécie marinha, utiliza o ambiente terrestre (praia) para oviposição, garantindo o local adequado à incubação dos ovos e nascimento dos filhotes. Após o nascimento, passa por uma fase pelágica até cerca de 20 cm de comprimento de carapaça; a partir de então, migra para regiões costeiras ou insulares e estabelece uma residência, entrando na fase bentônica, onde se alimenta e se refugia até a maturidade sexual. Os animais adultos cruzam zonas oceânicas durante a migração entre áreas de alimentação e reprodução (Chacón, 2004). Trata-se de uma espécie onívora, que se alimenta em áreas recifais (Carr, 1987). A espécie *E.*

imbricata se alimenta principalmente de crustáceos, moluscos, ouriços, esponjas e algas (Marcovaldi et al., 2011).

Dentre todas as tartarugas marinhas, a *E. imbricata* é uma das espécies que mais sofreu com a exploração, não apenas pelo consumo de sua carne e seus ovos, mas principalmente pelo uso dos escudos de queratina que recobrem sua osteoderme (Meylan, 1999). No fim da década de 70 o preço deste material era superior ao do marfim e mais de 46 países comercializavam a matéria prima, utilizada principalmente para a fabricação de joias e adornos (Mack, et. al. 1979). A demanda mundial pelo casco de tartarugas-de-pente reduziu drasticamente as populações desta espécie (Limpus, 1997).

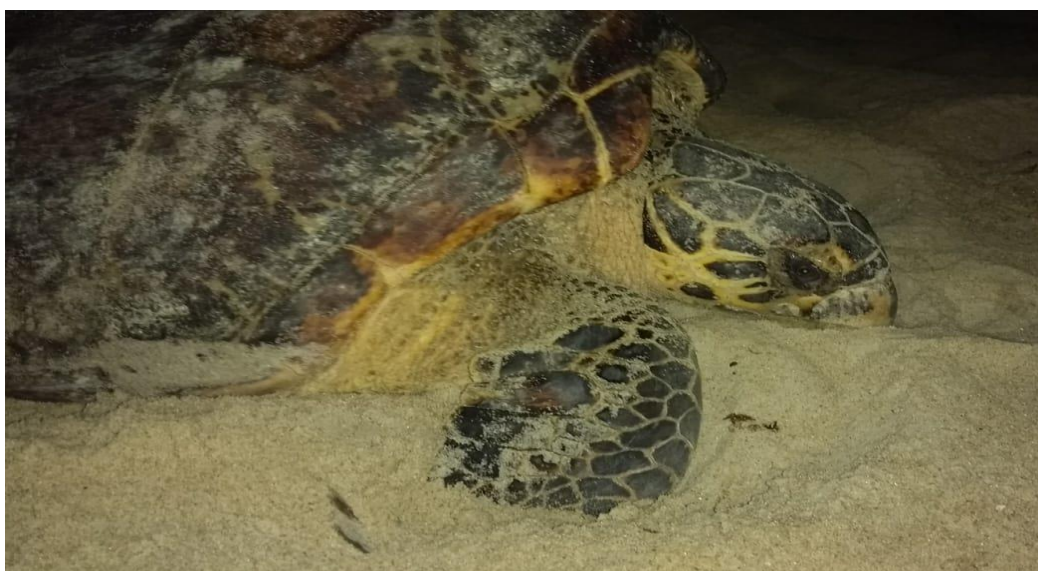


Figura 02: *Eretmochelys imbricata* desovando nas praias de Ipojuca/Pernambuco

2.2 – Ameaças as tartarugas marinhas e estudos para sua conservação

As Tartarugas marinhas foram muito exploradas pelos humanos para servirem de alimento ou para que usassem seu casco e seu couro para produção de artefatos. Hoje, as tartarugas marinhas estão ameaçadas ou em perigo de extinção, devido principalmente à exploração e destruição dos seus habitats naturais. Atualmente, os animais estão protegidos por diversas leis e tratados nacionais e internacionais (Sanches, 1999).

Ao redor do mundo, a sobrevivência de todas as espécies de tartarugas marinhas é ameaçada por uma série de fatores induzidos pelo homem (Marcovaldi & Thomé, 1999). De acordo com (Witherington 1999), a qualidade do habitat de nidificação é fundamental para a reprodução de tartarugas marinhas e para a sua sobrevivência. Em praias de nidificação, esses animais ficam mais susceptíveis à mortalidade por ações humanas nas fases de ovo, nascimento e nidificação das fêmeas e nas águas costeiras nos estágios de subadulto e adulto (National Research Council, 1990).

A situação das diferentes espécies de tartarugas marinhas na lista vermelha da IUCN, decorre principalmente pela relação direta entre as relações do homem e as taxas de mortalidade destas espécies, sejam afetando de diversas formas as áreas de desovas, ou por acidentes com barcos, interação com a pesca, explosões para remoção de plataformas marinhas de extração de petróleo e derivados, além da contaminação por óleos, a ingestão de plásticos e outros materiais de difícil degradabilidade no mar ou por contaminação por elementos químicos nos oceanos (Macêdo, 2012).

A poluição marinha por elementos orgânicos e inorgânicos, como petróleo, lixo e esgoto, acaba interferindo na alimentação, locomoção e no ciclo de vida das tartarugas marinhas (Santos 2012) (Figura 03).



Figura 03: Tartaruga atingida pelo vazamento de petróleo. Fonte: <http://tamar.org.br/interna.php?cod=108> Acesso: 30/07/2018.

Além das ameaças antrópicas, as tartarugas marinhas sofrem impactos por vários tipos de doenças e, dentre elas, a fibropapilomatose (FP) vem sendo uma das mais discutidas e estudadas (Herbst, 1994; Herbst e Jacobson, 2003). Papilomas cutâneos, fibromas e fibropapilomas são as três lesões proliferativas que caracterizam a doença e podem ocorrer tanto externa como internamente (Herbst, 1994). Apesar da doença já ter sido reportada para outras espécies, *C. mydas* é reconhecidamente a mais atingida (Aguirre, 1998; Work et al., 2004; Foley et al., 2005; Chaloupka et al., 2008). Mesmo existindo uma evidência convincente de uma etiologia viral, outros fatores como infestação por parasitas, suscetibilidade genética, carcinógenos químicos, contaminantes ambientais e biotoxinas podem ter um papel adicional na etiologia da FP (Herbst, 1994; Aguirre, 1998).

A falta de conhecimento acerca do grau de ameaça relativa à que cada espécie está sujeita, tem levado a enormes “listas de lavanderia” de ações que, em suma, não contribuem para o sucesso dos planos de conservação. O sucesso dos planos de conservação requer um manejo adequado, que depende do conhecimento de diversos parâmetros demográficos, tais como: recrutamento, taxas de crescimento, probabilidade de sobrevivência e abundância. Os estudos de captura-marcação-recaptura através de anilhas, além de possibilitar medir estes parâmetros (Santos et

al., 2013; Colman et al., 2013), também trazem informações sobre o deslocamento destes animais, evidenciando a conectividade entre áreas frequentemente distantes umas das outras, e realçando a necessidade de medidas de proteção, tais quais tratados internacionais de conservação (Marcovaldi, M.A. et al., 2016).

Como o Brasil apresenta cerca de 8000 km de litoral situado na faixa tropical, apesar da ausência de registro oficial com informação sobre tartarugas marinhas até o final da década de 70, era notório o potencial para ocorrência de testudines marinhos devido à extensão costeira e sua localização. Em resposta a uma pressão internacional e ao desafio enfrentado por alguns jovens oceanógrafos, em 1980 foi criado, por iniciativa governamental, o Programa intitulado Centro Brasileiro de Proteção, Manejo e Pesquisa das Tartarugas Marinhas (Projeto TAMAR); originalmente era vinculado ao extinto Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), posteriormente denominado Instituto Brasileiro dos Recursos Renováveis e Meio Ambiente (IBAMA) e atualmente, após recente divisão deste último, foi alocado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Santos, 2008).

O TAMAR atualmente possui 22 bases pelo Brasil, trabalhando, inicialmente, nas áreas de reprodução. Em 1991, começou o trabalho em áreas de alimentação, em Ubatuba, São Paulo. Esse trabalho é importante, pois as tartarugas passam parte de seu ciclo de vida nesses locais, onde ocorre grande número de capturas incidentais em artes de pesca, o que gera uma alta mortalidade (Marcovaldi & Marcovaldi, 1999).

Com o decorrer dos anos a demanda para atender aos 8000km de litoral brasileiro aumentou, e fez-se necessário a criação de vários projetos e ONG's onde possam dar essa assistência e contribuição para a conservação dessas espécies, com destaque para o Nordeste onde criou-se no ano de 2012 a RETAMANE (Rede de Tartarugas Marinhas do Nordeste) composta por oito instituições que atuam diretamente na conservação das tartarugas marinhas, entre eles a Ecoassociados que atua em Pernambuco, Tartarugas do Delta com atuação no Piauí, Projeto Cetáceos da Costa Branca que realiza o Projeto de Monitoramento de Praia (PMP) na Bacia Potiguar-RN e demais.

2.3 – Fisiologia Reprodutiva

As gônadas, ovários e testículos, produzem os gametas sexuais, e seus ductos transportam os ovos e espermatozoides até a cloaca (Lutz e Musick, 1997). O trato reprodutor feminino consiste em um par de ovários e ovidutos, e seus respectivos ligamentos mesentéricos (mesovário, mesosalpinge e mesotubário). Os ovários e ovidutos imaturos mudam de tamanho e estruturação com o passar da idade, puberdade, e entre as estações reprodutivas e não reprodutivas (Hamann et al., 2003).

Nas fêmeas sexualmente maduras, os folículos presentes nos ovários aumentam de tamanho e adquirem uma coloração amarelada brilhante. Os folículos maiores alongam-se em sentido cranial, ao passo que os menores e imaturos permanecem mais concentrados no terço posterior do ovário. Os folículos atingem a maturidade ao apresentarem 2-3cm de diâmetro (média entre as espécies), momento oportuno às ovulações e acasalamento das fêmeas (Wyneken, 2001). Assim como os ovários, os ovidutos também passam pelo processo de maturação. De simples paredes tubulares delgadas, passam a paredes musculares espessas e móveis com aumento linear do diâmetro luminal. O oviduto aparece dobrado ao longo de todo seu comprimento quando não está ativo. É funcionalmente dividido em cinco regiões: óstio ou infundíbulo, segmento aglandular, magno, concha glandular e vagina (Wyneken, 2001).

Na preparação para o acasalamento, um grupo inteiro de folículos maduros ovula junto, e os oócitos são captados pelo oviduto, na região do infundíbulo. Uma vez no oviduto, cada folículo passa posteriormente pelo segmento aglandular e adentra no magno, onde é recoberto por uma camada de albumina. Após três dias, os folículos passam para a região da concha glandular, onde são secretados proteínas e carboidratos de membrana (córion), além da matriz de “aragonite”, e passam a ser chamados de ovos. Nessa região, onde permanecem aproximadamente seis a sete dias, os ovos adquirem certo grau de calcificação, sendo na sequência depositados na vagina, onde podem permanecer durante vários dias, até que passem pela cloaca e sejam desovados (oviposição) (Wyneken, 2001).

O invólucro do ovo é uma casca porosa que permite trocas gasosas com o meio externo. Aderido à casca, o córion intermedia as trocas gasosas e ainda, gradualmente, transfere o cálcio da casca para o embrião, importante na formação do esqueleto. A membrana amniótica propicia o ambiente aquático necessário ao desenvolvimento embrionário, que é preenchido por um líquido (albumina). O saco vitelínico garante a reserva de nutrientes para a formação do embrião e a vesícula alantoide armazena os resíduos catabólicos gerados durante o desenvolvimento (Larios, 2000).

A puberdade na fêmea inicia-se com o crescimento de pequenos folículos que produzem estrógeno e, aos poucos, vão crescendo e amadurecendo. O estrógeno estimula a produção e a secreção de uma proteína chamada vitelogenina, que, por sua vez, transporta lipídeos, predominantemente triglicérides, para o interior do folículo em crescimento. Esse processo, no qual há o armazenamento progressivo de proteína e lipídeo no interior de folículos, proporciona o amadurecimento dos oócitos e é chamado de vitelogênese. Inicia-se aproximadamente oito a nove meses antes da estação reprodutiva (Guraya, 1989).

As fêmeas podem permanecer acasalando-se por até 25h, copulando com vários machos diferentes (Owens, 1980), comportamento frequentemente observado em águas rasas próximo às praias de desova, podendo o processo de cortejo sexual prévio à cópula durar várias horas (Hirth, 1980) e Limpus (1993), estudando diversos sítios reprodutivos, concluiu que machos e fêmeas podem tanto copular em frente à praia de desova quanto a centenas de quilômetros de distância do local de postura.

Após a ejaculação intravaginal, os espermatozoides seguem pelo oviduto e são abundantemente encontrados no magno e na região aglandular, regiões consideradas reservatório espermático (Solomon e Baird, 1979). O sêmen proveniente de um período de cópula pode ser armazenado e servir para fertilizar subseqüentes liberações de oócitos, resultando em diferentes desovas ao longo de uma estação reprodutiva (Owens, 1980).

O controle da ovulação e o desenvolvimento dos ovos ocorrem por uma série de mecanismos endócrinos. Nova onda de ovulação ocorre 36h após uma oviposição,

coincidindo com a liberação (picos) de gonadotrofinas (LH e FSH) e o decréscimo na concentração de testosterona (Wibbels et al., 1990).

Neste período são também observadas altas concentrações circulantes de metabólitos de algumas substâncias, como da prostaglandina e arginina (Hamann et al., 2003). Ainda são pouco conhecidos os processos fisiológicos envolvidos na oviposição.

2.4 – Muco Cloacal

Tartarugas marinhas, como muitos outros répteis, precisam de um período de desenvolvimento suspenso de modo que os embriões não se formem até oviposição, este tempo permite a criação de mais ovos e de cristais de cálcio para crescer com a espessura correta necessária para o desenvolvimento do embrião, proteção e troca gasosa (Rafferty et al., 2012). Para alcançar o estado de suspensão do crescimento durante o desenvolvimento, acredita-se que um fluido proteico secretado pelo oviduto cobre os poros de ovos, resultando em um estado de hipóxia, suspendendo o desenvolvimento do embrião na tartaruga mãe até a oviposição (Rafferty et al., 2012). É possível que este estado de hipóxia poderia ajudar a defender os ovos em desenvolvimento de potenciais bactérias aeróbias localizados na mãe no momento da formação do ovo (Keene, 2012).

Observa-se também que um muco claro que reveste os ovos é secretado da cloaca durante oviposição (Bustard e Greenham 1969). Esta secreção glicoproteica é produzida pelo epitélio superficial da seção do oviduto também (Aitken e Solomon 1976). O que nos faz acreditar que o muco (fluido) citado em dois momentos distintos, trata-se na verdade do mesmo. Segundo (Ewert, 1985) ovos de tartaruga de água doce lavados que estavam livres do muco sucumbem à infecção mais facilmente que os ovos revestidos sugerindo que pode ter propriedades anti-patogênicas.

Miller e Limpus, (2003) afirmam que o fluido da cloaca, que preenche os poros da casca do ovo e mantém o ovo em um estado hipóxico no oviducto da fêmea, agora drena por ação capilar, para entorno do ovo depositado ou para dentro no interior do material, para se tornar parte da camada de fluido no interior da membrana interna da

casca. Neste ponto, os poros da casca de ovo estão disponíveis para a troca gasosa e seguem para desenvolvimento normal.

Estudando o conteúdo de desovas de 39 espécies de moluscos marinhos, Benckendorf (2001) observou que extratos de desova de 32 dessas espécies causaram inibição do crescimento de patógenos, tanto humanos quanto marinhos. Segundo Bergsson et al., (2005), o muco que recobre a epiderme do bacalhau *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758) apresentou atividade microbicida quando aplicado em colônias de *Bacillus megaterium* (Bary, 1884), *Escherichia coli* (Migula, 1895) e *Candida albicans* (Berkhout, 1923), ressaltando ainda que, nesta última espécie, a eliminação foi total.

Segundo Rollo & Wellington (1979) e Reidenbach et al., (1989), a quantidade de muco exsudado por lesmas aumenta quando são atacadas por competidores, predadores e alguns parasitas. A exsudação pode ser estimulada mecanicamente com facilidade (Pakarinen, 1994), porém o fluxo cessa em poucos minutos e não mais se refaz antes de 24 horas (Deyrup-Olsen & Martin, 1982, Martin & Deyrup-Olsen, 1986). Pakarinen (1994) observou que espécimes das lesmas *Arion fasciatus* (Nilson, 1823) e *Deroceras reticulatum* (Muller, 1774) levam quatro segundos, em média, para ativar o fluxo de muco após o estímulo mecânico.

Poucas são as informações sobre a função, constituição, e características do muco cloacal expelido pelas tartarugas no momento da desova, o que nos leva a enfatizar ainda mais a importância desse estudo, visto que o muco está em contato diretamente com o embrião desde o momento de sua formação ainda no oviduto e se prolonga até o momento da desova, podendo desempenhar várias funções durante esse processo.

2.5 – Teste de toxicidade em sistemas biológicos

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (Barosa, 2003). Dentre as várias técnicas existentes, sempre compreendem uma série de dados que podem ser obtidos por meio de microrganismos e animais de laboratório ou seres

humanos, visando classificar a toxicidade de uma ou mais substâncias químicas. Em outras palavras trata-se de um bioensaio preliminar, mas essencial no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações com o organismo (Freitas de Oliveira, 2008).

O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos é o agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador, geralmente ratos ou coelhos. Mas, os testes que utilizam esses animais apresentam desvantagens, como a grande quantidade de amostras utilizadas e os custos elevados (Rios, 1995; Freitas de Oliveira, 2008; Barosa, 2003). Em toxicologia, dose letal mediana (DL50 ou LD50, do inglês Lethal Dose) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50 % de uma população em teste [normalmente medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados (mg/kg =ppm). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam DL50 abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* (Meyer et al., 1982).

Artemia salina é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70%. Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas (IPIMAR-2018). Quando reidratados os ovos de *Artemia salina* eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica. O (Quadro 01) apresenta as aplicações dos ensaios de letalidade frente *Artemia salina*.

Quadro 01 – Descrições das aplicações dos bioensaios de *Artemia salina*

Aplicação bioensaio com <i>Artemia salina</i>	Referências
Análise da toxicidade de resíduo de pesticida	MICHAEL et al., 1956; TARPLEY, 1958; AREEKUL e HARWOOD, 1960; GROSCH, 1967
Análise da toxicidade de águas correntes	HOOD et al., 1960
Análise da toxicidade de fármacos	ROBINSON et al., 1965; RICHTER e GOLDSTEIN, 1970
Análise da toxicidade de substâncias tóxicas em ambientes marinhos	VANHAECKE et al., 1981
Análise da toxicidade de toxicinas	GRANADE et al., 1976
Análise da toxicidade de dispersantes do petróleo	ZILLIOUX et al., 1973
Análise da toxicidade de extratos medicinais	MEYER et al., 1982; NASCIMENTO et al., 2008
Análise da toxicidade de óleos essências	SILVA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 1998; MAYORGA et al., 2010
Análise da toxicidade de compostos fenólicos em efluentes	GUERRA, 2001
Análise da toxicidade de resíduo de remoção de corantes	FURLÁN et al., 2010 PALÁCIO et al., 2009
Análise da toxicidade de água para consumo com cianobactériaas	DOUMA et al., 2010

Fonte: Araujo, 2015.

Alguns autores tentaram estabelecer faixas de toxicidade a fim de classificar os lançamentos de efluentes por níveis de toxicidade. Segundo Bulich e colaboradores (1982) quatro classes podem ser utilizadas. Na (Tabela 01) são apresentadas as classes de toxicidade, conforme o entendimento de Bulich e suas respectivas faixas de acordo com o valor da CE(I)50. Desse modo, é possível classificar o tipo de efluente variando entre muito tóxico até não tóxico.

Tabela 01: Classificação da relação de toxicidade com a CE(I)50

Valores de CE(I)50	Valores de CE(I)50
Classe das Amostras	Classe das Amostras
<25%	Muito Tóxica
25% - 50%	Tóxica
51%-75 %	Moderadamente Tóxica
>75%	Levemente Tóxica
Não Tóxica	Não Tóxica

O valor de CE (concentração efetiva) é inversamente proporcional a toxicidade da amostra, isto é, quanto menor o valo de CE, maior a toxicidade da amostra (Knie & Lopes, 2004; CETESB, 1986; ABNT 12713, 1993 e 2004; Zagatto & Bertolotti, 2006)

2.6 – Metais Pesados

O termo metal pesado é empregado para designar os elementos químicos eletropositivos que são, em geral, sólidos brilhantes e bons condutores de calor e de eletricidade. Quimicamente eles são elementos situados à direita e ao centro da tabela periódica, cujas características se baseiam na estrutura eletrônica do composto. Por meio de ligações metálicas que ocorrem entre átomos de um mesmo metal formam-se estruturas cristalinas que tem sido de grande valia para o homem (Hueza, et al., 2008). Os elementos metálicos são altamente reativos com as outras moléculas

doadoras de elétrons, sendo encontrados na natureza na forma orgânica, ligados a moléculas que apresentam pelo menos um átomo de carbono ou na forma inorgânica, ligados a iodetos, sulfetos e outros sais. Mais raramente, também podem ser encontrados em seu estado elementar ou metálico. Por causa dessas características químicas, os metais têm sido amplamente utilizados na confecção da mais variada gama de produtos, tais como tintas, baterias secas e automotivas, cloro e soda, antifúngicos, praguicidas, conservantes de madeira e até mesmo fármacos (Hueza, et al., 2008).

A bioacumulação de metais pesados em organismos marinhos é uma realidade ocasionada pela poluição dos oceanos, principalmente por efluentes domésticos e industriais. Os elementos traço podem ser bioconcentrados diretamente na água por organismos filtradores ou peixes, ou bioacumulados através da cadeia alimentar, ou seja, biomagnificado a cada nível da cadeia, sendo os organismos de topo de cadeia os que possuem maior contaminação. Os organismos que vivem próximos a costa, são mais suscetíveis à exposição a esse tipo de poluentes pela proximidade a áreas de uso e ocupação humana (Wallner-Kersanach; Bianchini, 2008). A exposição dos organismos marinhos aos metais pesados é um problema grave, pois pode levar a danos sub-letais, como mutações, disfunções endócrinas e imunodepressão, podendo levar o indivíduo à morte (Wallner-Kersanach; Bianchini, 2008; Santamarta, 2001). Metais pesados como cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) são elementos potencialmente tóxicos e que induzem desordens patológicas em organismos, mesmo em concentrações baixas (Storelli et al., 2005). A contaminação de tartarugas marinhas por metais é conhecida e observa-se que Hg, Cd, Pb são alguns dos elementos assinalados, onde a contaminação ocorre principalmente através da alimentação, sendo o hábito alimentar o mais importante (Sakai et al., 2000).

As tartarugas marinhas oferecem um número particular de vantagens como indicadoras de poluição por metais pesados, pois possuem uma vida bastante longa e, conseqüentemente, maior tempo de exposição a locais contaminados. Como as espécies de tartarugas marinhas ocupam diferentes níveis na teia trófica, elas podem oferecer um perfil bastante abrangente de contaminação dentro deste sistema de fluxo energético. Da mesma forma, o comportamento migratório pode oferecer um quadro

ambiental de distintas localidades do globo. Registros recentes têm documentado que a poluição marinha por resíduos plásticos, petróleo, metais pesados e organoclorados exerce um importante papel no declínio das populações de tartarugas marinhas (Bjorndal et al., 1994; Herbst et al., 1995). Dentre estes metais pesados estão o Alumínio (Al), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Cromo (Cr) e Níquel (Ni).

Não existem evidências confirmadas de que o Al possua alguma função essencial em animais ou seres humanos (OMS, 1998; WHO, 1997). Estudos realizados indicam que as pequenas quantidades absorvidas das dietas normais são excretadas pelos rins de indivíduos saudáveis, de modo que nenhuma acumulação ocorra. No entanto, quando a sua excreção é deficitária, pode acumular-se afetando a formação óssea do esqueleto (OMS, 1998). O Pb não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo, e seus feitos tóxicos sobre os homens e animais já são conhecidos há muito tempo (XIE et. al., 1998; Moreira&Moreira, 2004). O metal pode afetar, praticamente, todos os órgãos e sistemas do organismo humano, incluindo alterações nos sistemas neurológico, hematológico, metabólico e cardiovascular.

O Cd é um metal não essencial, de alta toxicidade e de difícil excreção (Kalay e Canli 2000; Costa e Hartz 2009). Mesmo em níveis baixos, pode causar disfunção fisiológica em peixes impossibilitando sua sobrevivência no ambiente (Lima Jr et al., 2002). Esse metal é considerado um poluente persistente e acumula-se principalmente nos rins e no fígado de mamíferos provocando irritações graves no estômago, vômitos e diarreias, enfraquecimento dos ossos, tornando-os mais vulneráveis às fraturas e até a morte. Pesquisas observaram o aumento da pressão arterial, a diminuição dos níveis de ferro no sangue, enfermidades hepáticas e danos cerebrais ou ao sistema nervoso central nos animais que o ingeriram por via oral. (Manzini et al. 2010)

Devido à grande quantidade de Cu liberado na atmosfera (75.000 toneladas), a contaminação por Cu é inevitável (Moore et al., 1997). Os animais aquáticos, como os peixes por exemplo quando expostos a concentrações elevadas de cobre, podem apresentar anomalias corporais, no crescimento e um aumento na mortalidade de embriões (Heath, 1995; Hansen et al., 2002). O ferro é um nutriente essencial presente

em diversos alimentos. De 60 – 70% do ferro total presente em seres humanos encontra-se associado à hemoglobina (OMS, 1998).

Já o manganês tanto é um ativador como um constituinte de várias enzimas. Atua ainda na síntese de lipídios, na síntese de hormônios da tireóide, entre outras funções (OMS, 1998). O manganês é com frequência considerado como um dos elementos traço de menor toxicidade e, isto, relaciona-se com a forma química (Mn^{2+} e Mn^{4+}) administrada, variando consideravelmente os efeitos adversos. No entanto, quando presente em concentrações elevadas, decorrentes de exposição via oral, pode causar alucinações e doenças do sistema nervoso central (Pais e Benton, 1997; OMS, 1998).

Vários estudos sobre a toxicidade do Cr foram realizados com espécies aquáticas, tais como, peixes e microcrustáceos. O cromo pode deixar os peixes mais suscetíveis a infecções em decorrência de alterações no sistema imunológico, e as concentrações elevadas podem danificar e ou acumular-se em vários tecidos desses animais (THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1988). Concentrações elevadas de níquel em tecidos têm sido associadas com quadros clínicos de infarto do miocárdio, toxemia e câncer (OMS, 1998; IPCS, 1991).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as propriedades químicas, sua toxicidade e identificar os metais pesados presentes no muco cloacal das Tartarugas Marinhas.

3.2 Objetivos específicos:

* Quantificar as proteínas totais presentes no muco cloacal, secretado pelas tartarugas marinhas no momento da desova;

* Verificar a toxicidade do muco cloacal, secretado pelas tartarugas marinhas frente *Artemia salina* através de bioensaios;

* Verificar se ocorre diferenças na quantidade de proteínas totais e metais pesados entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies diferentes no muco cloacal, secretado pelas tartarugas marinhas;

* Correlacionar as propriedades químicas de toxicidade entre os metais registrados na amostra, bem como verificar se houve diferenças entre as amostras.

4. REFERÊNCIAS

ABNT NBR 12713; **Água - ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, crustácea)**, 1993.

ABNT NBR 12713; **Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Cmstacea)**. 2004.

AGUIRRE, A.A. **Fibropapilomas en Tortugas Marinas: un Taller del XVIII Simpósio anual sobre la biología y la conservación de las tortugas marinas**. Noticiario de Tortugas Marinas 82, pp. 10-12.1998

AITKEN, R.N.C.; SOLOMON, S.B. **Observations on the ultrastructure of The oviduct of the Costa Rican green turtle (*Chelonia mydas*)**. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 21: 75-90.1976.

ALMEIDA, A.P.; SANTOS A.J.B.; THOMÉ, J.C.A.; BELLINI, C. **Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira 1: 12 – 19. ICMBio. 2011

APPELTANS, W.; BOUCHET, P.; BOXSHALL, G.A.; FAUCHALD, K .; GORDON, D.P.; HOEKSEMA, B.W.; POORE, G.C.B.; VANSOEST, V.M.; STÖHR, S.; WALTER, T.C.; COSTELLO, M.J. **Registro Mundial de espécies marinhas**. 2010. Disponível em <<http://www.marinespecies.org>>. Acesso em: 4 agosto 2018.

BAROSA, J.; FERREIRA, A.; FONSECA, B.; SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*** – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003.

BAVINGTON, C.D.; LEVER, R.; MULLOYC, B.; GRUNDYA, M.M.; PAGE, C.P.; RICHARDSON, N.V.; MCKENZIE, J.D. **Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 139: 607– 617, 2004.

BELLINI, C. **Reproduction and Feeding of Marine Turtles in the Fernando de Noronha Archipelago. Brazil**. Mar Turtle News 74: 12-13. 1996.

BENCKENDORF, K. **Antimicrobial compounds from marine molluscs**. In: World Congress of Malacology, 14, 19-25.08.2001, Vienna, Austria: University of Vienna; 2001.

BERGSSON, G.; AGERTBERTH, B.; JÖRNVALL, H.; GUDMUNDSSON, G. H. **Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*)**. FEBS Lett.; 272: 4960-4969. 2005.

BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A. B.; LAGUEUX, C. J. **Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitats**. Marine Pollution Bulletin, [Oxford, Inglaterra], v. 28, n. 3, p. 154-158. 1994.

BJORNDAL, K.A. **Foraging ecology and nutrition of sea turtle**. p.199-231. In: Lutz P.L. & Musick J.A. (Eds), The Biology of Sea Turtle. Marine Science Series, New York. 1997.

BJORNDAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; CHALOUPKA, M. **Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence**. Ecol Appl 10 (1): 269-282. 2000.

BOLTEN, A.B. **Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages**. In: LUTZ PL, MUSICK JA (ed.) The Biology of Sea Turtles Vol III CRC Marine Science Series CRC Press. Boca Raton. Florida. 1997.

BRAND-GARDNER S.J., LANYON J.M. & LIMPUS C.J. **Diet selection by immature green turtles, *Chelonia mydas*, in subtropical Moreton Bay, South-East Queensland.** Aust. J. Zool. 47: p.181-191. 1999.

BULICH, A. A. **A practical and realible method for monitoring the toxicity of aquatic samples.** Process. Biochem. March/April. 45-47. 1982.

BUSTARD, H.; GREENHAM, P. **Nesting behavior of the green sea turtle on a Great Barrier Reef island.** Herpetológica 25: 93-102.1969.

CARR, A. **Impact of Nondegradable Marine Debris on the Ecology and Survival Outlook of Sea Turtles.** Marine Pollution Bulletin, v.18, n. 6B, p. 352-356, 1987.

CARR, A. **The Ascension Island Green Turtle Colony.** Copeia. v.1975, n.3, p.547-555. 1975.

CASTELL, E.D.; LÓPEZ-MENDILAHARSU, M.; IZQUIERDO, G. **Hábitos Alimentarios de Juveniles de Tortuga Verde (*Chelonia mydas*) em Cerro Verde, Rocha-Uruguay.** Anais II Jornada de Conservação e Pesquisa de Tartarugas Marinhas no Atlântico Sul Ocidental, Praia do Cassino, Brasil, p.15-18. 2005.

CETESB L5.018. **Água - Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, Claus 1876 (Cladocera, Cmstacea).** 27p. (Norma Técnica), 1986.

CHACÓN, D. **La tortuga Carey Del Caribe – Introduccón a su biología e estado de conservación.** WWF – Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. 2004.

CHALOUPKA, M. **Stochastic simulation modeling of southern Great Barried Reef green turtle population dynamics.** Ecol Model 148: 79-109. 2002.

CHALOUPKA, M.; WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; MURAKAWA, S.K.K.; MORRIS, R. **Cause-specific temporal and spatial trends in green sea turtle strandings in the Hawaiian Archipelago (1982–2003).** Marine Biology 154, pp. 887–898. 2008.

CHEVALIER, J.; LARTIGES, A. **Les Tortues Marines des Antilles**. Ed. Office National de La Chasse et de la Faune Sauvage. CNERA Faune d'Outre Mer, Paris. 59p. 2001.

COSTA, S.C.C.; HARTZ, S.M. **Evaluation of trace metals (cadmium, chromium, copper and zinc) in tissues of a commercially important fish (*Leporinus obtusidens*) from Guaíba lake, southern Brazil**. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 241-250. 2009.

COLMAN, L. P. et al. **Crescimento, sobrevivência e abundância de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) juvenis no Brasil: evidências a partir de marcação e recaptura**. In: VI JORNADA Y VII REUNIÓN DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN DE TORTUGAS MARINAS EN EL ATLÁNTICO SUR OCCIDENTAL In (ASO), 2013, Piriápolis, Uruguay. LIBRO DE RESUMENES DE VI JORNADA Y VII REUNIÓN DE CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN DE TORTUGAS MARINAS EN EL ATLÁNTICO SUR OCCIDENTAL (ASO), Piriápolis, Uruguay sem editora, 2013. p. 113.

DEGROOTE, S.; MAES, E.; HUMBERT, P.; DELMOTTE, P.; LAMBLIN, G.; ROUSSEL, P. **Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis**. Biochimie, 85: 369–379, 2003.

DENNY, M.K. **Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms**. Symp Soc Exp Biol. 43: 337-66, 1989.

DERRAIK, J.G.B. **The pollution of the marine environment by plastic debris: a review**. Marine Pollution Bulletin, [Oxford, Inglaterra], v. 44, p. 842-852. 2002.

DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN, A. W. **Surface of exudation in terrestrial slugs**. **Comp. Biochem. Physiol**; 72C: 45-51.1982.

EWERT, M. A. **Embryology of turtles**. In: Gans C., Billett F. and Maderson P.P.A. (eds). Biology of the Reptilia Vol. 14. John Wiley and Sons, New York. P p.76-267.1985.

FERREIRA, M.M. **Sobre a alimentação da aruana, *Chelonia mydas* Linnaeus, ao longo da costa do estado do Ceará.** Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará 8(1):83-86.1968.

FIDELIS, S.V.; BALLABIO T.A.; GUEBERT F.M. **Análise da relação corporal do trato gastrointestinal da *Chelonia mydas* (tartaruga verde) juvenil do litoral do Paraná.** Anais II Congr. Bras. Oceanografia, Vitória, p.1-3. 2005.

FOLEY, A.; SCHROEDER, A.; REDLOW, A.; FICK-CHILD, K.; TEAS, W. **Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980–98): trends and associations with environmental factors.** Journal of Wildlife Diseases 41, pp. 29–41.2005.

FOUNTAIN, D.W.; CAMPBELL, B.A. **A lectin isolate from mucus of *Helix aspersa*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B.77 (2): 419-425, 1984.

FRAZER, N.B.; EHRHART, L.M. **Preliminary growth models for green, *Chelonia mydas*, and loggerhead, *Caretta Caretta*, turtles in the wild.** Copeia, 1: 73-79. 1985.

FRAZIER, J. **Exploitation of Marine Turtles in the Indian Ocean.** Hum Ecol 8 (4): 329-370. 1980.

FURNESS, R. W.; CAMPHUYSEN, K. C. J. **Sea birds as monitors of the marine environment.** ICES Journal of Marine Science, [London], v. 54, p. 726-737. 1997.

GALLO, B.M.G.; MACEDO, S.; GIFFONI, B.B.; BECKER, J.H. **Sea Turtle Conservation in Ubatuba Southeastern Brazil a feeding área with incidental capture in coastal fisheries.** Chel Conserv Biol 5(1): 93-101.2006.

GODLEY, B.J.; LIMA, E.H.S.M.; AKESSON, S.; BRODERICK, A.C. **Movement patterns of Green turtles in Brazilian coastal Waters described by satellite tracking and flipper tagging.** Mar Ecol Prog Ser 253: 279-288. 2003.

GROSSMAN, A.; MENDONÇA, P.; COSTA, M.R.; BELLINI, C. **Morphometrics of the green turtle (*Chelonia mydas*) at the Atol das Rocas Marine Biological Reserve. Brazil.** Marine Turtle News 118: 12-13.2007.

GURAYA, S. S. **Ovarian follicles in reptiles and birds.** Heidelberg: Springer-Verlag. 21p.1989.

HAEFNER, B. **Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates.** Drug Discovery Today, London, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.

HAMANN, M.; GODFREY, M.H.; SEMINOFF, J.A.; ARTHUR, K.; BARATA, P.C.R.; BJORN DAL, K.A.; BOLTEN, A.B.; BRODERICK, A.C.; CAMPBELL, L.M.; CARRERAS, C.; CASALE, P.; CHALOUPKA, M.; CHAN, S.K.F.; COYNE, M.S.; CROWDER, L.B.; DIEZ, C.E.; DUTTON, P.H.; EPPERLY, S.P.; FITZSIMMONS, N.N. et al. **Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century.** Endanger. Species Res. 11: 245–269. 2010.

HAMANN, M.; LIMPUS, C.J.; OWENS, D.W. **Reproductive cycles of males and females.** In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken, J. (Ed.). *The Biology of sea turtle II.* Boca Raton, FL: CRC Press. p.135-161. 2003.

HANSEN, J.A.; LIPTON, J.; WELSH, P.G.; MORRIS, J.; CACELA, D.; SUEDEKAMP, M.J. **Relationship between exposure duration, tissue residues, growth, and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles sub-chronically exposed to copper.** Aquatic Toxicology, v. 58, p. 175-188, 2002.

HARPER, M. K.; BUGNI, T. S.; COPP, B. R.; JAMES, R. D.; LINDSAY, B. S.; RICHARDSON, A. D.; SCHNABEL, P. C.; TASDEMIR, D.; VANWAGONER, R. M.;

VERBITSKI, S. M.; IRELAND, C. M. **Introduction to the chemical ecology of marine natural products**. In: MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. (Ed.). Marine chemical ecology. Boca Raton: CRC Press, p. 3-69. 2001.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. 2.ed. CRC Press, Lewis publishers. 342p, 1995.

HERBST, L.H., **Fibropapillomatosis of marine turtles**. Annual Review of Fish Diseases 4, pp. 389–425. 1994.

HERBST, L.H.; KLEIN, P. A. **Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental confactors**. Environmental Health Perspectives, [Pittsburgh], v. 103, n. 4, p. 27- 30, mai. 1995.

HERBST, L.H., JACOBSON, E.R. **Practical approaches for studying sea turtle health and disease**. In: Lutz, P.L.; Musick, J.A. e Wyneken, J. (Eds.), The biology of sea turtle, Volume II. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2003, pp. 385–410

HIRTH, H.F. **Some aspects of the nesting behaviour and reproductive biology of sea turtles**. Am Zool, v.20, p.507, 1980.

HUEZA, I. M.; SANT'ANA, M. G.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia do chumbo, mercúrio, arsênio e outros metais**. In: Spinosa, H. S.; Górnaiak, S. L.; Palermo-Neto, J. (Ed.). Toxicologia aplicada à medicina veterinária. São Paulo: Manole. p. 641-662.2008.

IPIMAR - Instituto de Investigação das Pescas e do Mar – Disponível em: http://ipimariniap.ipimar.pt/crips/estacao_piscicultura/artemia.html - Acesso em: 17 de agosto de 2018

JATKAR, A.A.; BROWN, B.E.; BYTHELL, J.C.; GUPPY, R.; MORRIS, N.J.; PEARSON, J.P. **Coral mucus: The properties of its constituent mucins**. Biomacromolecules. 11: 883-888, 2010.

JÚNIOR, P.D.F. **Efeitos de Fatores Ambientais na Reprodução de Tartarugas.** Acta Amazônica, vol. 39(2). p.319 – 334. 2009.

KALAY, M.; CANLI, M. **Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*.** Turkish Journal of Zoology, 24: 429-436. 2000.

KEENE, E. L. **Microorganisms from sand, cloacal fluid, and eggs of *Lepidochelys olivacea* and standard testing of cloacal fluid antimicrobial properties.** 2012.139p. (Monografia) Indiana University – Purdue University Fort Wayne.

KLJAJIC, Z.; SCHRODER, H. C.; ROTTMANN, M.; CUPERLOVIK, M.; MOVSESIAN, M.; UHLENBRUCK, G.; GASIC, M.; ZAHN, R.K.; MULLERZ, W. E. G. **A D-mannose specific lectin from *Gerardia savaglia* that inhibits nucleocytoplasmic transport of mRNA.** Eur. J. Biochem.169: 97-104, 1987.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.; **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, 289 p.: il. 2004.

LARIOS, H. M. **Determinación del sexo en crías.** In: ECKERT, K. L.; BJORNADAL, K. A.; GROBOIS, F. A. A.; DONNELLY, M. (Ed.) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. 4. ed. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas. Cap. 4, p.150-154.2000.

LI, D.; GRAHAM, L.D. **Epiphragmin, the major protein of epiphragm mucus from the vineyard snail, *Ceruella virgata*.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Biochemistry and Molecular Biology 148: 192–200, 2007.

LIMA JR, R.G.S.; ARAÚJO, F.G.; MAIA, M.F.; PINTO, A.S.S.B. **Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande bays, Rio de Janeiro, Brazil.** Environmental Research, 89: 171-179. 2002.

LIMA, E.H.S.M.; MELO, M.T.D.; SPIANDORIN, M.; SANTANA, L.M.B.M. **Segundo Levantamento de encalhes de tartarugas marinhas registradas pelo Projeto TAMAR IBAMA no Litoral do Ceará durante os anos de 2005 e 2006.** In: Resumos do XII Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar- XII COLACMAR. Florianópolis-SC.2007.

LIMPUS, C. J. **Marine turtle populations of Southeast Ásia and the western Pacific region: distribution and status.** In: NOOR, Y. et al. Proc. Workshop on Marine Turtle Research and Management in Indonesia. Bogor, Indonesia. Wetlands Int'1. PHP a Environment Australia, p. 37–73. 1997.

LIMPUS, C.J. **Global overview of the status of marine turtles: a 1995 viewpoint.** In: Bjorndal KA (ed) Biology and conservation of sea turtles, 2nd edn. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, p 605–610. 1995.

LIMPUS, C.J.; MILLER, J.D.; PARMENTER, C.J.; REIMER, D.; MCLACHLAN, N.; WEBB, R. **Migration of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from eastern Australian rookeries.** Wildlife Research, 19: 347- 358. 1992.

LIMPUS, C.J. **The green turtle (*Chelonia mydas*) in the Queensland: breeding males in southern Great Barrier Reef.** Wildlife Res, v.20, p.513-523, 1993.

LUTZ, P. L. **Salt, water, and pH balance in the sea turtle.** In: Lutz, P. L.; Musick, J. A. (eds.). The Biology of Sea Turtles. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 343–361, 1997.

MACÊDO, G.R. **Distribuição de elementos traço nos tecidos de tartarugas de pente (*Eretmochelys imbricata*) e tartarugas verde (*Chelonia mydas*) no litoral norte da Bahia, Brasil.** 2012. 75p.Dissertação (Mestrado em Ciência animal nos trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MACHADO J.C.; VAL, A.M.G.; NASCENTES, C.C. **Segurança e Técnicas de Laboratório I**. 2008. 154 f. (LIVRO) – Universidade Federal de Minas Gerais

MACK, D.; DUPLAIX, N.; WELLS, S. **The sea turtle: an animal of divisible parts. Internatinal trade in sea turtles products**. Washington, DC: TRAFFIC (USA) World Wild Report 1:1–86, 1979.

MANZINI F.F.; SÁ K. B.; PLICAS L. M. A. **Metais pesados: fonte e ação toxicológica**. Fórum ambiental da alta Paulista. v 06. p. 800-815. 2010

MANTLE, M.; ALLEN, A. **Isolation and characterization of the native glycoprotein from pig small-intestinal mucus**. Biochem. J. 195: 267-275, 1981.

MARCOVALDI, M.A.; LAURENT, A. **A six season study of marine turtle nesting at Praia do Forte, Bahia, Brazil, with implications for conservation and management**. Chelonian Conservation and Biology n.2, p. 55-59, 1996.

MARCOVALDI, M. A. & MARCOVALDI, G. G. D. **Marine Turtles of Brazil: the History and Structure of Projeto TAMAR-IBAMA**. Biological Conservation, vol. 91, p. 35-41, 1999

MARCOVALDI, M. A. G.; J. C. A. THOMÉ. **Reducing threats to turtles**. In: Eckert, K. L.; Bjorndal, K. A.; Abreu-Grobois, F. A.; Donnelly, M. (Eds.). Research and manegement techniques for the conservation of sea turtles. Pp. 165-168. (IUCN-SCC Marine Turtle Specialist Group, publication n°04).1999.

MARCOVALDI, M. A.; LOPEZ, G. L.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; SANTOS, A. S.; LOPEZ, M. **Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, (I): 20-27. 2011.

MARCOVALDI, M.A.; THOMÉ, J.C.A.; BELLINI, C.; SILVA, A.C.C.D.; SANTOS, A. J. B.; LIMA, E. H. S. M.; FEITOSA, R. S. C.; GOLDBERG, D. W.; LOPEZ, G.; MARCOVALDI, G.; **A conservação e pesquisa das tartarugas marinhas no nordeste brasileiro pelo projeto TAMAR**. Cap. 1 – Livro: Conservação de tartarugas

marinhas no nordeste do Brasil: Pesquisas, desafios e perspectivas, editora universitária UFRPE, p.219. 2016.

MÁRQUEZ, M. R. **Sea Turtles of the World. An annotated and illustrated catalogue of sea turtles species known to date.** FAO Fisheries Synopsis, vol. 125, nº 11, Rome, FAO. 1990.

MARTIN, A. W.; DEYRUP-OLSEN, I. **Function of the epithelial channel cells of body wall of a terrestrial slug, *Ariolimax columbianus*.** J. Exp. Biol; 121: 301-14.1986.

MEIKLE, P.; RICHARDS, G.N.; YELLOWLEES, D. **Structural Determination of the oligosaccharide side chains from a glycoprotein isolated from the mucus of the coral *Acropora Formosa*.** The Journal of Biological Chemistry, 262 (35): 16941 – 16947, 1987.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents.** Journal of Medical Plant Research, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MEYLAN, A. B. **Status of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region.** Chelonian Conservation and Biology v. 3, n. 2, p. 177–184, 1999.

MEYLAN, A.B.; MEYLAN, P.A. **Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las tortugas marinas,** p.3-5. In: Eckert K.L., Bjorndal K.A., Abreu-Grobois F.A. & Donnelly M. (Eds), Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. IUCN/SSC Publicación. 2000.

MILLER, J.D. **Reproduction in sea turtles.** Pp. 51-81. In: P.L. Lutz.; J.A. Musick (eds.). The Biology of Sea Turtles, Vol. 1. CRC Press, Florida. 432p. 1997.

MILLER, J.D.; LIMPUS, C.J. **A ontogenia das gônadas de tartarugas marinhas.** In: Biology of Tartarugas marinhas. Lutz, PL, Músicka, JA, e J. Wyneken (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL:199-220. 2003.

MOREIRA F.R.; MOREIRA J.C.; **A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*, 9(1):167-181, 2004

MOORE et al. **Copper.** South Australia: National Environmental Department, Metal series, n.3, 1997

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). **Decline of the sea turtles: causes and prevention.** Natl. Acad. Press, Wash., D.C., 259 p. 1990.

OHLSSON, K.; TEGNER, H. **Inhibition of elastase from granulocytes by the low molecular weight bronchial protease inhibitor.** *Scand. Journal of Clin. & Lab. Invest.* 36 (5): 437-445, 1976.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 1998. Elementos traço na nutrição e saúde humana. Genebra.

OWENS, D.W. **The comparative reproductive physiology of sea turtles.** *Am Zool*, v.20, p.547-563, 1980.

PAIS, I.; BENTON JONES, J. JR. **The handbook of trace elements,** BY CRC Press LLC. 1997

PAKARINEN E. **The importance of mucus as a defence against carabid beetles by the slugs *Arion fasciatus* and *Deroceras reticulatum*.** *J. Moll. Stud*; 60: 149-55.1994.

RAFFERTY, A. R.; EVANS, R. G.; SCHEELINGS, T. F.; AND R. D. REINA. **Oviductal hypoxia arrests embryonic development and constrains the evolution of viviparity in chelonians.** Presented at the 2012 International Sea Turtle Symposium, Hautulco, México. 2012.

REIDENBACH, J. M.; VALA, J. C.; CHAMIZI M. **The slug-killing ciomyzidae (Diptera): potential agents in the biological control of crop pest molluscs.** In: Slugs and snails in world agriculture (I. Henderson, ed.), 273-280. Proceedings of British Crop Protection Council, 41, Guildford, April 1989.

RIOS, F. J. B. **Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de Artemia sp.** 1995. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

ROLLO, C. D.; WELLINGTON, W. G. **Intra-and-inter-specific agonistic behaviour among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora).** Can. J. Zool; 57: 846-55. 1979.

ROSSI, S. **Estudos do impacto da fibropapilomatose em *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758) (Testudines, Cheloniidae).** 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado patologia experimental e comparada). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

SAKAI, H.; SAEKI, K.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, H.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. **Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) and Green Turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese costal waters.** Marine Pollution Bulletin., v. 40: 701-709. 2000.

SANCHES, T. M.; BELLINI, C. **Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in the Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil.** Chelonian Conservation Biology, v. 3, n. 2, p. 308-311, 1999.

SANTAMARTA, J. **A ameaça dos disruptores endócrinos.** Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, v. 2, n. 3, p.18-29, 2001.

SANTOS, A. J. B. et al. **Northeast Brazil shows highest hawksbill turtle nesting density in the South Atlantic.** Endangered Species Research, Oldendorf/Luhen, v. 21, p. 25-32, 2013.

SANTOS, A. J. B. **ASPECTOS DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *Eretmochelys imbricata* (TESTUDINES, CHELONIIDAE) NO LITORAL SUL DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.** 2008. p.45. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SANTOS, A.E.M. **Educação ambiental para conhecer e conservar as tartarugas marinhas.** 2012.60p. Monografia (Curso ciências biológicas) Universidade do Vale da Paraíba, São José dos Campos – SP,

SEMINOFF, J.A.; RESENDIZ, A.; NICHOLS, W.J. **Home range of green turtles *Chelonia mydas* at a coastal foraging area in the Gulf of California.** Mexico. Mar Ecol Prog Ser242: 253-265. 2002.

SEMINOFF, J.A.; RESENDIZ, A.; NICHOLS, Y.W.J. **Diet of the east Pacific Green Turtle, *Chelonia mydas*, in the central Gulf of California México.** J. Herpetology. 36:447-453. 2002.

SHEN G. S.; LAYER R.T.; McCABE R.T. **Conopeptides: From deadly venoms to novel therapeutics.** Drug Discov. Today. 5(3): 98-106. 2000.

SLOMIANY, A.; WITAS, H.; AONO, M.; SLOMIANY, B. **Covalently linked fatty acid in gastric mucus glycoprotein of cystic fibrosis patients.** The Journal of Biological Chemistry. 258 (14): 8535-8538, 1983.

SOLOMON, S.E.; BAIRD, T. **Aspects of the biology of *Chelonia mydas*.** Ocean Mar Biol, v.17, p.347, 1979.

STORELLI, M.M.; STORELLI, A.; D'ADDABBO, R.; MARANO, C.; BRUNO, R.; MARCOTRIGIANO, G.O. **Trace elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from the eastern Mediterranean Sea: overview and evaluation.** Environmental Pollution, v. 135, p.163–170, 2005.

STORELLI, M.M.; MARCOTRIGIANO, G.O. **Heavy metals residues in tissues of marine turtles.** Marine Pollution Bulletin, [Oxford, Inglaterra], v. 46, p. 397-400. 2003.

THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Environmental Health Criteria, 1 Mercury. Geneva: Geneva: WHO, 1976. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc001.htm>. Acesso em: 25/08/2018

VASCONCELOS, T.L. **Purificação e caracterização bioquímica e farmacológica das proteínas presentes no muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa)**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado biologia animal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

WALLNER-KERSANACH, M.; BIANCHINI, A. **Metais traço em organismos: monitoramento químico e de efeitos biológicos**. In: BAPTISTA NETO, J. A.; WALLNER- KERSANCH, M.; PATCHINEELAM, S. M. (Eds.). Poluição Marinha. Rio de Janeiro: Interciência, p. 237- 283. 2008.

WIBBELS, T.; OWENS, D.W.; LIMPUS, C.J.; REED, P.C.; AMOSS-JR, M.S. **Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*)**. Gen Comp Endocrinol, v.79, p.39-53, 1990.

WITHERINGTON, B.E. **Reducing threats to nesting habitat**. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. Donnelly, M. (Eds.), Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine turtle Specialist Group Publication No. 4, pp. 179–183, 1999.

WITZELL W.N. **The origin, Evolution, and Demise of the U.S. Sea Turtle Fisheries**. Mar Fish Rev 56 (4): 8-23. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, GENEVA. **International Programme on Chemical Safety – IPCS, Environmental Health**. Published under the Joint Sponsorship. United Environmental Programme the International Labour Organization, and the world Health Organization.

WORK, T.M.; BALAZS, G.H.; RAMEYER, R.A.; MORRIS, R.A. **Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian islands, 1993-2003.** Diseases of Aquatic Organisms 62, pp. 163-176. 2004.

WYNEKEN, J. **The anatomy of sea.** Miami, FL: NOAA, 2001. p.180. (NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC, 470).

XIE Y.; CHIBA M.; SHINOHARA A.; WATANABE H.; INABA Y. **Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes.** Industrial Health 36:234-239. 1998.

ZAGATTO, A.; BERTOLETTI. E. - **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações.** São Carlos: RIMa, 478p, 2006.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO MUCO CLOACAL DAS TARTARUGAS MARINHAS - IPOJUCA/PE

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO MUCO CLOACAL DAS TARTARUGAS MARINHAS - IPOJUCA/PE

Daliana Souza^{1 2 *}, Ednilza Santos¹, Lourinalda Oliveira¹ e Arley Silva²

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, Recife, PE.

² Projeto Ecoassociados, Rua Caraúna Praça 04 - Porto de Galinhas, Ipojuca – PE.

* daliana.teles@hotmail.com

Resumo:

Ocorrem cinco espécies de tartarugas marinhas no Brasil, dessas, todas estão classificadas como ameaçadas de extinção. Durante muito tempo as tartarugas sofreram grandes ameaças, o consumo da sua carne, o uso de suas peças para confecção de artefatos, ocasionou um declínio na sua população. Seu ciclo de vida é extenso precisando fazer várias migrações que intercalam entre o local de alimentação, desova e reprodução. Durante a oviposição é possível observar a presença de um muco claro que recobre os ovos evitando assim o impacto entre eles. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as propriedades químicas, a toxicidade dessa substância e identificar os metais pesados presentes no muco cloacal das Tartarugas Marinhas. As coletas foram realizadas no município do Ipojuca/PE, coletou-se o muco cloacal de 10 animais de duas espécies, com o auxílio de um tubo falcon 15ml localizado abaixo da cloaca. O muco apresenta características próprias, demonstrando turbidez e em algumas amostras precipitações, a toxicidade do muco variou de acordo com o número de mortalidade de náuplios de *Artemia salina* que classificou as amostra de muito tóxica para moderadamente tóxica, quantificou-se a proteína bruta presente através do método Kjeldahl e obtivemos concentrações de

0,27 mg á 5,17 mg. Para metais as amostras foram analisadas pelo ICP-OES onde houveram a identificação e quantificação das concentrações de Alumínio (Al), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Cádmio (Cd), Manganês (Mn), Níquel (Ni) e Ferro (Fe) presentes no muco. Metais pesados em muco cloacal de tartarugas marinhas podem indicar possíveis transmissão vertical entre mãe e filhote. Identificamos o muco como bom material para análise de saúde animal e a parte positiva é que ele é bem menos invasivo que outras técnicas já utilizadas.

Palavra - Chave: Conservação, poluição, saúde animal.

Abstract:

There are five species of sea turtles in Brazil, all of which are classified as endangered. For a long time turtles suffered great threats, the consumption of their meat, the use of their pieces to make artifacts, caused a decline in their population. Its lifecycle is extensive and requires several migrations that intersect between feeding, spawning and breeding sites. During oviposition it is possible to observe the presence of a clear mucus that covers the eggs thus avoiding the impact between them. The objective of this work was to characterize the chemical properties, toxicity of this substance and to identify the heavy metals present in the cloacal mucus of the sea turtles. The collections were performed in the municipality of Ipojuca / PE, and the cloacal mucus was collected from 10 animals of two species, with the aid of a 15ml falcon tube located below the cloaca. The mucus has its own characteristics, showing turbidity and in some samples precipitation, mucus toxicity varied according to the mortality number of *Artemia salina* nauplii that classified the samples from very toxic to moderately toxic, the crude protein present was quantified through Kjeldahl method and obtained concentrations of 0.27 mg to 5.17 mg. For metals the samples were analyzed by ICP-OES where there was identification and quantification of Aluminum (Al), Lead (Pb), Copper (Cu), Chromium (Cr), Cadmium (Cd), Manganese (Mn), Nickel concentrations. (Ni) and Iron (Fe) present in mucus. Heavy metals in sea turtle cloacal mucus may indicate possible vertical transmission between mother and offspring. We identified

mucus as good material for animal health analysis and the good thing is that it is far less invasive than other techniques already in use.

Keyword: Conservation, pollution, animal health.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, são cinco as espécies de tartarugas marinhas com ocorrência em seu litoral, tartaruga-verde *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), tartaruga-de-pente *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766), tartaruga cabeçuda *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), tartaruga oliva *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz 1829) e tartaruga-de-couro *Dermochelys coriácea* (Vandelli, 1761), sendo que todas se encontram em algum grau de ameaça (IUCN, 2018). Todas as tartarugas compartilham um ciclo de vida muito comum, elas atingem a idade reprodutiva entre 20 e 30 anos, são migratórias, de pequenas a grandes distâncias, entre áreas de forrageamento (alimentação) e reprodução (acasalamento e desova). Vive praticamente sua vida toda no mar, os machos migram entre áreas de alimentação e acasalamento, e as fêmeas se deslocam ainda para áreas de desovas, que geralmente são localizadas próximas a áreas de alimentação, e ela sobe as praias para desovar (Marcovaldi&Marcovaldi, 1999).

As tartarugas marinhas passam a maior parte do tempo na água, mas, como todo réptil ovíparo, necessita depositar os ovos no ambiente terrestre para a garantia das condições essenciais aos processos de incubação. Como o cuidado parental se limita à confecção do ninho e camuflagem deste, a única alternativa para as fêmeas maximizarem seu sucesso reprodutivo é através da seleção do local da desova (Resetarits, 1996). O processo de desova envolve uma série de etapas: 1) emergência da tartaruga da água; 2) deslocamento até um local seguro da ação das marés (nesta etapa a tartaruga pode desistir do processo se perturbada); 3) preparação do terreno e da cama (diâmetro aproximado de dois metros, dependendo da espécie); 4) escavação do ninho (de profundidade variada de acordo com a espécie); 5) deposição dos ovos (o número de ovos varia dependendo da espécie); 6) cobertura e camuflagem do ninho; 7) retorno ao mar. Todo este processo leva aproximadamente de 1 a 2 horas (Hirth, 1980).

Observa-se durante a desova a presença de um muco claro que reveste os ovos que é secretado da cloaca durante oviposição (Bustard e Greenham 1969). Pouco se sabe sobre a composição química desse muco, principalmente sobre sua função, composição e influência no desenvolvimento embrionário, alguns estudos relatam identificação de agentes antimicrobianos e antifúngicos através do muco que é liberado pela cloaca e reveste os ovos. Concomitantemente a isso e segundo Lam et al. (2004), as tartarugas marinhas são consideradas bioindicadores de contaminação de metais pesados no ecossistema marinho, pois alimentam-se de diferentes níveis tróficos, vivem por muitos anos e apresentam ampla distribuição geográfica. Tais características aumentam as chances de que estes animais se contaminem pela exposição ou pela bioacumulação dos elementos através da alimentação (Anan et al., 2001; Kampalath et al., 2006; Barbieri, 2009; Paez-Osuna et al., 2010). Diante disso vimos a necessidade de um estudo para caracterização das propriedades físico-químicas, toxicidade e presença de metais pesados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Área de estudo

A área de estudo localiza-se no município do Ipojuca (08°24'25"S; 35°03'45"W), a cerca de 40 km ao sul do Recife, capital do estado de Pernambuco, Brasil. Apresenta 32 km de área litorânea, sendo que 12 km são distribuídos ao longo das praias de Muro Alto, Cupe, Merepe, Porto de Galinhas, Maracaípe e Pontal de Maracaípe (Figura 01) onde são registradas desovas de tartarugas marinhas. Nessa área acerca de duas décadas a Organização não Governamental Ecoassociados (Figura 02), está monitorando atividades de nidificação de Tartarugas Marinhas. A área de praia onde as tartarugas nidificam, possui grande pressão antrópica e é caracterizado por apresentar construções desordenadas ao longo da orla, elevado índice turístico e alta exploração de turismo devido à beleza natural composta por corais e águas claras (Cesar, 2007). As praias do município do Ipojuca são áreas de preferência para a desova de tartarugas marinhas. Todas elas apresentam características ambientais como temperatura, umidade, tipo de areia e topografia favoráveis à escolha do ambiente para a desova de tartarugas marinhas (Simões et al., 2014).

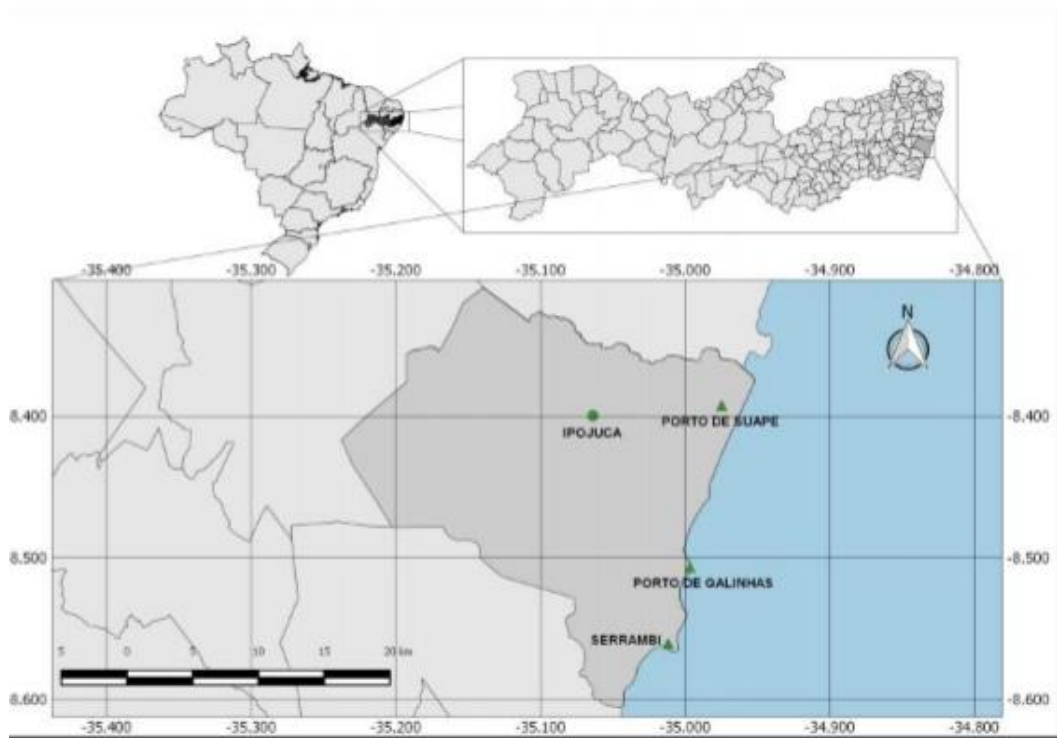


Figura 01: Mapa do litoral de Ipojuca/PE.



Figura 02: Museu das Tartarugas marinhas, onde funciona a sede da ONG Ecoassociados em Ipojuca/PE Fonte: Ecoassociados 2018

2.2 - Coletas de material em campo

As coletas foram realizadas no período de agosto de 2017 a maio de 2018, durante as rondas noturnas que aconteciam todos os dias, para sua realização das mesmas eram usados o auxílio de um quadriciclo. Geralmente é a noite, que as tartarugas marinhas saem do mar para realizar sua postura na areia da praia, frequentemente, acima da linha da maré mais alta (Ecoassociados, 2007).

Eram percorridos os 12 km de orla, durante o processo ao identificar o rastro ou por diversas vezes a própria tartaruga saindo do mar, o quadriciclo era desligado e ficamos no aguardo observando apenas de longe o momento que ela desse início ao processo de desova. Ao perceber que ela estava parada, nos aproximávamos, conferimos se já havia começado a desovar, caso sim, com a mão afastamos um pouco da areia (Figura 03 A), o suficiente para dar acesso a câmara dos ovos e com muito cuidado para o animal não se assustar nem se sentir incomodado, colocávamos um tubo falcon de 15mL abaixo da cloaca e ficamos no aguardo conforme movimento da liberação do muco (Figura 03 B e C). A maior parte do muco é liberado junto com os ovos, o que dificulta sua coleta, porém a cada liberação de 3 a 4 ovos ela expele uma quantidade de muco considerável, nesse momento tentamos coletar uma quantidade significativa para análises.

Ao perceber que ela começava a se mover dando sinais que iria fechar o ninho, retirávamos o tubo, tampávamos, o mesmo era identificado e envolvido no plástico filme em seguida era armazenado dentro de uma caixa de isopor, até chegar na base do projeto e ser transferido para geladeira e mantido a 4°C de refrigeração.



Figura 03: Procedimento de coleta do muco cloacal, durante a temporada reprodutiva Agosto 2017 a Maio de 2018, Ipojuca/PE. (A): Verificando se a tartaruga já tinha iniciado a oviposição, afastando a areia. (B): Aguardando o momento que a tartaruga expele a quantidade de muco na hora da desova. (C) Tubo falcon de 15 mL localizado abaixo da cloaca, porém sem tocar na mesma, para não interromper a oviposição.

Licença SISBIO22741-9. Após a coleta de material eram realizadas a biometria da tartaruga coletando o Comprimento Curvilíneo da Carapaça - CCC e a Largura Curvilínea da Carapaça - LCC, utilizando fita métrica, posteriormente era verificada a marcação da mesma (anilhas) (Figura 04). Identificada a desova, o ninho era isolado e recebia uma estaca com uma numeração única para acompanhamento e monitoramento, os dados eram registrados na planilha de campo.



Figura 04: Par de anilhas usadas para marcação nas tartarugas marinhas. Fonte: Ecoassociados 2018

2.3 - Procedimento para análises laboratoriais

2.3.1 - Aspectos físico-químicos

Após coleta foram observados os aspectos físico- químicos do muco: volume coletado, coloração, viscosidade e precipitações (Figura 05 A). Todos os dados foram anotados na planilha de campo.

No laboratório as amostras foram diluídas na proporção de 1 mL de muco para 15 mL de água destilada para a análise de medição de pH utilizando o pHmetro (Figura 05 B).



Figura 05: Análise das amostras de muco cloacal das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE. (A) Características do muco coletado, armazenado no tubo falcon. (B) pHmetro

2.3.2 - Análise de toxicidade

Para a análise foi utilizada a metodologia de Meyer et al., 1982, adaptada. Os ovos de *Artemia salina* foram incubados em água do mar, mantida sob temperatura ambiente entre 25 à 27°C por 24 horas para a eclosão dos náuplios (Figura 06 - 1).

O muco cloacal das tartarugas marinhas, foram diluídos e preparados (Figura 06 - 2) em concentrações pré-estabelecida em tubos falcon de 10 mL, foi realizada uma solução estoque v/v na proporção de 1:10 onde 1mL do muco e 9mL de água salina em balão volumétrico de 10 mL (Figura 06 - 3 e 4). As outras concentrações foram realizadas a partir da solução estoque da qual foi retirada 1 mL e adicionado 4 mL de água salina em balão volumétrico de 5 mL. Foram obtidas quatro concentrações através da diluição seriada.

Foi realizado também a amostra só com água salina sendo estabelecida como controle negativo. Todas as concentrações foram testadas em triplicatas. Foram adicionados 10 náuplios de *Artemia salina* em cada tubo falcon (Figura 09 - 5). Após 24 horas foi analisada a taxa de mortalidade das *Artemia salina*. Os dados foram analisados pelo método Probit através do software BIOSTAT Pro versão 6.0 e expressos como CL50 (concentração letal média) e percentual de mortalidade. Resultados com 100% de mortalidade significam elevada toxicidade e de 0% sem toxicidade.



Figura 06: Análise e organização das amostras do muco cloacal das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE. (1) Ovos de *Artemia salina* colocados para eclodir na água do mar durante um período de 24 horas. (2) Preparação das soluções estoques. (3) 1 mL do muco no balão volumétrico de 10 mL. (4) Água salina usada para produção da solução, onde 1 mL era do muco e 9 mL de água salina. (5) Após adicionar os 10 náuplios em cada amostra, esperava-se 24 horas para contagem da quantidade de mortos.

2.3.3 - Análise de proteína bruta

O método utilizado na quantificação de proteína bruta foi o de Kjeldahl 1883 com modificações, utilizando o Destilador de Nitrogênio. Na realização da análise, 1 mL das amostras de muco cloacal foram transferidas para tubos de ensaio de 10 mL

e adicionado 7 mL de mistura digestora (sais inorgânicos que atuam como catalisadores e ácido sulfúrico concentrado) (Figura 07). As amostras foram colocadas na estufa por 24 horas a 60°C.



Figura 07: Muco mais solução digestora, antes de ir para estufa.

As amostras foram retiradas da estufa e reservadas até atingir a temperatura ambiente (Figura 08). No processamento das amostras foi adicionado 10mL de água destilada, para cada amostra, recolheu o destilado em um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico com indicador misto.



Figura 08: Soluções após o período de digestão e 24 horas na estufa a 60°C

Após obter 20mL do destilado no erlenmeyer, titulou-se o mesmo com uma solução padrão 0,05N de Ácido sulfúrico (H_2SO_4). O ponto final da titulação corresponde à viragem da cor verde para vermelho claro (Figura 09) quando a titulação terá atingido o ponto de equivalência entre a base e o ácido. Anotou-se o volume gasto na titulação para proceder aos cálculos e determinar o teor de nitrogênio total (Proteína bruta) das amostras. O teor de proteína bruta de um alimento é obtido pela multiplicação do teor de N - total pelo fator de conversão (6,25).



Figura 09: Ilustração de um destilador de Kjeldahl e ponto de viragem.

2.3.4 - Metais pesados

2.3.4.1 - Tratamento de Amostra

Para proceder a digestão, 0,25 mL de muco foram transferidos para tubos de vidro e em seguida foram adicionados 3 mL de ácido nítrico (HNO_3) a 65% (Figura 10). As amostras foram fechadas com papel filme contendo pequenos furos para saída de gases e deixadas à temperatura ambiente por 72 horas. Subsequentemente, foram

colocadas em estufa de resistência elétrica por 24 horas a temperatura de 67°C. As amostras em solução foram filtradas e diluídas com água destilada em balão volumétrico de 25 mL e transferidas para recipientes de plásticos (Figura 11) onde permaneceram armazenadas, até a Análise de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) modelo Optima DV 7000 (Perkin Elmer, EUA).



Figura 10: Reação: Solução do muco após a adição do ácido nítrico.



Figura 11: Amostras mantidas em recipientes de plástico e encaminhadas para o ICP/UFPE.

2.3.4.2 - Análise em Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

As análises foram feitas do DQF - Departamento de Química Fundamental da UFPE, o equipamento utilizado neste trabalho foi o ICP OES modelo Optima DV 7000 (Perkin Elmer, EUA) (Figura 12), que permite a observação do plasma no modo de configuração axial e radial, proporcionando o modo de observação mais sensível para cada elemento, os resultados obtidos para cada item amostrado foram apresentados em mg/L. Para amostras foi utilizado um padrão multielementar da marca Merck Certipur. Os elementos analisados foram: Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Cobre (Cu), Crômio (Cr), Níquel (Ni), Ferro (Fe), Alumínio (Al) e Manganês (Mn).



Figura 12: Equipamento usado para as análises de metais pesado - ICP OES modelo Optima DV 7000 (Perkin Elmer, EUA)

2.3.5 - Análise estatísticas

De um modo geral, as amostras foram analisadas através de uma estatística descritiva, evidenciada nos gráficos. Foi utilizado o teste de Spearman's rank correlation coefficient, para verificar correlação entre proteína, pH, toxicidade e sucesso de eclosão e entre os metais. O qui-quadrado foi utilizado para verificar diferenças em cada amostra e entre as amostras, como também para cada item

analisado. Estabeleceu como valor estatístico significativo 5%. Utilizou-se o Bioestat versão 6.0 para análise de toxicidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coleta de Dados de Campo

Um total de 10 fêmeas, sendo nove da espécie *Eretmochelys imbricata* (EI) e uma *Chelonia mydas* (CM) foram flagradas desovando e realizada a coleta do material biológico, no caso o muco cloacal. As tartarugas desovaram nas praias de Muro-Alto, Merepe e Maracaípe, durante o período de Outubro 2017 à Abril de 2018, a maioria dos flagrantos se deu na Praia de Merepe (N = 6). A espécie que apresentou o maior número de coleta foi a *E. imbricata* (N = 9). Os tamanhos variaram de 90 cm a 109 cm de CCC, já em LCC os tamanhos variam de 78 cm à 103 cm (Tabela 01).

Tabela 01: Informações dos indivíduos coletados na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE, com informações sobre a marcação (anilhas), a praia que ocorreu o flagrante e coleta de material biológico, espécie coletada e CCC (Comprimento Curvilínea da Carapaça) e LCC (Largura Curvilínea da Carapaça) dos animais amostrados.

Indivíduo	Data da Coleta	Marcção	Praia	Espécie	CCC	LCC
1	21.01.18	Marcada	Muro Alto	EI	93 cm	90 cm
2	21.01.18	Nova marcação	Merepe	EI	98 cm	83,2 cm
3	02.02.18	Marcada	Merepe	EI	95 cm	84 cm
4	10.02.18	Marcada	Muro Alto	CM	109 cm	103 cm
5	22.02.18	Marcada	Merepe	EI	92 cm	82 cm
6	22.02.18	Marcada	Merepe	EI	90 cm	78 cm
7	23.02.18	Marcada	Muro Alto	EI	89,4 cm	93,2 cm
8	27.02.18	Marcada	Merepe	EI	103 cm	89,2 cm
9	27.02.18	Nova marcação	Merepe	EI	101,1 cm	87,4 cm
10	18.03.18	Marcada	Maracaípe	EI	97,5 cm	86 cm

3.2. Aspectos físico-químicos

A quantidade de material coletado variou entre 1 mL a 6 mL, observou-se que a quantidade de muco expelido variou por indivíduo, alguns tem uma grande quantidade, principalmente no início da oviposição, outras apresentam uma pequena quantidade de muco, ou quase nada. Em alguns casos a quantidade variou também porque a maior parte do muco foi liberada junto com os ovos o que dificultou sua coleta, a média de amostra coletada foi de 3,54 mL. Podemos observar também uma diferença nas características do muco onde alguns são bem turvos e outros mais incolores, alguns apresentaram precipitações e uma viscosidade maior (Tabela 02).

Tabela 02: Características físico químicas do muco cloacal das amostras de tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE, evidenciando a quantidade de muco coletado, o pH do muco e sua característica observada no momento da coleta.

Amostra	Quantidade do Muco Coletado	pH	Características do Muco
Amostra 01 (E.I)	3 mL	8,58	Pouco turvo
Amostra 02 (E.I)	2,5mL	9,12	Incolor
Amostra 03 (E.I)	1,2mL	9,28	Turvo
Amostra 04 (C.M)	<1mL	-*	Turvo
Amostra 05 (E.I)	5mL	8,79	Incolor
Amostra 06 (E.I)	5mL	9,27	Pouco turvo
Amostra 07 (E.I)	4,7mL	9	Pouco turvo
Amostra 08 (E.I)	3mL	8,85	Incolor
Amostra 09 (E.I)	6mL	8,89	Incolor com precipitações
Amostra 10 (E.I)	4mL	8,71	Incolor

***Amostra Insuficiente para análise de pH.**

Já o pH (potencial hidrogênico) variou entre 8,58 e 9,28 o que demonstrou uma grande tendência para seu aumento, que mesmo variando ele se manteve sempre alcalino (Tabela 2).

3.3. Análise de toxicidade

Foram analisadas dez amostras do muco para o teste de toxicidade com base no número de mortalidade dos náuplios, esses resultados evidenciaram uma variação de mortalidade entre 90% a 20%, entre muito tóxica e levemente tóxica (Tabela 03).

Tabela 03: Toxicidade das amostras determinada através do número de mortalidade dos náuplios em cada amostra, quanto maior a mortalidade maior é a toxicidade, C.E é inversamente proporcional a esse valor das tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE.

Amostra 01 (E.I)	CE50	25%	Tóxica
Amostra 02 (E.I)	CE50	20%	Muito Tóxica
Amostra 03 (E.I)	CE50	50%	Tóxica
Amostra 04 (C.M)	CE50	60%	Moderadamente Tóxica
Amostra 05 (E.I)	CE50	35%	Tóxica
Amostra 06 (E.I)	CE50	90%	Levemente Tóxica
Amostra 07 (E.I)	CE50	90%	Levemente Tóxica
Amostra 08 (E.I)	CE50	70%	Moderadamente Tóxica
Amostra 09 (E.I)	CE50	55%	Moderadamente Tóxica
Amostra 10 (E.I)	CE50	55%	Moderadamente Tóxica

Os valores exibidos têm como referência a concentração maior.

** (C.E) Inversamente proporcional

Com base nesses resultados (Tabela 03), observa-se que a amostra 2 apresentou uma toxicidade alta onde apenas 20% dos náuplios sobreviveram, sendo classificada como muito tóxica (<20%). A amostra 1, 2, 3 e 5 que apresentaram uma toxicidade de: Muito tóxica a tóxica, são da espécie *E. imbricata*. Meylan (1988) comenta no seu trabalho que esta espécie é fortemente associada a recifes de corais devido ao seu hábito alimentar preferencialmente espongiívoro. Considera-se que as esponjas foram os primeiros animais marinhos estudados do ponto de vista químico (Hammen e Florkin 1968). Estudos com produtos naturais de esponjas marinhas forneceram importantes informações do ponto de vista químico e bioquímico (Bergquist, 1983; Proksch, 1994; Sarma, et al. 1993). Sakai et al., (2000) sugere também que a contaminação de tartarugas marinhas por metais ocorre principalmente

através da alimentação, sendo o hábito alimentar importante para especular o aumento dos metais encontrados em material biológico de tartarugas. A toxicidade dessas substâncias pode variar exatamente por conta dos alimentos ingeridos e contaminados.

A amostra 4 que pertence a *C. mydas*, apresentou resultado moderadamente tóxico. Márquez, (1990); Bjorndal, (1996); Mortimer, (1981) e Ross, (1985) falam que esta espécie ao atingir a fase juvenil, torna-se preferencialmente herbívora, a única espécie de tartaruga marinha a apresentar esse tipo de dieta. Os indivíduos que desovam nessa parte do litoral, sua ocorrência em outros locais, área de alimentação e possíveis rotas são totalmente desconhecidas. Poucos são os estudos que envolvem esses animais. Bjorndal, (1985); Tucker e Read, (2001); Hamann *et al.*, (2002) durante seus estudos apontam que durante a temporada de nidificação as fêmeas diminuem ou cessam completamente a ingestão de alimentos. O que pode justificar esse decréscimo de toxicidade no decorrer do tempo, os animais que apresentaram uma toxicidade de levemente a moderada, temos como hipótese que após as primeiras desovas a toxicidade tendem a cair. Porém não é possível afirmar, faz necessário um estudo mais detalhado com o acompanhamento dos indivíduos em recapturas, durante a temporada reprodutiva.

3.4. Análise de proteína bruta

A quantidade de proteínas encontradas nas amostras variou de 0,27mg (amostra 3) até 5,17mg (amostra 7) (Tabela 4). Durante o período de reprodução 10 amostras foram coletadas, cada uma corresponde a um ninho, em destaque para o ninho 8 que foi perdido, levado pela maré alta. O total de ovos desses ninhos foi de 1285 com uma média de 142 ovos por ninho, desses, 1035 foram filhotes vivos (que conseguiram se desenvolver e eclodir) uma média de 115 filhotes vivos por ninho, contabilizando 57 filhotes natimortos o que variou de 0 (Ninho 2) a 28 (Ninho 7). Um total de 195 ovos não eclodiram variando de 4 (ninho 5) a 61 (ninho 2). No que se refere aos filhotes natimortos, bem como os ovos não eclodidos, estudos demonstram que alguns fatores podem influenciar essa sobrevivência, como por exemplo, as características do habitat e do microambiente dos ninhos (Weisrock; Janzen, 2000),

como mudanças na temperatura, umidade e salinidade (Ackerman, 1997). Para essas variáveis não obtivemos uma diferença significativa.

Tabela 04: Número de ovos totais, natimortos, ovos não eclodidos e sucesso de eclosão desses ninhos, relacionando com os resultados das análises de proteína bruta do muco.

Amostra	Total de Ovos	Natimortos	Ovos não eclodidos	Eclodidos	Sucesso Eclosão	Proteína Bruta do muco
Amostra 01 (E.I)	131	11	29	91	69,40%	1,1025mg
Amostra 02 (E.I)	167	0	61	106	63,40%	4,41mg
Amostra 03 (E.I)	148	8	33	107	72,29%	0,275625mg
Amostra 04 (C.M)	104	2	21	81	77,88%	2,480625mg
Amostra 05 (E.I)	191	2	4	187	97,90%	0,765625mg
Amostra 06 (E.I)	120	4	11	105	87,50%	0,765625mg
Amostra 07 (E.I)	121	28	20	73	60,30%	5,175625mg
Amostra 08 (E.I)	-*	-	-	-	-	0,765625mg
Amostra 09 (E.I)	129	1	5	123	95,34%	0,765625mg
Amostra 10 (E.I)	174	1	11	162	93,10%	0,49mg

* Ninho levado pela maré, não foi possível contabilizar o total de ovos.

No que se refere a sucesso de eclosão tivemos uma média de 80,54% nos dez ninhos coletados e nove contabilizados, variando entre 97,90% e 60,30%. O número de amostra analisadas por temporada parece ser interessante quando

comparado com o trabalho de Keene (2012), todavia esse autor coletou uma quantidade maior de muco para análise, mas apenas para verificar a presença de micro-organismos.

Ao compararmos o sucesso de eclosão com os resultados das análises de proteínas (Tabela 04), percebe-se uma relação, que quanto maior a quantidade de proteína bruta presente na amostra, menor é o sucesso de eclosão ($r_s=0.8033$; $p=0.0091$). Na amostra 5 onde o sucesso de eclosão foi maior (97,90%) a quantidade de proteína foi a segunda menor (0,76mg). O segundo maior sucesso de eclosão foi o ninho 9 (95,34%) e a quantidade de proteína se manteve a (0,76mg) (ver Tabela 04).

Segundo Simas (2005) as análises de Proteína Bruta envolvem um grupo de substâncias que tem como estrutura fundamental o aminoácido. As proteínas possuem diferentes propriedades físicas e químicas, dessa forma não tem solubilidade, reatividade, ponto de fusão e ebulição iguais. As proteínas e os aminoácidos são importantes elementos nutricionais. As proteínas são compostos formados fundamentalmente por carbono (C), hidrogênio (H) , nitrogênio (N) e oxigênio (O). Elas têm funções importantes nos organismos tanto animais quanto vegetais. Estruturalmente as moléculas proteicas apresentam-se complexas sendo seu peso molecular bastante elevado. É possível afirmar que essas moléculas são polímeros constituídas de moléculas mais simples: os aminoácidos, ácidos orgânicos que apresentando uma função amina.

Desse modo é possível especular que as proteínas disponíveis no muco que envolve o ovo, podem estar interagindo com outras substâncias, o que pode estar interferindo no sucesso de eclosão dos ninhos.

3.5. Metais pesados

Foram feitas as análises de oito tipos de metais pesados, Alumínio (Al), Ferro (Fe), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Manganês (Mn), Níquel (Ni), Cromo (Cr) e Cádmio (Cd). Dos 10 indivíduos que foram coletados, as amostras 03 e 04 foram insuficientes

para essas análises. Restando apenas 08 amostras (01, 02, 05, 06, 07, 08, 09 e 10) todas elas pertencentes a espécie *E. imbricata*.

Os resultados dos metais pesados presente no muco cloacal, estão apresentadas na (Tabela 05). O elemento que apresentou uma maior concentração foi o Al com 35,5mg/L (amostra 01) e 28,7mg/L (amostra 07). Simões (2016), ao realizar um estudo com sangue, cascas de ovos e sedimento no município do Ipojuca, verificou que os níveis de Ni em *E. imbricata* se mostraram os mais concentrados dentre os metais pesquisados em *E. imbricata*, o que difere dos nossos resultados onde o Ni se apresenta em sexto lugar, logo após o Cu, Pb e acima do Cr que também foi contemplado nesse estudo. As concentrações maiores e menores encontradas no estudo de (Simões, 2016) foram Ni (sangue: $1,711 \pm 0,357$ ppm; cascas dos ovos $4,689 \pm 4,960$ ppm; sedimento $451 \pm 0,112$ ppm), no Cu (sangue $0,951 \pm 2,005$ ppm; cascas dos ovos $0,268 \pm 0,180$ ppm; sedimento $0,035 \pm 0,016$ ppm) em Pb (sangue $0,729 \pm 0,488$ ppm; cascas dos ovos $0,041 \pm 0,039$ ppm; sedimento $0,032 \pm 0,018$ ppm) já no Cr (sangue $0,085 \pm 0,026$ ppm; cascas dos ovos $0,237 \pm 0,265$ ppm e sedimento $0,034 \pm 0,011$).

Na ordem dos metais mais concentrados, apenas o Ni não está de acordo com os nossos resultados, quando comparada com Simões (2016), mas o Cu, Pb e Cr se mostraram na ordem de concentração. Podemos observar que as maiores concentrações foram nas cascas dos ovos (Simões, 2016), corroborando assim com os nossos resultados, que demonstram que o muco está presente desde o período de formação do embrião e após a oviposição o muco é absorvido pela casca dos ovos, onde a contaminação se dá não pelo ambiente, mas através do muco (Keene, 2012). Anan et al., (2002) verificaram altos níveis de metais no tecido hepático em algumas tartarugas marinhas onde efeitos de poluição são razoavelmente assumidos como sendo mínimo. É importante ressaltar que ainda há muita incipiência de dados quanto a melhor amostra biológica para trabalhar contaminantes em tartarugas marinhas devido as questões relacionada a bioacumulação (Lam et al., 2004).

Tabela 05: Resultados das concentrações de metais pesados encontrados no muco cloacal das tartarugas marinhas, através da Análise em Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).

	AM 01	AM 02	AM 05	AM 06	AM 07	AM 08	AM 09	AM 10
Al	35,5	31,08	31,6	30,2	28,7	31,3	29,9	33,8
Fe	24	28,7	16,7	18,4	17,3	19,7	20,1	18,5
Cu	23,8	22,5	24,6	26,9	24,5	25,2	25,4	23,8
Pb	15	15,7	15,3	14,8	14,7	14,2	14,4	14,9
Mn	15	16,1	15,4	14,1	14,6	15,4	14,9	14,8
Ni	14	13,9	13,6	13,9	13,7	13,6	13,9	13,7
Cr	12	12	11,9	11,9	11,9	12,1	11,9	12
Cd	13,5	7,3	7,5	7,2	7,3	9,5	7,3	9,6

**Todos os valores estão em mg/L. AM = Amostras

Os metais apresentam um intervalo de concentração que variou de 0,2 mg/L a 12mg/L. O Cr obteve o menor intervalo com concentrações de 11,9mg/L a 12,1 mg/L, menor e maior respectivamente. O maior intervalo se deu no elemento Fe entre o mais concentrado (28,7mg/L) para o menos concentrado (16,7mg/L) (Tabela 06). As tartarugas marinhas adquirem os metais principalmente através da alimentação e podem armazená-los ou eliminá-los (Burger; Gochfeld, 1991; Wang, 2002; Guirlet et al., 2008). O que se faz necessário um estudo mais detalhado visando a recaptura desses animais, para que seja possível um monitoramento mais efetivo nas variações de concentrações desses contaminantes.

Tabela 06: Variação dos intervalos encontrados entre a maior e a menor concentração dos metais nas amostras de tartarugas marinhas registradas na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE.

Concentrações de metais			
Metais	Maiores	Menores	Intervalo
Al	35,5mg/L	28,7mg/L	6,8
Fe	28,7mg/L	16,7mg/L	12
Cu	26,9mg/L	22,5mg/L	4,4
Mn	16,1mg/L	14,1mg/L	2
Pb	15,7mg/L	14,2mg/L	1,5

Ni	14mg/L	13,6mg/L	0,4
Cd	13,5mg/L	7,2mg/L	6,3
Cr	12,1mg/L	11,9mg/L	0,2

Macêdo (2012), em um estudo dos elementos traços em diferentes tecidos (fígado, rins e ossos) de tartaruga de pente (*E. imbricata*) e tartaruga verde (*Chelonia mydas*), verificou altas concentrações de Al, que foram encontradas em ambas as espécies estudadas, sendo que a espécie *E. imbricata* apresentou concentrações significativamente maiores em todos os tecidos, sugerindo ser uma característica desta espécie a acumulação deste elemento. Essa acumulação pode ser em virtude do hábito alimentar ou de fundo metabólico. O mesmo autor sugere que dados mais específicos sobre a concentração desse e de outros elementos traços em algas e esponjas na área de estudo, poderiam colaborar para a correta interpretação destes resultados. Segundo Sakai et al., (2000) as maiores concentrações de chumbo foram encontradas nos ossos de ambas as espécies, colaborando com informações sobre bioacumulação em ossos e na carapaça das tartarugas marinhas.

O Cd no muco apresentou uma concentração inferior quando comparado a diferentes trabalhos que fazem uso de outros tecidos, como visto em (Barbieri, 2009). Esse autor fez um estudo com metais pesados em tartarugas verdes aqui no Brasil, analisando tecido como rim e fígado, onde demonstrou que a concentração de Cd foi maior nos rins do que no fígado. De acordo com Furness e Monaghan (1987) a concentração de Cd é sempre maior no rim, onde associa-se com uma proteína específica de ligação ao metal (metalotioneína), que geralmente processa o metal. Cd pode causar danos ao rim de vertebrado, mas há pouca evidência para sugerir que os níveis de Cd são altos o suficiente para causar danos às tartarugas marinhas.

Observou-se uma variação entre alguns metais, como o Fe e o Cu, que quando um aumenta o outro diminui, e em outros momentos eles se mantêm estável. O Pb e o Mn apresentaram concentrações próximas, e em algumas amostras uma intercala com a outra na dominância de concentração (Figura 13).

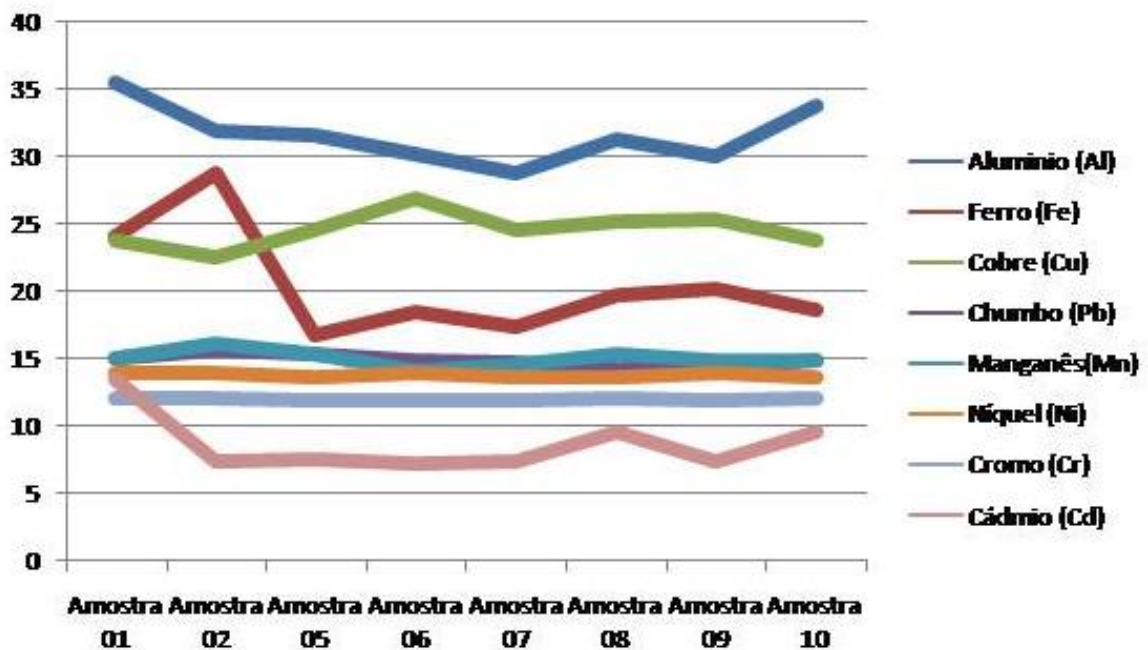


Figura 13: Variação entre as concentrações demonstrando uma relação entre alguns metais.

Observou-se que algumas amostras possuem os níveis mais altos de concentrações encontradas (Figura 14), onde na amostra 01 foi possível identificar a presença de três metais (Al, Ni e Cd) em concentrações mais altas que todas as outras. Na amostra 02 identificamos a presença de (Fe, Pb e Mn) em números mais altos, o que pode indicar que esses animais podem ter sido expostos a esse contaminantes em tempo recentes, como registrado por Barbieri (2009), no seu estudo no litoral de São Paulo. O que corrobora com os outros dados, os de concentração de proteína, toxicidade e sucesso de eclosão. Onde, as amostras 1 e 2 mostraram grande concentração de proteína bruta 1,10mg/L e 4,41mg/L com toxicidade classificadas entre tóxica e muito tóxica e seu sucesso de eclosão 69,40% e 63,40% respectivamente, demonstrando assim que quanto maior a concentração de metais, maior a concentração de proteína, maior a toxicidade e menor sucesso de eclosão.

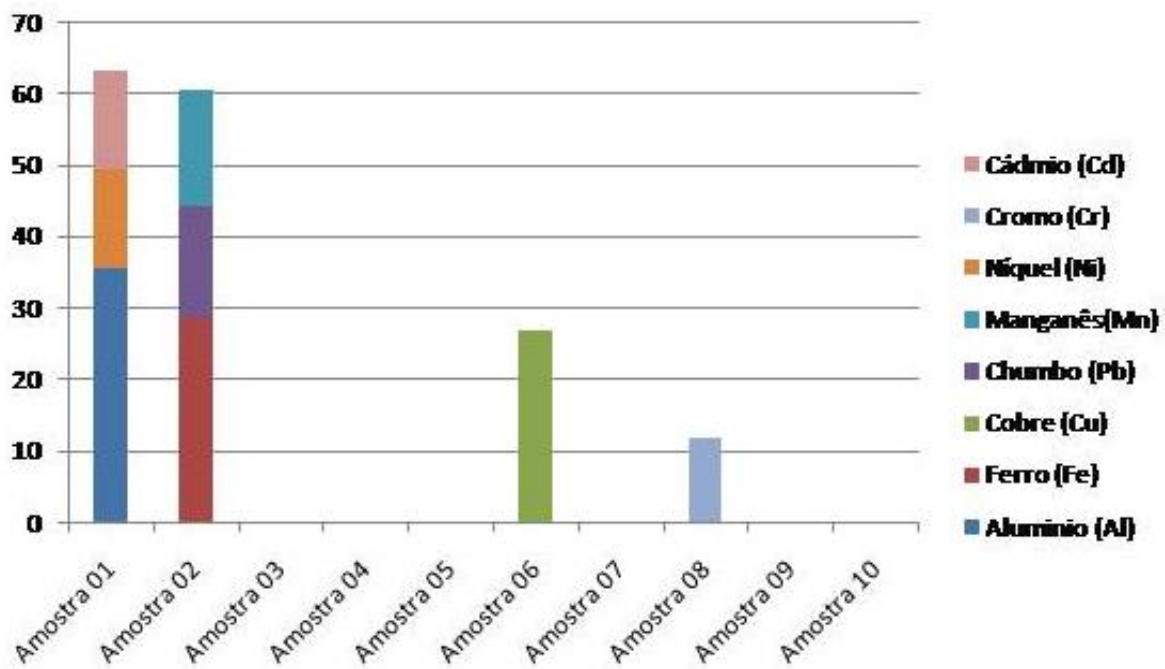


Figura 14: Amostras com concentrações mais elevadas de alguns metais pesados.

Alguns autores descrevem que a reprodução (transferência para os ovos) pode representar uma forma de eliminação desses elementos do organismo da fêmea (Sahoo et al., 1996; Keen et al., 1997; Godley et al., 1999). Sakai e colaboradores (2000) avaliaram a concentração de elementos traços em dois espécimes adultos de *C. mydas* e sete espécimes também adultos de *C. caretta* na costa do Japão e observaram que em geral as maiores concentrações estavam no fígado, rins e ossos e que as menores concentrações estavam no cérebro e nos músculos. Observaram também que, o fígado e os rins apresentavam concentrações relativamente maiores de Fe, Cu, Ni, Cd e Hg do que nos outros órgãos e que nos ossos as concentrações de Mg, Zn e Pb eram cinco vezes maiores que no fígado e rins. Lam et al., (2004) avaliaram a concentração de 19 elementos traços em diversos tecidos de *C. mydas* no sul da China, e destacaram alguns elementos que apresentaram concentrações relativamente altas e podem causar danos à saúde. Os autores ressaltaram os valores encontrados para Se, Sr, Hg, Cd, As, Pb, Co, Mn, Ni e Zn e seus potenciais efeitos nefrotóxicos, neurotóxicos e imunotóxicos, além de prejudicarem o desenvolvimento embrionário. Concentrações de Pb, Cd, Mn e Ni encontrada no muco das tartarugas

marinhas devem ser levando em consideração quanto a saúde dos animais e do ambiente.

De uma maneira geral não houve uma correlação entre as propriedades químicas e os metais registrados na amostra. Todavia o pH obteve uma relação significativa negativa para Cd, ou seja quando o pH aumenta o Cd diminui ou vice e versa, corroborando com Santos et al., (2014). Para o metal cádmio, em pH superior a 8, observa-se a precipitação da espécie metálica na forma de hidróxido e uma consequente diminuição da concentração de Cd. No que se refere a toxicidade houve uma relação significativa entre Pb ($r_s=0.7066$; $p=0.05$) bem como Mn ($r_s=0.7711$; $p=0.025$). Ao analisar a correlação entre os metais, observou-se uma relação entre o Cd e o Al ($r_s=0.7319$; $p=0.0389$) como demonstra a (Figura 16).

O estudo para análises de metais em amostras de tartarugas marinhas (*Eretmochelys imbricata*) realizadas em Ipojuca, por Simões (2016), observou a presença de seis tipos de metais (Co, Hg, Ni, Cu, Pb, Cr) para 18 amostras de sangue. No presente trabalho foi possível comparar com os dados da autora acima citada para as espécies recapturadas, informações possíveis através da marcação com anilhas. Ao comparar percebe-se um aumento nas concentrações dos metais (Tabela 07) no muco. No entanto, mesmo sendo dados ainda preliminares, sugere uma contaminação desses animais em diferentes materiais biológicos e apontam o muco como forma menos invasiva de coleta de material. Um outro ponto que se deve destacar é o monitoramento dessas tartarugas a longo prazo para verificar as concentrações desses metais.

A contaminação por metais pode se dar de diversas formas uma delas é através de ingestão de lixo, principalmente plásticos, que segundo Sheavly (2010) a presença dos resíduos marinhos constitui uma das mais graves ameaças à biodiversidade e sustentabilidade dos recursos naturais do mundo quando somada à complexidade física, ecológica e socioeconômica. Dentre os itens encontrados na praia em maiores quantidades estão os plásticos, que embora seja reconhecido como um importante componente do lixo marinho há várias décadas, seus impactos ecológicos e biológicos são pouco conhecidos atualmente, é o que comentam (Derraik 2002.; Moore 2008). Estudos sobre a quantificação de elementos metálicos em plásticos, têm sido pouco explorados, sendo a maior contribuição no setor alimentício,

cujo interesse é saber a quantidade de íons potencialmente tóxicos que podem migrar da embalagem para os alimentos, danificando sua qualidade (Zenebon et al., 2004; Birley, 1982; Takahashi et al., 2008 e 1999; Nomura et al., 2000; Soarez, 2008; Shepherd, 1982; Mateus, 1999; Westerhoff et al., 2008). Há também estudos mais recentes, que abordam a presença de elementos metálicos em lixo plástico encontrado nas praias (Nakashima et al., 2011). Com isso apontamos a necessidade de estudos que possam avaliar melhor a presença de metais no lixo marinho, apontando outras fontes, ou seja não é só por alimentação que se dá a contaminação.

Tabela 07: Recaptura de dois animais, identificados através da anilha na temporada 2017-2018, Ipojuca/PE e comparação dos principais metais com o estudo de Simões (2016)

Pesquisador	Nº Anilha	Amostra	Material Biológico	Metais			
				Ni	Cu	Pb	Cr
SIMÕES, 2016	BR 95325/95326	13	Sangue	1,759	0,182	0,518	0,118
Presente Trabalho	BR 95325/95326	1	Muco	14	23,8	15	12
SIMÕES, 2016	BR 95317/95318	8	Sangue	1,791	0,293	0,544	0,061
Presente Trabalho	BR 95317/95318	6	Muco	13,9	26,9	14,8	11,9

**Todos as concentrações estão mg/L

Divergências entre aos valores de concentração de elementos encontrados na literatura são esperadas, e decorrem provavelmente de variações quanto ao tipo de amostra biológica, às espécies, populações, estágio de vida, área, fonte de alimentação, bem como a concentração de elementos traços de origem natural ou antropogênica no ambiente estudado (Barbieri, 2009). Com isso destacamos que estudos com muco cloacal de tartarugas marinhas pode ser considerado um tipo de amostra eficiente. Todavia ainda é bastante escasso na literatura, isso com destaque para o Brasil. O que nos leva a perceber a relevância desse estudo como um ensaio da caracterização das propriedades químicas, toxicológicas e metais pesados no muco de tartarugas marinhas, apontando para diversas hipóteses que devem ser testadas em outros ensaios de pesquisa científica para esse fim.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação das propriedades presentes no muco cloacal de tartarugas marinhas, nos trouxe bastante informações sobre a proteína bruta, a toxicidade e a presença de metais pesados principalmente com concentrações altas nas amostras analisadas, e nos mostra o quanto a tartaruga marinha é uma sentinela ambiental, indicando assim um grau de contaminação na cadeia alimentar, uma vez que os itens alimentares são as principais fontes de proteína e contaminantes.

A toxicidade do muco cloacal varia bastante entre indivíduos, podendo indicar assim, uma exposição recente a contaminantes já que as primeiras coletas são as que apresentaram uma toxicidade maior. O número de proteína apresentou relação com o sucesso de eclosão dos ninhos, nos levando a especular uma possível interação interna.

A característica mais marcante desse trabalho foi identificar vários metais no muco e principalmente por estar em contato direto com o embrião desde início de sua formação, como mostra em alguns estudos, que contaminantes podem ser transferidos para o filhote através da mãe, no entanto muito pouco foi esclarecido até então.

Várias hipóteses foram levantadas, porém os números de estudos em relação ao muco são escassos, necessitando mais pesquisas nessa área para comparação. Sendo assim, a partir das análises qualitativa realizada nesse estudo, é possível afirmar que o muco é um indicador de saúde do animal e ambiente e que pode ser usado para caracterizar diversos elementos.

5. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, RA. The Nest Environment and the Embryonic Development of Sea Turtles. In: LUTZ, P.L.; MUSICK, J.A. (Eds.). *The Biology of Sea Turtles*. CRC Marine Science Series, Boca Raton, p. 83-108, 1997.
- ANAN, Y.; KUNITO, T.; SAKAI, H.; TANABE, S. Subcellular distribution of trace elements in the liver of sea turtle. *Mar. Pollut. Bull.*, **v. 45**, p. 224-229, 2002.
- ANAN, Y.; KUNITO, T.; WATANABE, I.; SAKAI, H.; TANABE, S. Trace element accumulation in hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) and green turtle (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **v. 20**, p. 2802 – 2814, 2001.
- BARBIERI, E. Concentration of Heavy Metals in Tissues of Green Turtles (*Chelonia mydas*) Sampled In, The Cananéia Estuary, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, **v. 57**, p. 243 – 248, 2009.
- BERGQUIST, PR.; WELLS, RJ. Em *Marine Natural Products: Chemical e Biological Perspectives*, P. J.Scheuer, Ed.; Academic Press; New York. **vol. 5**, p. 1-50. 1983.
- BIRLEY, WA. Plastic used in food packaging and the role of additives. *Food Chem.* **v. 8**, p. 81-84. 1982.
- BJORNDAL, KA. Foraging ecology and nutrition of sea turtles. In: *The biology of sea turtles*. Lutz, P. & Musick, J. A (eds). CRC-Marine Science Biology. **8** :199-232.1996.
- BJORNDAL, KA. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia*, **n. 3**, p. 736–751, 1985.
- BURGER, J.; GOCHFELD, M. Cadmium and lead in common terns (Aves *Sterna-Hirundo*)—relationship between levels in parents and eggs. *Environmental Monitoring and Assessment*, **v. 16**, p. 253-258, 1991.

BUSTARD H. GREENHAM P. Nesting behavior of the green sea turtle on a Great Barrier Reef island. *Herpetologica* **25**: 93-102. 1969.

CESAR, BCA. Avaliação da temporada de desova das tartarugas-de-pente (*Eretmochelys imbricata*), evidências de poluição luminosa e perda de habitat em Ipojuca, PE. 2007. 48p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

DERRAIK, JGB. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, [Oxford, Inglaterra], **v. 44**, p. 842-852. 2002.

FURNESS, RW.; MONAGHAN, P. (Ed.). *Seabird ecology*. New York: Chapman & Hall, 1987. 164 p.

GODLEY, BJ.; THOMPSON, DR.; FURNESS, RW. Do Heavy Metal Concentrations Pose a Threat to Marine Turtles from the Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **v. 38**, n. 6, p. 497 – 502, 1999.

GUIRLET, E.; DAS, K.; GIRONDOT, M. Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology*, **v. 88**, p. 267–276, 2008.

HAMANN, M.; LIMPUS, CJ.; WHITTIER, JM. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Journal of Comparative Physiology B*, **v. 172**, p. 485–493, 2002.

HAMMEN, CS.; FLORKIN, M. Em *Chemical Zoology*, M. Florkin e B. T. Scheer, Eds.; Academic Press; New York, **vol. II**, p. 53-64. 1968.

HIRTH HF. Some aspects of the nesting behaviour and reproductive biology of sea turtles. *Am Zool*, **v.20**, p.507, 1980.

KAMPALATH, R.; GARDNER, SC.; MENDEZ-RODRIGUEZ, L.; JAY JA. Total and methylmercury in three species of sea turtles of Baja California Sur. *Marine Pollution Bulletin*, **v.52**, p.1784–1832, 2006.

KEEN. CL.; TAUBENECK, MW.; ZIDENBERG-CHERR, S.; DASTON, GP.; ROGERS, JM. Toxicant exposure and trace element metabolism in pregnancy. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **v. 4**, p. 301–308, 1997

KEENE, EL. Microorganisms from sand, cloacal fluid, and eggs of *Lepidochelys olivacea* and standard testing of cloacal fluid antimicrobial properties. 2012.139p. (Monografia) Indiana University – Purdue University Fort Wayne.

KJELDAHL, J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem*, **22**, p.366-382, 1883.

LAM, JCW.; TANABE, S.; CHAN, SKF.; YUEN, EKW.; LAM, MHW.; LAM, PKS.. Trace element residues in tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) from South China Waters. *Marine Pollution Bulletin*, **v.48**, p.164–192, 2004.

MACÊDO, GR. Distribuição de elementos traço nos tecidos de tartarugas de pente (*Eretmochelys imbricata*) e tartarugas verde (*Chelonia mydas*) no litoral norte da Bahia, Brasil. 2012. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal nos trópicos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MARCOVALDI, MA. & MARCOVALDI, GG. Marine Turtles of Brazil: The History and Structure of Projeto Tamar-IBAMA. *Biological conservation*, **n.91**, p.35-41, 1999.

MÁRQUEZ, RM. Sea turtles of the world. anannotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. *FAO Fisheries Synopsis*. Roma.**11** (125). 1990.

MATEUS, SF. Determinação de componentes inorgânicos em plásticos pelo método de análise de ativação neutrônica. Tese. IPEN (Instituto de pesquisas energéticas e nucleares). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MEYER, BN.; FERRIGNI, NR.; PUTNAN, JE.; JACOBSEN, LB.; NICHOLS, DE.; McI. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. **45**, n.1, p. 31-34, 1982.

MEYLAN, AB. Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass. *Science*, [S.l.], v.**239**, p.393-395, 1988.

MOORE, CJ. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.*, v. **108**, 131–139. 2008

MORTIMER J. The feeding ecology of the west caribbean green turtle (*Chelonia mydas*) in Nicaragua. *Biotropica*.**13** (1): p 49-58. 1981.

NAKASHIMA, E.; ISOBE, A.; KAKO, S.; MAGOME, S.; DEKI, N.; ITAI, T.; TAKAHASHI, S. Toxic metals in polyethylene plastic litter. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry- Marine Environmental Modeling & Analysis*. p. 271-277. 2011.

NOMURA, DH.; MATEUS, SF.; SAIKI, M.; BODE, P. Characterization of inorganic components in plastic materials. *J. of Radioanalytical and Nuclear Chem.* v. **244**, n. 1, p. 61-65. 2000.

PAÉZ-OSUNA, F.; CALDERÓN-CAMPUZANO, MF.; SOTO-JIMÉNEZ, MF.; RUELASINZUNZA, JR. Trace Metals (Cd, Cu, Ni, and Zn) in Blood and Eggs of the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea* from a Nesting Colony of Oaxaca, Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. **59**, p. 632-641, 2010.

PROKSCH, P. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*. **32**(6):639-55. 1994.

RESETARITS, WJ. Oviposition site choice and life history evolution. *American Zoologist*, **36**, 205-215. 1996.

ROSS, JP. Biology of the Green Turtle, *Chelonia mydas*, on an Arabian Feeding Ground. *Journal of Herpetology*, **v. 19**, p. 459-468, 1985.

SAHOO, G.; SAHOO, RK.; MOHANTY-HEJMADI, P. Distribution of heavy metals in the eggs and hatchlings of olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Gahirmatha, Orissa. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, **v. 25**, p. 371–372, 1996.

SAKAI, H.; SAEKI, K.; ICHIHASHI, H.; SUGANUMA, H.; TANABE, S.; TATSUKAWA, R. Species-specific distribution of heavy metals in tissues and organs of Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) and Green Turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin.*, **v. 40**: 701-709. 2000.

SARMA, AS.; DAUM, T.; MULLER, WEG. *Secondary Metabolites from Marine Sponges*, Ullstein Mosby; Mainz, Germany, 1993.

SHEAVLY, SB. National marine debris monitoring program: Lessons learned. Sheavly Consultants, Inc. 26 p. 2010.

SHEPHERD, MJ. Trace contaminations of foods by migration from plastics packaging- a review. *Food Che.* **v. 8**, p. 129-145. 1982.

SIMAS, RC. Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo. Tese (mestrado). 2005. p.137. Universidade Estadual de Campinas

SIMÕES, TN. et al. *Temperatura de Incubação e Razão Social em Filhotes recém-eclodidos da Tartaruga Marinha Eretmochelys imbricata (Linnaeus, 1766) no município do Ipojuca, Pernambuco, Brasil.* 2014

SIMÕES, TN.; Metais pesados em sedimento, cascas de ovos e sangue de tartarugas marinhas da espécie *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766). Tese (mestrado). p.79. Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão. 2016.

SOAREZ, EP. Estudo do método radiométrico para avaliação de migração de elementos de embalagens plásticas para se conteúdo. Tese. IPEN (Instituto de pesquisas energéticas e nucleares). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TAKAHASHI, Y.; MUKAI, H.; TANABE, S.; SAKAIAMA, K.; MIYAZAKI, T. and MASUNO, H. Butylin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ. Pollut*, **v.106**, p. 203-218. 1999.

TAKAHASHI, Y.; SAMUMA, K.; ITAI, T. ZHENG, G. and SATO, M. Speciation of antimony in PET bottles produced in Japan and China by X- ray absorption fine structure spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, **v. 42**, p. 9045- 9050. 2008.

TUCKER, AD.; READ, MA. Frequency of foraging by gravid green turtles (*Chelonia mydas*) at Raine Island, Great Barrier Reef. *Journal of Herpetology*, **v. 35**, p. 500–503, 2001.

WANG, WX. Interactions of trace metals and different marine food chains. *Marine Ecology Progress Series*, **v. 243**, p. 295–309, 2002.

WESTERHOFF, P.; PRAPAIPONG, P.; SHOCK, E.; HILLAIREAU, A. Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water. *Water Res.*, **v. 42**, p. 551- 556. 2008

WEISROCK, DW.; JANZEN, FJ. Thermal and fitness-related consequences of nest location in Painted Turtles (*Chrysemys picta*). *Functional Ecology*, **v. 13**, n. 1, p. 94-101, 2000.

ZENEBON, O.; MURATA, L.T.F.; PASCUET, N.; ALCÂNTARA, M.R.S.; NUNES, M.C.D.; RIBEIRO, E.R.; TIGLEA, P. Determinação de metais presentes em corantes e

pigmentos utilizados em embalagens para alimentos. Rev. Inst. Adolf Lutz. v. **63**, n. 1, p.56-62. 2004.

6. ANEXO I

Normas para submissão de Artigo na Herpetology notes.

Notas de Herpetologia

[Casa](#) [Sobre](#) [Entrar](#) [Registo](#) [Pesquisa](#) [Atual](#) [Arquivos](#) [Anúncios](#) [Diretrizes Do Autor](#)

Home > Sobre a Revista > Envios

Submissões

[Submissões online](#)
[Diretrizes do autor](#)
[Declaração de privacidade](#)
[Taxas do autor](#)

Submissões online

Já tem um nome de usuário / senha para anotações de herpetologia?

[IR PARA LOGIN](#)

Precisa de um nome de usuário / senha?

[VÁ PARA O REGISTRO](#)

Registro e login são necessários para enviar itens on-line e verificar o status dos envios atuais.

Diretrizes do autor

Instruções para pagamento de taxas de publicação

Quando você recebe as provas de página do seu artigo, é solicitado que você faça um pagamento para cobrir os custos de composição. Este pagamento é de € 50 para as primeiras cinco páginas no layout final, mais € 5 para as páginas adicionais. Se você é um membro do SEH, isso é reduzido para 20 euros para as primeiras cinco páginas, mais 5 euros por página adicional (considere os benefícios da filiação ao SEH!). Na interface do seu manuscrito, você verá um botão chamado "Pagar para enviar". Pressione este link uma vez e pague a taxa exigida via PayPal. Por favor, envie uma prova do seu pagamento, juntamente com as provas de página corrigida (e prova de filiação ao SEH, se aplicável).

Observe que o link não desaparecerá até que o *HN* Managing Editor for Publication tenha verificado manualmente o pagamento, o que pode levar de uma a duas semanas. Não pressione o link para pagar uma segunda vez. Se o pagamento não foi recebido, iremos notificá-lo! Seu trabalho não será colocado on-line e você não receberá uma cópia eletrônica final, até que suas taxas sejam pagas. Para quaisquer dúvidas ou preocupações relacionadas a esta mensagem, entre em contato conosco usando a interface do seu manuscrito.

Formato do manuscrito

Por favor, consulte artigos recentes publicados em *Herpetology Notes* para o formato detalhado e estrutura de artigos completos ou notas curtas. Certifique-se de seguir estritamente a formatação de citações e referências no texto. Os manuscritos devem ser formatados usando espaçamento duplo e com numeração de página e linha contínua em todo o texto. Ao preparar o manuscrito, defina seu idioma para o documento inteiro como "Inglês (Reino Unido)" e inclua isso como padrão para Comentários (Formato> Estilo ..., selecione Comentário de Texto na caixa Estilos, clique em Modificar, selecione Idioma. ... no menu suspenso Formato no canto inferior esquerdo, selecione Inglês (Reino Unido), clique em OK, OK e Aplicar). Os autores cuja primeira língua não é o inglês são aconselhados a ter seu manuscrito editado por um falante nativo de inglês antes do envio.

Todos os manuscritos começam com o título, centralizado, no caso da sentença, letras em negrito (não todas em maiúsculas, não em maiúsculas), seguidas por uma linha vazia, o primeiro e último nomes de todos os autores escritos e com as iniciais intermediárias. e endereço de cada autor, e o endereço de e-mail do autor correspondente.

Extensão de alcance para o *ónibus Aus M* (Smith et al., 1822)

com uma descrição de um comportamento de escape único

João da Silva^{1,*}, Mary Johnson¹, Ricardo Correia^{2,3} e Anamaria Portillo⁴

¹ Departamento de Biologia da Universidade Estadual Fictícia, Lincoln, Massachusetts 01234, EUA

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Gregório, Avenida Antônio Muñoz 66, Belo Horizonte, Minas Gerais 30000-90, Brasil

³ Endereço atual: Instituto de Estudos Biológicos, Universidade do Paraná, Curitiba, Paraná 80000-000, Brasil

⁴ Museum für Naturkunde, Weidenallee 17, 12345 Berlim, Alemanha

* Autor correspondente. E-mail: jdoe9999@gmail.com

Apenas em artigos completos, isso é seguido por um resumo e por palavras-chave.

Abstrato. Apresentamos um inventário herpetofaunal ...

Palavras-chave Répteis

Considerações Técnicas

Fotografias e ilustrações coloridas devem ser apresentadas com uma resolução de 300 dpi. Se for adequado para fins de apresentação, a arte em tons de cinza a 300 dpi é aceitável. A arte de linha (apenas em preto e branco, incluindo gráficos ou desenhos de linha) deve ter uma resolução de 1200 dpi.

Existem três maneiras pelas quais a ilustração pode ser integrada em um texto publicado em *Herpetology Notes*: na largura de uma única coluna, na largura de duas colunas ou como uma figura de página inteira. Como consequência, não há um formato definido para as dimensões dos gráficos e eles podem ser orientados no formato paisagem ou retrato.

Largura de coluna única - As ilustrações preparadas na largura de coluna única são o menor tipo de ilustração nas *Notas de Herpetologia*, e esse formato deve ser reservado para ilustrações claras que não exigem atenção aos detalhes. Este tamanho é adequado para alguns gráficos de linhas simples ou para ilustrações claras sem fundos ruidosos. Estas figuras devem ser apresentadas com uma largura de 10 cm a 300 dpi.

Largura de duas colunas - A maioria das ilustrações em *Herpetology Notes* é melhor planejada para o formato de duas colunas, o que significa que elas alcançam toda a página. Estes serão normalmente colocados no topo ou no fundo de uma página, com texto abaixo ou acima, conforme necessário. A largura dessas imagens deve ser de 20 cm a 300 dpi.

Ilustrações de página inteira - sob algumas circunstâncias, uma ilustração de página inteira pode ser necessária. Neste caso, a imagem ocupará toda a página, sem qualquer tipo de texto. A legenda da figura será normalmente colocada na página oposta, com uma seta indicando que ela faz parte da figura de página inteira. As dimensões máximas de tal figura são 28 x 20 cm.

- *Figuras compostas* - Muitas vezes, é aconselhável agrupar figuras porque várias figuras únicas podem interromper o fluxo de leitura de uma publicação. As seguintes configurações são permitidas:

- duas imagens uma acima da outra na largura da coluna única;
- duas imagens lado a lado na largura de duas colunas;
- três imagens em uma coluna vertical na largura de uma única coluna;
- quatro imagens em uma configuração 2 x 2 na largura de duas colunas
- seis imagens construiram duas ilustrações de largura e três ilustrações de altura na largura de duas colunas.

Observe que essas são as únicas configurações permitidas para imagens com medidas regulares (por exemplo, dimensionais). Claro, outras configurações são possíveis, e os autores podem consultar um dos Editores de Gerenciamento para otimizar suas ilustrações.

Se uma figura composta com várias partes for considerada, as partes devem ser montadas e enviadas como um único arquivo, com partes individuais rotuladas usando letras maiúsculas em negrito em uma fonte sem serifa (por exemplo, Arial, Calibri), em tamanho e cor apropriados para a ilustração em si. Tais imagens devem ser submetidas como arquivos em camadas (por exemplo, TIFF), preservando a opção de editar facilmente o tamanho da fonte e do texto. Não mescle camadas. Em figuras de tamanho final, as letras devem ter pelo menos 2 mm de altura e decimais devem estar claramente visíveis.

Considerações de design

Na concepção de qualquer ilustração, devem ser utilizados princípios científicos sólidos (por exemplo, utilização de unidades do SI, etiquetagem de eixos, escalas para indicar a distância do mapa ou o tamanho do motivo, quando adequado). Os autores devem lembrar que as ilustrações precisam ajudar o leitor a compreender a

Palavras-chave. Répteis, ...

Notas curtas não têm resumo nem palavras-chave. Por favor, note que as palavras-chave devem ser termos usados **além** dos termos já utilizados no título. Isso é para aumentar a visibilidade do papel em pesquisas on-line.

Em artigos completos, o primeiro cabeçalho é Introdução. Este não é um título usado em Notas curtas. Os títulos principais no texto (Materiais e Métodos, Resultados, Discussão) são escritos em negrito e alinhados à esquerda, com o seguinte texto recuado.

Discussão

As três espécies que gravamos em ...

Os títulos secundários, assim como os agradecimentos, são ousados e estão de acordo com o texto regular.

Agradecimentos Nós agradecemos ...

Os títulos terciários são recuados, em itálico e seguidos por um período e um traço.

Extração de DNA - Nós usamos o ...

Nomes científicos de espécies e palavras em outras línguas (por exemplo, *sensu lato*, *nomen nudum*, *bauplan*) também estão em itálico. Os parágrafos devem ser recuados e não separados uns dos outros por uma linha vazia.

Ao apresentar o manuscrito completo, o texto deve ser seguido por tabelas incorporadas (com legendas de tabela colocadas acima das tabelas) e figuras embutidas (com legendas de figuras colocadas abaixo das ilustrações).

Tabelas

A preparação das tabelas deve ser feita no formato de tabela apropriado e NÃO usando recuos e guias. Geralmente, é conveniente criar tabelas em uma planilha (por exemplo, MS Excel) e depois importar a tabela para o MS Word. É essencial que as tabelas sejam adequadamente construídas, pois, caso contrário, é muito demorado editá-las e editá-las. Ao construir as versões finais das tabelas, considere como elas podem ser exibidas em uma página de diário e faça os ajustes apropriados antes da submissão do manuscrito.

Figuras

A elaboração de figuras requer não apenas o cumprimento das instruções técnicas da revista, mas também uma reflexão cuidadosa sobre parte dos autores. A apresentação de um manuscrito conceitualmente forte em combinação com ilustrações inadequadas ou mal construídas pode colocar em questão toda a premissa do artigo e o cuidado do (s) autor (es).

Considerações Técnicas

Fotografias e ilustrações coloridas devem ser apresentadas com uma resolução de 300 dpi. Se for adequado para fins de apresentação, a arte em tons de cinza a 300 dpi é aceitável. A arte de linha (apenas em preto e branco, incluindo gráficos ou desenhos de linha) deve ter uma resolução de 1200 dpi.

Existem três maneiras pelas quais a ilustração pode ser integrada em um texto publicado em *Herpetology Notes*: na largura de uma única coluna, na largura de duas colunas ou como uma figura de página inteira. Como consequência, não há um formato definido para as dimensões dos gráficos e eles podem ser orientados no formato paisagem ou retrato.

Largura de coluna única - As ilustrações preparadas na largura de coluna única são o menor tipo de ilustração nas *Notas de Herpetologia*, e esse formato deve ser reservado para ilustrações claras que não exigem atenção aos detalhes. Este tamanho é adequado para alguns gráficos de linhas simples ou para ilustrações claras sem fundos ruidosos. Estas figuras devem ser apresentadas com uma largura de 10 cm a 300 dpi.

Largura de duas colunas - A maioria das ilustrações em *Herpetology Notes* é melhor planejada para o formato de duas colunas, o que significa que elas alcançam toda a página. Estes serão normalmente colocados no topo ou no fundo de uma página, com texto abaixo ou acima, conforme necessário. A largura dessas imagens deve ser de 20 cm a 300 dpi.

Ilustrações de página inteira - sob algumas circunstâncias, uma ilustração de página inteira pode ser necessária. Neste caso, a imagem ocupará toda a página, sem qualquer tipo de texto. A legenda da figura será normalmente colocada na página oposta, com uma seta indicando que ela faz parte da figura de página inteira. As dimensões máximas de tal figura são 28 x 20 cm.

- *Figuras compostas* - Muitas vezes, é aconselhável agrupar figuras porque várias figuras únicas podem interromper o fluxo de leitura de uma publicação. As seguintes configurações são permitidas:

- duas imagens uma acima da outra na largura da coluna única;
- duas imagens lado a lado na largura de duas colunas;
- três imagens em uma coluna vertical na largura de uma única coluna;
- quatro imagens em uma configuração 2 x 2 na largura de duas colunas
- seis imagens construíram duas ilustrações de largura e três ilustrações de altura na largura de duas colunas.

Observe que essas são as únicas configurações permitidas para imagens com medidas regulares (por exemplo, dimensionais). Claro, outras configurações são possíveis, e os autores podem consultar um dos Editores de Gerenciamento para otimizar suas ilustrações.

Se uma figura composta com várias partes for considerada, as partes devem ser montadas e enviadas como um único arquivo, com partes individuais rotuladas usando letras maiúsculas em negrito em uma fonte sem serifa (por exemplo, Arial, Calibri), em tamanho e cor apropriados para a ilustração em si. Tais imagens devem ser submetidas como arquivos em camadas (por exemplo, TIFF), preservando a opção de editar facilmente o tamanho da fonte e do texto. Não mescle camadas. Em figuras de tamanho final, as letras devem ter pelo menos 2 mm de altura e decimais devem estar claramente visíveis.

Considerações de design

Na concepção de qualquer ilustração, devem ser utilizados princípios científicos sólidos (por exemplo, utilização de unidades do SI, etiquetagem de eixos, escalas para indicar a distância do mapa ou o tamanho do motivo, quando adequado). Os autores devem lembrar que as ilustrações precisam ajudar o leitor a compreender a

Na concepção de qualquer ilustração, devem ser utilizados princípios científicos sólidos (por exemplo, utilização de unidades do SI, etiquetagem de eixos, escalas para indicar a distância do mapa ou o tamanho do motivo, quando adequado). Os autores devem lembrar que as ilustrações precisam ajudar o leitor a compreender a pesquisa, e sua qualidade é um componente significativo do papel em si; ilustrações desnecessárias devem ser evitadas. As imagens devem ser produzidas pelos autores ou seus agentes, e a origem da imagem deve ser indicada na legenda da figura (por exemplo, "Foto de John Smith"). Não use imagens de fontes on-line ou fontes protegidas por direitos autorais, a menos que a permissão para seu uso seja obtida ANTES da submissão; essa permissão deve ser reconhecida.

Em geral, imagens nítidas, brilhantes e coloridas, cortadas para mostrar apenas o que é necessário, ficam melhores na impressão. A luz suave ou o foco suave podem se tornar problemáticos, e os autores são encorajados a dar uma olhada em sua figura depois de imprimi-la nas dimensões do jornal. Há também um limite para a quantidade de informações apresentadas com êxito em uma única imagem e, em um formato on-line como as *Notas de Herpetologia*, é correto errar do lado de uma imagem e cor extras.

Versões finais das figuras serão solicitadas via upload após a aceitação final do manuscrito.

Citações de literatura no texto

Estes devem ser apresentados em ordem cronológica, como segue:

- Esse fenômeno também foi descrito por Petranka (1998) e Griffiths et al. (2010).
- Vários autores comentaram anteriormente sobre esse fenômeno (por exemplo, Griffiths, 1996; Michimae e Wakahara, 2001; Schmidt et al., 2005).

Quando houver mais de dois autores, apenas o primeiro deve ser nomeado, seguido por "et al." (Não em itálico): Griffiths et al. (2010) ou (Griffiths et al., 2010).

Tanto a introdução como a discussão devem incluir um número adequado de citações para que argumentos efetivos sejam estabelecidos.

Referências

As referências devem ser digitadas na seguinte ordem e forma, respectivamente:

Na seção Referências, as publicações devem ser listadas em ordem alfabética (A > Z), e depois ordem cronológica, pelo nome do primeiro autor. Todas as publicações citadas no texto, exceto aquelas listadas apenas para estabelecer a autoridade dos nomes dos táxons, devem ser incluídas. Liste referências com três ou mais nomes de autores depois daqueles com apenas dois autores. Se os artigos de (um) autor (es) que publicaram mais de um artigo em um determinado ano forem citados, então use letras após o ano (por exemplo, Doolittle, 2010a, b)

Os nomes das revistas devem ser escritos sem abreviaturas. Nenhum espaço é inserido entre as iniciais dos autores. Não insira linhas vazias entre as referências, mas indente o texto após a primeira linha. Os números de volume são escritos em negrito, mas os símbolos de cólon não são. Os dois últimos autores ou editores em uma citação são separados apenas por uma vírgula. Os intervalos de páginas são separados por um traço.

Exemplos:

Exemplos:

artigo de jornal

Myers, EM, Zamudio, KR (2004): paternidade múltipla em um anfíbio reprodutor agregado: o efeito do desvio reprodutivo nas estimativas do sucesso reprodutivo masculino. *Molecular Ecology* **13** : 1951-1963.

Capítulo de livro

Kiesecker, JM (2003): Espécies invasoras como um problema global. Para entender o declínio mundial dos anfíbios. Em: *Conservação dos anfíbios*, p. 113–126. Semlitsch, RD, Ed., Washington, EUA, Smithsonian Institution Press.

Livro

Zug, GR, Vitt, LJ, Caldwell, JP (2001): *Herpetologia. Uma Biologia Introdutória de Anfíbios e Répteis, Segunda Edição*. San Diego, EUA, Academic Press.

Tese

Jones, EP (2003): Efeitos das mudanças climáticas na herpetofauna da Península Ibérica. Tese de doutorado não publicada, Universidade de Barcelona, Barcelona, Espanha.

Programas

ESRI (2011): ArcGIS, versão 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands, Califórnia, EUA.

Local na rede Internet

Uetz, P. (2010): *matrix matrix* . O banco de dados de répteis. Disponível em: <http://www.reptile-database.org>. Acesso em 7 de setembro de 2014.

Arquivo de estilo EndNote

Notas Herpetology tem um arquivo de estilo Endnote. O EndNote © é um pacote de software comercial para publicação e gerenciamento de bibliografias, citações e