

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ASPECTOS QUÍMICOS E MORFOLÓGICOS E EFEITOS DA
PARATIONA METÍLICA EM CASCAS DE OVOS DE
PODOCNEMIS EXPANSA (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE**

Caio Henrique Ferreira
Nutricionista

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ASPECTOS QUÍMICOS, MORFOLÓGICOS E EFEITOS DA
PARATIONA METÍLICA EM CASCAS DE OVOS DE
PODOCNEMIS EXPANSA (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE**

Caio Henrique Ferreira

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL

Março de 2014

F383a Ferreira, Caio Henrique

Aspectos químicos, morfológicos e efeitos da parationa metílica em cascas de ovos de *Podocnemis expansa* (testudines, podocnemididae) incubados artificialmente / Caio Henrique Ferreira. – Uberlândia, 2014.

66f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, 2014.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

1. Agrotóxico 2. Ecotoxicologia 3. Incubação I. Título

CDU: 632.95.02

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Caio Henrique Ferreira, filho de José Ferreira da Cunha e Maria de Lourdes Pereira da Cunha, nasceu em Patrocínio, Minas Gerais, em 04 de Maio de 1990. Em Janeiro de 2012, graduou-se como Bacharel em Nutrição pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Durante a graduação foi monitor e estagiário do Laboratório de Anatomia Humana, Histologia, Citologia e Embriologia. Em Fevereiro de 2012, ingressou no programa de Pós-graduação das Ciências Veterinárias, na área de Saúde Animal na Universidade Federal de Uberlândia – MG.

“Tenho a impressão de ter sido criança brincando à beira mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, minha razão de viver, a Ele toda Honra, toda Glória, Todo louvor.

Aos meus pais (José Ferreira e Maria de Lourdes), meus irmãos (Diego e Mônica), ao Carlos e toda sua família, pelo amor e pelo incentivo sempre.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós-graduação de Ciências Veterinárias e a CAPES pela oportunidade e aprendizado.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos e à equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS) pela parceria e ensinamentos.

Aos Pós-doutorandos Lucélia Gonçalves Vieira e Sady Alexis ChavautyValdes pela amizade sincera, pela confiança, pela disposição e pela ajuda sempre.

Aos meus amigos em especial Fernanda, Daniela, Dorislei "Tia Dorinha", Lorena, Sergio, Thais e Juliana.

Aos Professores Evandro de Abreu Fernandes e Marcelo EmílioBeletti pelos ensinamentos concedidos.

Aos técnicos FabrícioFaria Araújo eEster Cristina Borges Araújo do Laboratório de Histologia ICBIM-UFU, pela ajuda na execução do processo histológico, pela ajuda na execução do processo histológico.

Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por todo apoio logístico e pela cooperação técnica.

Ao CMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Ao Instituto de Biologia Celular da Universidade Federal de Brasília (UnB) pelo suporte fornecido ao projeto, em especial à técnica Ingrid Gracielle Martins da Silva.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo do Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela doação do produto técnico parationa metílica.

E a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para o alcance dessa meta.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1.1 TESTUDINES	13
1.2 <i>PODOCNEMIS EXPANSA</i>	14
1.3 OVOS.....	15
1.4 INCUBAÇÃO.....	17
1.5 AGROTÓXICOS	18
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2 - ASPECTOS QUÍMICOS DA CASCA DE OVOS DE <i>PODOCNEMIS EXPANSA</i> PÓS-ECLOSÃO (TESTUDINES, <i>PODOCNEMIDIDAE</i>) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE.	29
2.1 INTRODUÇÃO.....	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.2.1 <i>Local de coleta de ovos</i>	33
2.2.2 <i>Incubação Artificial</i>	35
2.2.3 <i>Espessura</i>	35
2.2.4 <i>Análise Química</i>	35
2.2.5 <i>Análise estatística</i>	36
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.4 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA PARATIONA METÍLICA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MORFÓLOGIA DE CASCAS DE OVOS DE <i>PODOCNEMIS EXPANSA</i>(TESTUDINES, <i>PODOCNEMIDIDAE</i>) INCUBADOSARTIFICIALMENTE.....	43
3.1 INTRODUÇÃO	45
3.2 MATERIAL E METÓDOS	47
3.2.1 <i>Coleta dos ovos</i>	47
3.2.2 <i>Incubação artificial dos ovos e coleta das cascas</i>	47

3.2.3	<i>Espessura da casca</i>	48
3.2.4	<i>Análise química</i>	48
3.2.5	<i>Microscopia de luz</i>	49
3.2.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	49
3.2.7	<i>Análise estatística</i>	49
3.3	RESULTADOS.....	51
3.3.1	<i>Fósforo</i>	51
3.3.2	<i>Extrato etéreo</i>	52
3.3.3	<i>Cálcio</i>	53
3.3.4	<i>Matéria mineral</i>	54
3.3.5	<i>Proteína bruta</i>	55
3.3.6	<i>Espessura</i>	56
3.3.7	<i>Microscopia de luz</i>	57
3.3.8	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	58
3.4	DISCUSSÃO	60
3.5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Podocnemis expansa</i> (Fonte: LAPAS/UFU/UDI/2014).....	14
Figura 2: Fórmula estrutural do inseticida parationa metílica (ANVISA, 2014).	20
Figura 3: Área de localização das praias do Rio Araguaia – GO protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMBio). Fonte: ICMBio MMA.....	34
Figura 4: Porcentagem média de fósforo na casca de ovos de <i>Podocnemis expansasubmetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*),p < 0.05 em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**),p < 0.01em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.</i>	52
Figura 5: Porcentagem média de Extrato etéreo na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*),p < 0.05 em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**),p < 0.01em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.....</i>	53
Figura 6: Porcentagem média de Cálcio na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*),p < 0.05 em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.....</i>	54
Figura 7: Porcentagem média de Matéria Mineral na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.(*),p < 0.05 em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.....</i>	55
Figura 8: Porcentagem média de Proteína bruta na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa submetidos à exposição a diferentes</i>	

concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.....56

Figura 9: Comparação das médias e desvio padrão da variável Nitrogênio em relação aos 20 primeiros dias de incubação com os demais tempos.57

Figura 10: Fotomicrográficas de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* incubados em areia com 2 cm de vermiculita vermiculita sem adição de agrotóxicos **A** 18 dias de incubação. **B**, 39 dias de incubação. **C**, 60 dias de incubação. **D**, 3 dias de incubação. com coloração picosirius **FC**, Fibras de Colágenos (Uberlândia, 2013).58

Figura 11: Fotoeletromicrografias da casca de ovo de *Podocnemis expansa* com 39 dias de incubação sem exposição a agrotóxico. **Seta**, espiculas (Brasília, 2013).59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química, em porcentagem, de cascas de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> coletados em dois ninhos às margens dos rios do Araguaia.	37
Tabela 2: Porcentagem média de fósforo na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.....	51
Tabela 3: Porcentagem média de extrato etéreo na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.	52
Tabela 4: Porcentagem média de Cálcio na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.....	53
Tabela 5: Porcentagem média de Matéria mineral na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.	54
Tabela 6: Porcentagem média de Proteína bruta na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.	55
Tabela 7: Média de Espessura na casca de ovos de <i>Podocnemis expansa</i> submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação(mm).	56

1 CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Testudines

Existem cerca de 330 espécies de Testudines distribuídas em 13 famílias, encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártida (POUGH et al., 2008). Esses animais são divididos em duas sub-ordens: Cryptodira e Pleudira. A diferença básica entre as sub-ordens encontra-se na maneira como elas retraem a cabeça, na Cryptodira há retração da cabeça por meio de uma flexão vertical, enquanto na Pleurodia, o pescoço é flexionado lateralmente (POUGH et al., 2003).

Quanto à estrutura física dos Testudines, tem-se o casco como a característica mais distintiva (POUGH et al., 2008), intimamente ligado a alguns padrões de comportamento (MOLINA, 1992). A porção dorsal convexa é a carapaça e a parte ventral mais achatada é o plastrão. As vértebras torácicas e as costelas são geralmente soldadas com a carapaça óssea (STORER et al., 1995). Os ossos da carapaça são recobertos por escudos córneos de origem epidérmica, que não coincidem em número e posição com os ossos subjacentes (POUGH et al., 2008).

De acordo com as características ambientais e climáticas, os Testudines concentram suas atividades reprodutivas em períodos sazonais curtos ou as apresentam distribuídas ao longo do ano. Dessa forma, podem reproduzir uma única vez ou várias vezes ao ano, com longos ou curtos intervalos de acasalamento (PRITCHARD, 1979). O acasalamento é frequentemente precedido por comportamento nupcial ritualizado, marcado por sinais táteis corporais diretos (POUGH et al., 2008).

Todos os Testudines são ovíparos (SANTOS, 1994). Seus ovos são relativamente grandes, com uma casca membranosa e calcária, podendo apresentar casca mole e flexível ou particularmente dura e áspera (DUK, 1990). Em geral, os ovos com casca mole desenvolvem-se mais rapidamente que os ovos de casca rígida (POUGH et al., 2003).

As fêmeas depositam os ovos em numero variável dependendo da espécie, podendo oscilar em média, entre quatro ou cinco até 100 ovos. O número, forma e

dimensão dos ovos variam de acordo com as espécies e tamanho das fêmeas (SALERA JUNIOR, 2005). Os ovos são depositados em diversos ambientes, sendo eles: terrestres como praias fluviais, costeiras, solo barroso e areno-argiloso próximo aos corpos d'água ou em meio à vegetação (ERNST e BARBOUR, 1989). Dependendo da espécie, o tempo de desenvolvimento embrionário pode variar de 28 a 420 dias, sendo que o longo prazo é um dos fatores que deixam os ninhos vulneráveis a predadores (POUGH et al., 2008).

1.2 *Podocnemis expansa*

Conhecida como tartaruga da Amazônia, tartaruga verdadeira, aráu ou jarará-açu, pode ser encontrada no norte e centro oeste do Brasil, Guianas, Venezuela e Colômbia. Seu habitat natural são as bacias de grandes rios, como a bacia amazônica, bacia do rio Araguaia e Tocantins (VALENZUELA, 2001).



Figura 1: *Podocnemis expansa* (Fonte: LAPAS/UFU/UDI/2014).

Sua alimentação na natureza baseia-se em vegetais e peixes, e em cativeiro incluem-se vegetais, peixes, carne moída e ração. Vive em grupos e tem hábitos diurnos. O período de reprodução da espécie é de setembro a março e a oviposição ocorre em covas de aproximadamente 60 cm, cobertas com areia. São postos de 60 a 100 ovos e a eclosão acontece em período de 45 a 60 dias. A *P. expansa* é

utilizada pela população ribeirinha como fonte de alimento (carne e ovos), óleo, matéria prima para cosméticos e utensílios (SALERA JUNIOR, 2005).

Devido à exploração inadequada, a *P. expansa* está na lista de espécies ameaçadas, segundo a International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN, 2014), classificada como baixo risco de extinção e dependente de conservação. Consta também no apêndice II do Convention on International Trade Endangered Species (CITES), como uma espécie que não se encontra ameaçada de extinção, mas que pode vir a se tornar, devido ao seu comércio descomedido. Isto mostra a importância de estudos biológicos para melhorias nas práticas de manejo e conservação de *P. expansa*.

De fato, Luz et al. (2003) e Fachín-Téran et al. (2003), afirmam que o manejo da espécie pode ser uma importante alternativa para conservação dessa espécie, atuando também no desenvolvimento das regiões que esses répteis habitam e seus recursos naturais. Porém, no Brasil essa atividade é pouco difundida e a espécie é pouco estudada.

No Brasil existem alguns órgãos destinados na proteção e conservação de Répteis, dentre eles o (RAN) Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios, é um centro especializado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), reconhecido como uma Unidade de referência na geração e gestão de informações que subsidiam a implantação de medidas de conservação e de aprimoramento das políticas ambientais voltadas aos répteis e anfíbios.

1.3 OVOS

A grande maioria dos invertebrados, assim como muitos vertebrados, depositam seus ovos no meio externo para que se desenvolvam. Seguindo a terminologia proposta por Shine (1985), são ovíparos os animais que fazem a postura de ovos com casca. A fertilização pode ser interna (os óvulos são fertilizados no interior do corpo da fêmea, antes que ela deposite os ovos), ou externa (fertilizados pelo macho após a deposição das fêmeas).

A maioria dos répteis, incluindo todas as tartarugas, é ovípara (BLACKBURN, 2006). Seus ovos podem ser classificados em três categorias com base na estrutura da casca e na sensibilidade às variações no meio ambiente hídrico. Os ovos de lagartos e cobras possuem casca em forma de pergaminhos; algumas tartarugas possuem os ovos com cascas flexíveis e os ovos de todos os crocodilianos, alguns Testudines e alguns lagartos possuem uma casca com estrutura rígida (PACKARD, 1991a). Com relação às tartarugas e cágados, as cascas de seus ovos consistem de duas partes: uma membrana fibrosa e uma camada calcária ligada à superfície externa da membrana. Até onde se sabe, o componente calcário de cascas de ovos de Testudines é o carbonato de cálcio (aragonita) (PACKARD, 1991b).

Kusuda et al. (2013) examinaram por microscopia eletrônica e difração de raios-X as cascas de ovos de 56 Testudines e propôs uma classificação em seis tipos em termos da sua estrutura de matriz de camada de calcário. A casca tipo I era composta por uma camada fina de calcário com minerais em uma estrutura amorfa; o tipo II, com unidades de escudo composto de núcleos mamilares calcificadas com cristais de aragonita; o tipo III e IV, com unidades de casca composta de núcleos mamilares, além de uma camada única paliçada também calcificada com cristais de aragonita e com cada unidade da casca separada no III e concentrada na IV; V, com unidades de casca composta de núcleos mamilares, além de duas camadas paliçada; e o tipo VI, com uma camada de cutícula calcificado com cristais de calcite. De acordo com essa classificação verificou em ovos de *P. expansa* semelhanças nos arranjos tipo II e IV. Ele afirma que as cascas se classificam em sua estrutura física como cascas rígidas ou flexíveis havendo diferenças em sua espessura devido a este fato.

Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998) afirmam que o material orgânico do vitelo de um ovo de tartaruga é o primeiro utilizado para o desenvolvimento embrionário e, em seguida, presumivelmente, para a manutenção e crescimento do animal recém-eclodido. O ovo tem uma complexa estrutura física e composição química. Nas cascas é presente a formação de poros, que são responsáveis pelas trocas de gases e manutenção do ovo. Anderson (1994) destaca a existência de

pouca informação sobre a disponibilidade de minerais e compostos químicos das cascas de ovos de répteis.

Diversas propriedades podem ser observadas quando se analisa a composição química das cascas de ovos, desde disfunção fisiológica das fêmeas e fatores nutricionais a históricos ambientais de contaminação. As cascas de ovos também servem como indicador para investigar os efeitos de substâncias lançadas no ambiente, que podem provocar um efeito deletério em animais ovíparos, alterando formato, tamanho e estrutura da casca dos ovos. No entanto, informações a respeito dos impactos de contaminantes ambientais na fauna silvestre são escassas (VAN DER OOST et al., 2003).

1.4 Incubação

A compreensão das condições necessárias para a incubação e eclosão dos ovos dos Testudines é fundamental, tanto para o entendimento da sua biologia e ecologia, como para a realização de trabalhos de conservação in-situ e ex-situ. (LISBOA et al., 2004). A manutenção dos ovos de répteis, do ponto de vista do manejo, deve obedecer sua correta orientação por ocasião da coleta, se esta ocorrer entre o segundo e décimo-quinto dias após a postura (WEBB et al., 2006). Antes disso, o embrião é capaz de se reorientar corretamente, e depois o alantóide expandido (estrutura ligada à parte posterior do intestino do embrião que armazena excretas e permite trocas gasosas com o meio externo) parece ser capaz de providenciar respiração e excreção adequadas, mesmo com o embrião sob a gema, como foi observado por Ferguson (1981) em embriões de *Alligator mississippiensis*.

Ovos férteis de representantes da ordem Crocodylia podem ser identificados através da presença de uma banda opaca, visível na casca do ovo trans-iluminado. Ela surge como um ponto cerca de 24 horas após a postura, quando o embrião se ata à superfície interna da casca e se desenvolve juntamente com ele, tomando toda a superfície do ovo no período final da incubação (FERGUSON, 1985). O estágio de desenvolvimento do embrião pode também ser avaliado pelo grau de desenvolvimento da banda opaca (FERGUSON, 1981).

As condições apropriadas para a incubação artificial de ovos de Testudines são fundamentais para seu sucesso. Dentre as condições necessárias para o sucesso reprodutivo em incubação artificial, destaca-se a manutenção da temperatura, umidade e escolha do substrato. Estão diretamente relacionado ainda as condições do transporte dos ovos à incubadora (GRIGG, 1987). Por meio destes estudos é possível entender melhor a biologia e ecologia desse grupo de répteis (LISBOA et al., 2004).

Molina e Gomes (1998) determinou que a temperatura ideal para incubação de *Trachemys Dorbignyi* (tigre d' água) é em torno de 20 e 34°C, o presente trabalho apresentou sucesso com a incubadora feita de caixa de isopor e substrato vermiculita.

Para o sucesso reprodutivo de Testudines, é considerado como adequada uma taxa de umidade relativa acima de 90%, o que é compatível com observações feitas em ninhos em ambiente natural (FERGUSON, 1985). Os embriões podem resistir a um período de até duas horas de submersão dos ovos em água sem prejuízo de seu desenvolvimento (JOANEN et al., 1977). Há registros de defeitos embrionários de origem genética ou causados por ambiente impróprio de incubação (WEBB et al., 2006).

1.5 Agrotóxicos

A Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada através do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define o termo agrotóxico como os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais. Sua finalidade é alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

Agrotóxicos são produtos amplamente utilizados na produção, armazenamento e beneficiamento agrícola, pastagens e na proteção de florestas. Eles têm a finalidade de estabilizar a produção agrícola, permitindo formas mais econômicas de plantio e colheita, resultando na melhor qualidade da safra e na redução de perdas durante a estocagem e transporte (VALDES, 2010). O uso incorreto e indiscriminado dos agrotóxicos pode trazer consequências diretas ao homem, pela exposição aos resíduos da aplicação, e consequências indiretas, pela distribuição e persistência destes resíduos no ambiente (VALDES, 2007).

Os agrotóxicos atingem o solo, o ar, a água, a vegetação e os invertebrados, quando são dispersos após a aplicação na sua composição original, ou mais comum entre decompostos em resíduos, que formam um substrato (LARSON et al., 1997). É através desses substratos que a fauna silvestre é exposta aos poluentes (JOHNSTON, 2001). Esses produtos são divididos em diferentes classes, conforme o alvo a que se destinam, os mais utilizados são os herbicidas e os inseticidas (IBAMA, 2010).

Os inseticidas possuem alta toxicidade e alto risco de exposição à população não alvo, são produtos de destaque na Ecotoxicologia (CHABERS e CARR, 1995). Os inseticidas organoclorados provocam um efeito deletério particularmente em animais ovíparos, altera o formato, tamanho e estrutura da casca dos ovos, aumenta a probabilidade de quebras (BLUS et al., 1997). Isso se deve à ação do agrotóxico no transporte de cálcio, ou na atividade da cálcio-ATPase (SMITH, 1991), ou ainda na atividade da cálcio-magnésio-ATPase (NAQVI e VAISHNAVI, 1993). Esses efeitos são potencialmente importantes na causa de distúrbios no desenvolvimento do esqueleto de animais expostos.

Atualmente, os inseticidas organofosforados e carbamatos são os mais utilizados na agricultura brasileira. A princípio, eles foram considerados ambientalmente seguros, já que são pouco estáveis, apresentam pequena taxa de dispersão no ambiente e pouca capacidade de bioacumulação na cadeia alimentar (SCHMIDT et al., 2001). Apesar disso, existem relatos de intoxicação aguda de animais silvestres (não-alvo), especialmente as aves, expostos à esses produtos (JOHNSTON, 2001).

Hall e Clark (1982) avaliaram os efeitos de 4 pesticidas organofosforatos dentre eles a parationa-metílica sobre lagartos anole verde (*Anolis carolinensis*), esses autores descobriram que quando os lagartos ficavam em temperatura ambiente 25°C a mortalidade relativa e os efeitos da colinesterase sobre os lagartos foram similares ao observados em pássaros e mamíferos.

Entretanto Sanchez, Fossie Focardi (1961) estudaram os efeitos da parationa na inibição da colinesterase sobre o cérebro e encontraram que os efeitos tóxicos dependiam da hora do dia que ocorreu a exposição, e sugeriram que a temperatura do ambiente afetou os seus resultados. Esses autores através de seus dados, afirmaram que a toxicidade da parationa-metílica depende do metabolismo nos reptéis. A parationa precisa ser bioativada para inibir a atividade da colinesterase no cérebro. Em temperaturas baixas (baixa taxa metabólica) os lagartos aparentemente bioativaram menos parationa e a toxicidade foi menor; enquanto em temperaturas maiores (alta taxa metabólica), mais parationa foi aparentemente bioativada e a toxicidade foi maior.

A parationa-metílica, denominada quimicamente O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (Figura 1.1), inseticida do grupo dos organofosforados, é uma das mais utilizadas mundialmente na agricultura (KALIPCI et al., 2010; ANVISA, 2014). No Brasil, tem uso autorizado nas culturas de alho, arroz, algodão, soja, batata, cebola, feijão, milho e trigo (ANVISA, 2014). A meia-vida da parationa metílica em ambientes aquáticos pode variar entre 30 a 100 dias e no solo entre 1 a 30 dias, dependendo das condições climáticas (WAUCHOPE et al., 1992), o que evidencia sua importância em termos de contaminação ambiental.

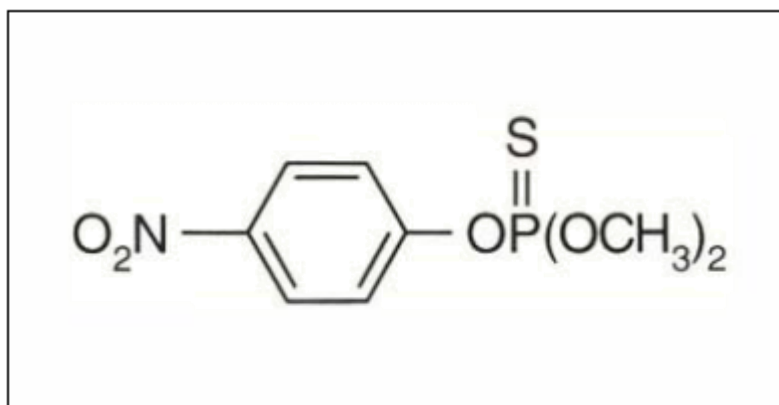


Figura 1.2: Fórmula estrutural do inseticida parationa metílica (ANVISA, 2014).

O uso da parationa-metílica está proibido na Austrália, EUA, República do Congo, Colômbia, China, Indonésia, e foi banido no Japão, Sri Lanka, e Tanzânia. Na União Europeia está fora do Anexo I da Diretiva 91/414/EEC da União Europeia (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2001). No Brasil, no entanto, apenas em janeiro de 2012 ocorreu sua reavaliação toxicológica. Foi confeccionado um documento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em que foram apresentadas características neurotóxicas, imunotóxicas e mutagênicas deste inseticida. Tendo em vista esses efeitos, foi aberta uma consulta pública para que fossem apresentadas críticas e sugestões sobre a regulamentação deste ingrediente ativo (ANVISA, 2014). No entanto, nenhum documento conclusivo foi elaborado até o presente momento.

Em experimentos já realizados com este pesticida, foram verificados impactos e diferentes interferências funcionais em organismos não alvos (MENEELY E WYTTEBACH, 1989; GARG ET AL., 2004; KALIPCI ET AL., 2010). Kalipci et al. (2010) estudaram os impactos da exposição aguda e crônica a esse inseticida em aves, e demonstraram que essa exposição gera redução na atividade da Ca-Mg-ATPase e perda da homeostase de cálcio na célula.

Répteis e anfíbios também são afetados indiretamente pela utilização de pesticida, visto sua utilização de ambientes aquáticos com maior possibilidade de contaminação. Apesar de sua importância, os estudos acerca da ecotoxicidade da parationa-metílica são escassos e seus efeitos tóxicos em répteis da fauna brasileira são desconhecidos (BLASIAK, 1995).

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY Toxicological profile for methyl parathion, 2001.

AGUILAR, A.; BORRELL, A.; REIJNDERS, P. J. H. Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. **Environmental Research**, v.53, p.425-452, 2002.

ANDREWS, R. M. Evolution of Viviparity: Variation Between Two Sceloporine Lizards in the Ability to Extend Egg Retention. **Journal of Zoology**, v. 243, p. 579-595, 1997.

ANDREWS, R. M.; MATHIES, T. Natural History of Reptilian Development: Constraints on the Evolution of Viviparity. **Bioscience**, v. 50, n. 3, p. 227-238, 2000.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência Geral de Toxicologia. Nota Técnica: Reavaliação Toxicológica do ingrediente ativo da Parationa Metílica. Ministério da Saúde. 95f.2012. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96b246804f309971be99bec88f4b6a31/Nota+t%C3%A9cnica+daParationa+Met%C3%ADlica.pdf?MOD=AJPERES>> Acessado em 15 de janeiro de 2014.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de agrotóxicos – Parationa-metílica. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d68e2100474596eb9f0cdf3fbc4c6735/p03.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>> Acesso em 15 de janeiro de 2014.

BLACKBURN, D. G. Saltationist and Punctuated Equilibrium-Models for the Evolution of Viviparity and Placentation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 174, n. 2, p. 199-216, 1995.

BLACKBURN, D. G. Are Viviparity and Egg-Guarding Evolutionarily Labile in Squamates. **Herpetologica**, v. 55, n. 4, p. 556-573, 1999.

BLACKBURN, D. G. Squamate Reptiles as Model Organisms for the Evolution of Viviparity. **Herpetological Monographs**, n. 20, p. 131-146, 2006.

BLASIAK, J. Inhibition of erythrocyte membrane (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase by the organophosphorus insecticides parathion and methylparathion. **Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology and endocrinology**, Oxford, v. 110, n.2, p. 119-125, 1995.

BLUS, L. J.; WIEMEYER, S. N.; BUNCK, C. M. Clarification of effects of DDE on shell thickness, size, mass, and shape of avian eggs. **Environmental Pollution**, Barking, v. 95, n. 1, p. 67-74, 1997.

CALDERON-ESPINOSA, M. L.; ANDREWS, R. M.; DE LA CRUZ, F. R. M. Evolution of Egg Retention in the Sceloporus Spinosus Group: Exploring the Role of Physiological, Environmental, and Phylogenetic Factors. **Herpetological Monographs**, n. 20, p. 147-158, 2006.

CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. **Toxicology**, v. 105, p. 291-304, 1995.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. **Laboratory Animals**, v. 31, p. 1-32, 1997.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W., **Turtles of the World**. Washington, Smithsonian Institution Press. 1989.313p.

FERGUSON, M.W.J. Extrinsic microbial degradation of the alligator eggshell. **Science**, New York. n. 214, p. 1135-1137, 1981.

FERGUSON, M.W.J. Reproductive biology and embryology of the crocodilians. **Biology of the Reptilia. Development**. v., 14.p., 486-491. John Wiley, New York. 1985.

GARG, U. K.; PAL, A. K.; JHA, G. J.; JADHAO, S. B. Pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides on bone health of broiler chicks. **Toxicologic pathology**, v. 32, p. 364-369, 2004.

GOMES, A.S; FERREIRA JÚNIOR, P.D. Management and relocation of nests of 377 *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) on the Crixás- 378 Açu River, Brazil. **Braz. Journal. Biology**, v.71, p.975-982, 2011.

GRIGG, G.C. Water relations of crocodilian eggs: management considerations. Surrey Beatty & Sons, **Chipping Norton**, Australia.v.157, p. 499-502, 1987.

HALL RJ, CLARCK DR Jr., Responses of the iguanid lizard *Anolis carolinensis* to four organo phosphorous pesticides.**Environ Pollut**V. 28, p. 45-52. 1982.

HAYES-JR, W. H. Introduction. In: LAWS J. R., E. R. **Handbook of pesticide toxicology**. California: Academic Press, Inc., v.1, p. 1-37. 1991.

HEULIN, B. Variation in Eggshell Characteristics and in Intrauterine Egg Retention Between Two Oviparous Clades of the Lizard *Lacerta Vivipara*: Insight Into the Oviparity-Viviparity Continuum in Squamates. **Journal of Morphology**, v. 252, n. 3, p. 255-262, 2002.

HICKMAN, C. P. J.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, 2010. 84p.

JOHNSTON, J. J. Introduction to pesticides and wildlife. **Pesticides and Wildlife**. Washington: American Chemical Society, v. 8, p. 1-5, 2001.

JOANEN, T. MC NEASE, L. Artificial incubation of alligator eggs and post hatching culture in controlled environmental chambers. **Herpetology** v.8, p. 9-13, 1977.

KALIPCI, E.; ÖZDEMİR, C.; ÖZTAS, F.; SAHINKAYA, S. Ecotoxicological effects of methyl parathion on living things and environment. **African journal of agricultural research**, Kenya, v. 5, n. 8, p. 712-718, 2010.

KUSUDA, S. YASUKAWA, Y. SHIBATA, H. SAITO, T. YOSHIZAKI, N. Diversity in the Matrix Structure of Eggshells in the Testudines (Reptilia) **Zoological Science**, v.30, p.366–374, 2013.

LARSON, S. J.; CAPEL, P. D.; MAJEWSKI, M. S. Pesticides in surface waters: distribution, trends, and governing factors. U. S. Environmental Protection Agency, EPA/600/9-88/005, Washington, p.220-231 1997.

LISBOA, CS, CHINEN, S, MOLINA, FB, Influência da temperatura no período de 424 incubação dos ovos de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae). **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.71, p.391 - 393, 2004.

LEE, M. S. Y.; SHINE, R. Reptilian Viviparity and Dollo's Law. **Evolution**, v. 52, n. 5, p. 1441-1450, 1998.

LUZ, V. L. F.; STRINGHINI, J. H.; BATAUS, Y. S. L.; FERNANDES, E. S. PAULA, W. A.; NOVAIS, M. N.; I. J. Rendimento e composição química de carcaça da tartaruga-da- Amazônia (*Podocnemis expansa*) em sistema comercial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n. 1, p.1-9, 2003.

MOLINA, F. B; ROCHA, M. B; LULA, L. A. B. M. Comportamento alimentar e dieta de *Phrynosyllarii* (Dumeril&Bibron) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.15, n.1, p.73-79, 1992.

NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicology of endosulfan insecticide on target animals. **Comparative biochemistry and physiology part C: comparative toxicology**, v. 105, n. 3, p. 347-361, 1993.

PACKARD, G. C. The Physiological and Ecological Importance of Water to Embryos of Oviparous Reptiles *In*: Deeming, D. C.; Fergusson, M. W. J. (eds.), **Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991a.

PACKARD, M. J.; DEMARCO, V. G. Eggshell Structure and Formation in Eggs of Oviparous Reptiles *In*: Deeming, D. C.; Fergusson, M. W. J. (eds.), **Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991b.

POUGH, F. H.; ANDREWS, R. M.; CADLE, J. E.; CRUMP, M. L.; SAVITZKY, A. H.; WELLS, K. D. **Herpetology**. 2 ed. Prentice Hall: New Jersey. 2003. 612p.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. Atheneu Editora: São Paulo, 2008. 699p.

PRITCHARD, P. C. H. Encyclopedia of Turtles. T. F. H. Publ. Inc., **Neptune**: New Jersey. 1979. 859p.

SALERA JUNIOR, G. Avaliação da biologia reprodutiva, predação natural e importância social em quelônios com ocorrência na bacia do Araguaia. 2005. 191f. Dissertação (**Mestrado em Ciências do Ambiente**) - Fundação Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2005.

SANCHEZ JC, FOSSI MC, FOCARDI S. Serum "B" esterases as a non-estructive biomarker in the lizard *Galloti galloti* experimentally treated with parathion. **Environ Toxicol Chem** v. 16, p.1954-1961

SANTOS, L. B. O.; ABATE, G.; MASINI, J. C. Determination of atrazine using square wave voltammetry with the Hanging Mercury Drop Electrode (**HMDE**). *Talanta*, v. 62, n. 4, p. 667-674, 2004.

SHINE, R. The Evolution of Viviparity in Reptiles: An Ecological Analysis. In: Gans, C.; Billet, F. (eds.), **Biology of the Reptilia** v. 15, p.14-20., 1985.

SMITH, A. G. Chlorinated hydrocarbon insecticides. In: HAYES JUNIOR, W. J.; LAWS JUNIOR, E. R. **Handbook of pesticide toxicology**. California: Academic Press, v.2, p. 731-916. 1991.

STORER, T. I., USINGER, R. L., STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J.W. **Zoologia Geral**. Sexta Edição Revista e Aumentada (Segunda Reimpressão). Companhia Editora Nacional. 1995.816p.

VALDES, S. A. C. **Estudo da contaminação por agrotóxicos em aves da Família Caprimulgidae no Parque Nacional das Emas (GO)**. 2007. 109f. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e no Ambiente), Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

VALDES, A.C.; Avaliação da exposição a agrotóxicos em aves silvestres de vida livre. In: Von Matter S, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido-JR. JF (Eds.) **Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010, p. 429-439. 2010.

VALENZUELA, N. Maternal effects on life-history traits in the Amazonian giant river turtle *Podocnemis expansa*. **Journal of Herpetology**, v. 35, n. 3, p. 368-378, 2001.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decisionmaking. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. v. 123, p. 1-155, 1992.

WEBB, J. K.; Shine, R.; Christian, K. A. The Adaptive Significance of Reptilian Viviparity in the Tropics: Testing the Maternal Manipulation Hypothesis. **Evolution**, v. 60, n. 1, p. 115-122, 2006.

CAPÍTULO 2 - ASPECTOS QUÍMICOS DA CASCA DE OVOS DE *Podocnemis expansa* PÓS-ECLOSÃO (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE.

RESUMO: A composição química e morfológica da casca de ovos de répteis varia de acordo com a espécie e as condições ambientais em que os ovos são incubados. Além de contribuir o conhecimento sobre as características reprodutivas de cada espécie, a descrição das características estruturais dessas cascas pode ser bastante útil para a avaliação dos efeitos de xenobióticos lançados no ambiente, que podem causar redução da população de diversos animais. Nesse contexto, objetivou-se quantificar e qualificar as propriedades químicas da casca de ovos de *Podocnemis expansa*. Para isso, foram utilizados 60 ovos, coletados de dois ninhos (A e B), em praias do Rio Araguaia (GO), e incubados artificialmente. Após a eclosão, as cascas dos ovos foram submetidas à análise química (matéria mineral, cálcio, fósforo, extrato etéreo, proteína bruta e nitrogênio). A espessura da casca dos ovos foi de $179 \pm 18 \mu\text{m}$ no ninho A e $188 \pm 12 \mu\text{m}$ no ninho B, afirmando que ovos de *P. expansa* apresentam cascas flexíveis. A composição química variou de um ninho para o outro, sendo: nitrogênio $8,13 \pm 0,093\%$ e $7,83 \pm 0,103\%$, proteína bruta $50,83 \pm 0,571\%$ e $48,98 \pm 0,640\%$, extrato etéreo $0,07 \pm 0,008\%$ e $0,07 \pm 0,008\%$, matéria mineral $17,90 \pm 0,417\%$ e $22,70 \pm 0,836\%$, cálcio $11,48 \pm 0,368\%$ e $15,26 \pm 0,739\%$ e fósforo $0,17 \pm 0,008\%$ e $0,18 \pm 0,016\%$ para cascas dos ovos do ninho A e B, respectivamente. Os componentes físicos e químicos dos ovos de *P. expansa* se diferiram entre ninhos, isso pode ser a fatores ambientais, nutricionais, fisiológicos entre outros.

PALAVRAS-CHAVE: Embrião, Tartaruga-da-Amazônia, Minerais.

CHAPTER 2: CHEMICAL ASPECTS OF *P. EXPANSA* EGGSHELL POST-HATCHING (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE).

ABSTRACT: The chemical and morphological composition of reptile eggshell varies according the species and the environmental conditions in which the eggs are incubated. Besides increasing knowledge on reproductive characteristics of each species, the description of structural features of these shells can be quite useful to evaluate the effects of xenobiotics launched to the environment, that may cause reduction of the population of various animals. In this context, it was aimed to quantify and qualify the chemical properties of *Podocnemis expansa* eggshells. For this, sixty eggs were used, collected from two nests (A and B) in Araguaia River beaches (GO), and incubated artificially. After hatching, eggshells were submitted chemical analysis (mineral matter, calcium, phosphorus, ether extract, crude protein and nitrogen). And the thickness of the eggshell was $179 \pm 18 \mu\text{m}$ in the nest A and $188 \pm 12 \mu\text{m}$ in the nest B, indicating that eggs of *p. expansa* have flexible shells. The chemical composition varied from one nest to another, being: $8.13 \pm 0.093\%$ nitrogen and $7.83 \pm 0.103\%$ crude protein, $50.83 \pm 0.571\%$ and $48.98 \pm 0.640 \pm 0.07 \pm 0.008\%$ ether extract and $0.07 \pm 0.008\%$, mineral matter $17.90 \pm 0.417\%$ and $22.70 \pm 0.836\%$, calcium $11.48 \pm 0.368\%$ and $15.26 \pm 0.739\%$ and $0.17 \pm 0.008\%$ phosphorus and $0.18 \pm 0.016\%$ to eggshells of nest A and nest B, respectively. The physical and chemical components of eggs of *p. expansa* differed between nests, this may be for environmental, nutritional, physiological factors, among others.

KEYWORDS: Embryons, Amazonian tortoise, minerals.

2.1 Introdução

A tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*) é a maior espécie de cágado sul-americano. O período reprodutivo desta espécie ocorre na vazante dos rios. As desovas ocorrem em grandes grupos (DUPRE, 2001), Suas ninhadas podem ter mais de 100 ovos, que são depositados em terrenos arenosos de praias fluviais (ALVES-JÚNIOR et al., 2012).

De acordo com sua constituição, as cascas dos ovos de cágados e tartarugas podem variar de rígidas e ásperas, com pequeno potencial de trocas hídricas e gasosas, a flexíveis, com maior dependência do meio hídrico externo (PRITCHARD, 1979; PACKARD et al., 1992; ERNST e BARBOUR, 1989). Esta característica estrutural permite que diferentes espécies possam incubar seus ovos em condições ambientais variadas (KUTCHLING, 1999). A casca destes ovos é flexível e não há descrições de sua composição química. (ALVES-JÚNIOR et al., 2012).

A casca de ovo de répteis é formada por duas partes: a primeira sendo um invólucro de membrana fibrosa, flexível e adjacente à albumina, e a segunda uma camada calcária, rígida, ligada à superfície externa da membrana fibrosa (AR et al., 1974; KERN e FERGUSON, 1997; KITIMASAK et al., 2003; STOKER et al., 2013).

Durante a incubação, a casca do ovo cumpre papel fundamental, pois oferece proteção contra microorganismos, controla a troca de água e gases através dos poros e constitui uma fonte de minerais para o embrião durante o desenvolvimento. O êxito destas funções é dependente de sua adequada formação e de sua composição estrutural. (KITIMASAK et al., 2003; KUSUDA et al., 2013).

O conhecimento da composição química de cascas de ovos pode ser bastante útil para a avaliação de efeitos de xenobióticos lançados no ambiente. São bastante conhecidos os efeitos causados por inseticidas organoclorados na composição química de cascas de ovos de aves, responsáveis pela redução da população de diversas espécies (SMITH, 1991; BLUS et al., 1997). No entanto, não encontraram dados relatando seus efeitos em ovos de répteis.

Osborne e Thompson (2005) descrevem que na camada calcária da casca de ovo o cálcio é um dos componentes mais importantes para o desenvolvimento do

esqueleto do embrião Além de cálcio, magnésio, fósforo, oxigênio, gordura bruta, proteínas e nitrogênio também compõem essa camada.

Além de trazer subsídios para história natural da *P. expansa*, o conhecimento da composição química da casca dos ovos desta espécie permite avaliar a ação de xenobióticos lançados no ambiente na composição da casca destes ovos que levem a interferências na reprodução da espécie. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi quantificar e qualificar propriedades químicas das cascas dos ovos de *P. expansa*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local de coleta de ovos

Sessenta ovos de dois ninhos de *P. expansa* foram coletados em outubro de 2012 em área de reprodução localizada em praias do Rio Araguaia (GO) protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/ ICMBio) (13° 20' 38" S e 50° 38' 05" W) (Figura 2.1), com licença SISBIO/ICMBio 36957-1/2012, sendo trinta ovos de cada ninho (Ninho A e Ninho B). Após identificação com respeito ao ninho de origem, os ovos foram transportados em sacos plásticos com vermiculita úmida até o Laboratório de Pesquisas e Ensino em Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS/FAMEV/UFU) na mesma posição em que foram retirados dos ninhos. A sua utilização para o procedimento de pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob o protocolo nº 055/12.

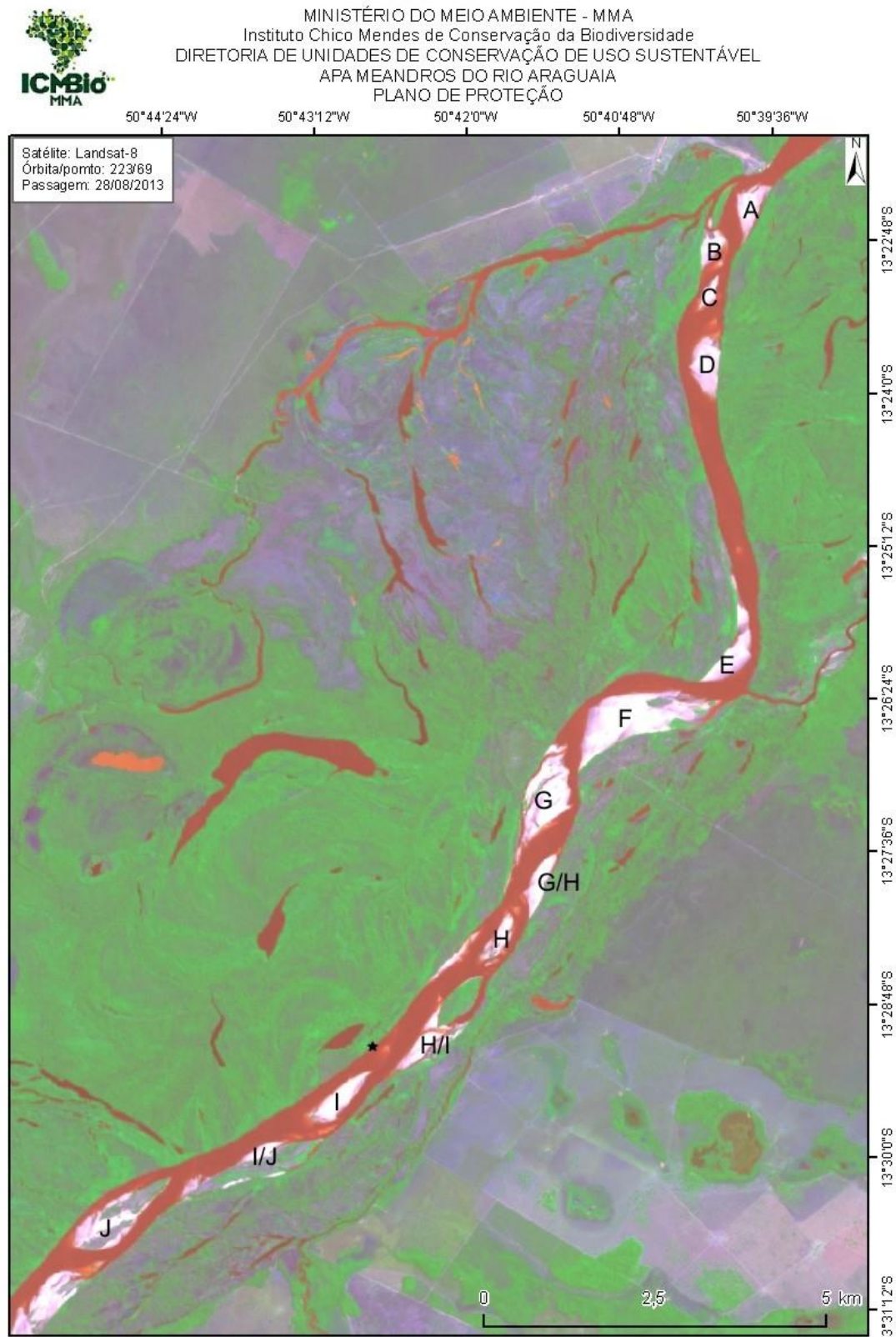


Figura 0.1: Área de localização das praias do Rio Araguaia – GO protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/ICMBio). Fonte: ICMBio MMA.

2.2.2 Incubação Artificial

A incubação artificial dos ovos foi realizada de acordo com técnicas descritas por Molina e Gomes (1998) com modificações descritas a seguir. Os ovos foram incubados em bandeja plástica de 30 x 50 x 10cm (CxLxA), como substrato vermiculita. A bandeja foi colocada dentro de incubadoras feitas com caixa de isopor de 90L, com temperatura do ambiente controlada por termostato acoplado a duas lâmpadas de 15W. A temperatura do ambiente e a umidade relativa do ar foram avaliadas por termohigrômetro digital e mantidas entre 28 e 32°C e entre 80 e 100%, respectivamente, sendo esta última pela aspersão de água. As eclosões ocorreram após 50-60 dias de incubação, quando foram coletadas as cascas e armazenadas a 4°C até o momento da análise.

As cascas foram limpas manualmente para remoção de resíduos, tais como restos de membrana corioalantóide e de substrato de incubação.

2.2.3 Espessura

A espessura de cada casca foi medida em três regiões aleatórias com paquímetro (Starrett 125 MEB), considerando-se a média das três medições como a espessura da casca.

2.2.4 Análise Química

Para a análise de composição química foram utilizadas cascas inteiras. As cascas de cada ninho foram separadas em seis subgrupos, com cinco cascas em cada.

As cascas de cada subgrupo foram secas em estufa a 80° C durante duas horas e trituradas para os procedimentos de análise de matéria mineral, cálcio, fósforo, extrato etéreo, proteína bruta e nitrogênio, realizados conforme descrito em Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal (1998).

2.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo cálculo da média dos grupos, cálculo de desvio padrão e posteriormente os dois grupos foram submetidos ao teste estatístico de comparação de médias t de Student. Diferenças significantes foram inferidas em $p < 0,05$.

2.3 Resultados e Discussão

Ao analisar a espessura da casca de ovos de *P. expansa* verificou-se que a média encontrada no ninho A foi de $179 \pm 18 \mu\text{m}$, e no ninho B, $188 \pm 12 \mu\text{m}$, não houve diferença significativa entre eles. Este parâmetro foi analisado por Kusuda et al. (2013) em espécies de Testudines que apresentam ovos com casca flexível e com casca rígida. Estes autores encontraram espessuras entre 220 e $758 \mu\text{m}$ em ovos de casca rígida, e entre 146 e $268 \mu\text{m}$ em ovos de casca flexível. Os resultados encontrados no presente estudo mostram que a espessura encontrada na casca de ovos de *P. expansa*, que apresentam casca flexível, é condizente para ovos de outros Testudines que também apresentam casca flexível.

As análises realizadas nas cascas de ovos de *P. expansa* demonstraram que ninhos diferentes podem abrigar ovos com composições químicas diferentes. Na Tabela 2.1 são observados os valores de composição química das cascas dos ovos do ninho A e ninho B. Observa-se que as porcentagens de nitrogênio e proteína bruta encontrados na casca de ovos do ninho A foram significativamente maiores do que as encontradas nas cascas do ninho B, enquanto as porcentagens de matéria mineral e cálcio foram maiores nas cascas coletadas no ninho B.

Tabela 0.1: Composição química, em porcentagem, de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* coletados em dois ninhos às margens dos rios do Araguaia.

	Ninho A	Ninho B	P
Nitrogênio	$8,13 \pm 0.093$	7.83 ± 0.103	0.0032
Proteína	50.83 ± 0.571	48.98 ± 0.640	0.0030
Extrato Etéreo	0.07 ± 0.008	0.07 ± 0.008	0.5000
Matéria Mineral	17.90 ± 0.417	22.70 ± 0.836	0.0001
Cálcio	11.48 ± 0.368	15.26 ± 0.739	0.0001
Fósforo	$0,17 \pm 0.008$	0.18 ± 0.016	0.3465

As diferenças encontradas nas cascas de *p. expansa* não podem ser atribuídas a interações com o meio externo, pois todos os ovos foram submetidos às mesmas condições de incubação. No entanto, as diferenças podem ter ocorrido por diferenças no estado nutricional da mãe ou, ainda, pelas interações da casca com o

conteúdo do ovo, incluindo tecidos embrionários. Miller e Jones (1990), estudaram o crescimento e metabolismo de cálcio em Testudines da espécie *Chelodina longicollis*, afirmam que os valores da composição química podem variar até 50% dependendo do estado em que a fêmea se encontra.

Em estudo realizado por Solomon (1976), em que foram analisadas as concentrações de fósforo na membrana e na camada calcária da casca do ovo de tartarugas da espécie *Chelonya mydas*, foi encontrada a taxa de 1% de fósforo. No presente trabalho, os valores de fósforo ficaram em torno de 0,18%. Além do fósforo, o teor de cálcio encontrado em *P. expansa* nos dois ninhos (11,42% e 15,19%) são inferiores aos relatados na tartaruga marinha *Dermochelys coriacea*, onde variou entre 22 e 25% (SAHOO et al., 1998). As diferenças da composição química das cascas encontradas entre espécies podem ser explicadas pelas diferentes necessidades nutricionais do embrião e pelas diferentes exposições a agentes externos, já que cada espécie possui hábitos de nidificação diferentes. Variações na composição química da casca de ovos de répteis não podem ser explicadas por modelos que assumam uma estrutura estática, sem influências do meio interno e externo (SIMKISS, 1962; COX et al., 1984).

Modificações na composição da casca podem ser produzidas por agentes comolixiviação, umidade externa, abrasão por partículas do solo e degradação microbiana extrínseca (MINE, 1995). Além de fatores externos, as atividades intrínsecas do ovo também podem ser implicadas nas diferenças de composição química entre Testudines. Sahoo et al. (1998), estudou o metabolismo de cálcio durante o desenvolvimento de embriões de tartaruga-oliva (*Lepidochelis olivacea*), encontraram que a casca fornece 60% do requerimento de cálcio do embrião, sendo encontradas taxas decrescentes deste mineral desde a postura até a eclosão. Isso sugere que o mesmo pode ocorrer para outros minerais e pode-se supor que embriões de diferentes espécies possuam necessidades metabólicas diferentes, o que explica grandes variações em composição mineral da casca entre espécies de Testudines.

2.4 Conclusão

Os componentes químicos matéria mineral, cálcio, fósforo, proteína e nitrogênio das cascas dos ovos de *P. expansa* diferiram entre ninhos analisados.

REFERÊNCIAS

- ALVES-JUNIOR, J. R. F.; BOSSO, A. C. S.; ANDRADE, M. B.; WERTHER, K.; SANTOS, A. L. Q. Association of midazolam with ketamine in glant Amazonrive turtles *Podocnemis expansa bread* in captivity. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n.2, p.144-147, 2012.
- ANDERSON, C.B.; CARTER, T.C.**The hen's egg**: Shell craking at impact a heavy, stiff body and factors that affect it. BR. Poult. Sci., v.17, p.613, 1994.
- AR .A ; PAGANELLI .C. V; REEVES R. B; GREENE. D. G.Rahn the avian egg: water vapor conductance, shell thickness, and functional pore area. **University of California Press**v. 76, p. 153-158, 1974
- BLUS, L. J.; WIEMEYER, S. N.; BUNCK, C. M. Clarification of effects of DDE on shell thickness, size, mass, and shape of avian eggs. **Environmental Pollution, Barking**, v. 95, n. 1, p. 67-74, 1997.
- COX. D. L.; THOMAS, T. J.; MEHAM, P.; SEXTON, O. J. External incubation alters the composition of squamate eggshells. **Composition Biochemical Physiology** 1984;79B:481–7.
- ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Washington, Smithsonian Institution Press. 1989.313p.
- KUSUDA, S.; YASUKAWA, Y.; SHIBATA, H.; SAITO, T.; YOSHIZAKI, N. Diversity in the Matrix Structure of Eggshells in the Testudines (Reptilia).**Zoological Science** v.30, p.366–374, 2013.
- MILLER, J; S.A. DINKELACKER.**Reproductive structures and strategies of turtles**. Press, FL. p. 15-28. 2008.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Smithsonian Institution Press. Washington DC, EEUU. 1989. 313 p.

KERN, M. D.; FERGUSON, M. W. J.; Gas Permeability of American Alligator Eggs and Its Anatomical Basis. **The University of Chicago Press**. V. 70, p. 530-546.

KITIMASAK, W.; THIRAKUPT, K.; MOLL, D. L. Eggshell structure of the Siamese narrow-headed soft shell turtle *chitra chitra* nutphand, 1986 (testudines: Trionychidae). **Science Asia**. v. 29, p. 95-98. 2003.

KUTCHILING, G. **The Reproductive Biology of the Chelonia**. Springer Verlag, Berlin. p. 56-69. 1999.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionally. **Trends in Food Science and Technol.** v. 6, n. 7, p. 225-232, 1995

MILLER, J. D.; JONES, M. E. Growth and calcium metabolism of embryos of the long-necked tortoise, *Chelodina longicollis* (Shaw). **Copeia**. v. 29, p. 421-36, 1990.

OSBORNE, L. and THOMPSON, M. B. Chemical Composition and Structure of the Eggshell of Three Oviparous Lizard. **The American Society of Ichthyologists and Herpetologists**. v. 3, p. 683-692. 2005

PACKARD, M. J.; PHILLIPS, J. A.; PACKARD, G. C. Sources of mineral for green iguanas (*Iguana iguana*) developing in eggs exposed to different hydric environments. **Copeia**, v. 1992, n. 3, p. 851-858, 1992.

PEEBLES, E. D.; BRAKE, J. Relationship of egg shell to stage of embryonic development in broiler breeders. **Poultry Science**, v. 64, p. 2388-2391, 1985.

PIANK, E. R.; VITT, L. J. **Lizards: windows to the evolution of diversity**. University of California Press, Los Angeles. p. 112-126. 2005.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Oxford, OH, EEUU. 1984. 414p.

SAHOO, G.; SAHOO, R. K.; MOHANTY-HEJMADI. P. **Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development**. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 121, p.91-97, 1998.

SIMKISS K. The **source of calcium for the ossification of the embryos of the giant leathery turtle**. Composition Biochemical Physiology 1962.

SMITH, A. G. Chlorinated hydrocarbon insecticides. **Hand book of pesticide toxicology**. California: Academic Press, v.2, p. 731-916, 1991.

STOKER. C; ZAYASM.A; FERREIRA.M.A; M. DURANDO.M; GALOPPO.G.H; RODRÍGUEZ.H.A; REPETTI M.R.; BELDOMÉNICO H.R; CALDINI E.G; LUQUE E.H; MUÑOZ-DE-TORO.M. The egg shell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.v.98, p. 191-195. 2013.

SOLOMON, E. S. Studies on the egg shell (oviducal and vitellogenic) of *Chelonia mydas*. **Biology. Ecology**, v, 22, p. 145-160, 1976.

CAPÍTULO 3 - EFEITOS DA PARATIONA METÍLICA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MORFÓLOGIA DE CASCAS DE OVOS DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE.

RESUMO: Sabendo-se que substâncias lançadas ao meio ambiente, como agrotóxicos, podem alterar a forma, tamanho e composição de cascas de ovos, objetivou-se compreender como a parationa metílica, inseticida amplamente utilizado no Brasil, interfere nas características químicas e morfológicas das cascas de ovos de *Podocnemis expansa* ao longo da incubação artificial. Para isso, foram utilizadas cascas de 264 ovos dessa espécie, oriundos de áreas protegidas do Rio Araguaia. Os ovos foram incubados artificialmente em substrato areia das praias com uma camada de vermiculita e divididos em quatro grupos experimentais, aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de produto técnico parationa metílica (controle, 35, 350 e 3500 ppb). Ao grupo controle foi adicionada água destilada. As cascas foram coletadas com intervalos de três dias, com início no 3º e término no 63º dia de incubação e submetidas à medição de espessura, análise química, histologia em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que a exposição dos ovos ao agrotóxico causou aumento dos teores de fósforo e redução de teores de extrato etéreo da casca ao longo da incubação.

PALAVRAS-CHAVE: Agrotóxico, Ecotoxicologia, Incubação.

CHAPTER 3 – EFFECTS OF METHIL PARATHION IN CHEMICAL AND MORPHOLOGICAL COMPOSITION OF *Podocnemis expansa* EGG SHELLS (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE), INCUBATED ARTIFICIALLY.

ABSTRACT: Knowing that substances released in the environment, such as pesticides, can alter the shape, size and composition of eggshells, this study aimed to understand how methyl parathion, insecticide widely in use in Brazil, interferes on the chemical and morphological characteristics of *Podocnemis expansa* eggshells, during the artificial incubation. For this, 264 eggshells of this specie were utilized, all they came from protected areas of Araguaia River. The eggs were incubated artificially in sand substrate from the river beaches with a layer of vermiculite, and divided in four experimental groups, that received different concentrations of methyl parathion technical product (control, 35, 350 e 3500 ppb). To the control group was added distilled water. The eggshells were collected in intervals of three days, beginning on the third day and ending on the 63rd day of incubation, and submitted to thickness measurement, chemical analysis, histology in light microscopy and scanning electronic microscopy. It was observed that the exposure of eggs to pesticides caused increase of phosphorus levels and reduction of ether extract levels in the shells during the incubation.

KEYWORDS: Pesticides, ecotoxicology, incubation.

3.1 Introdução

A *Podocnemis expansa*, popularmente conhecida como tartaruga-da-amazônia, tartaruga verdadeira, ou jurará-açu. (VALENZUELA, 2001). É um animal ovíparo que deposita seus ovos em ambientes terrestres como praias fluviais ou costeiras, solo barroso e areno-argiloso, o número de ovos depositados pelas fêmeas é bastante variável em função da espécie, (DUPRE et al., 2007). Ernst e Barbour (1989) afirmaram que entre as diferentes espécies de Testudines aquáticos com ocorrência na bacia Amazônica existe uma grande diferença no número das ninhadas. Sendo que, para a *P. expansa*, maior espécie sul-americana, pode ultrapassar 100 ovos por desova.

As cascas de répteis possuem duas camadas sendo uma flexível e a outra calcária. Os Squamatas, em sua maioria, e alguns Testudines põem ovos com cascas flexíveis (Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi, 1998; Marco et al., 2004; WALLACE et al., 2006). Nos Crocodylia, Testudines e algumas lagartos a casca do ovo é bem rígida, porém, possuem as mesmas membranas da casca flexível (PACKARD, 1979; WALLACE et al., 2006). Na camada rígida, o componente calcário de cascas de ovos de Testudines é o carbonato de cálcio, que ocorre como aragonita (PACKARD et al., 1979; PACKARD, 1980; KITIMASAK, et al., 2003).

A casca do ovo realiza um papel fundamental, oferecendo uma proteção contra microrganismos, controla a troca de água e gases pelos poros e constitui uma fonte de minerais para o embrião durante o desenvolvimento. O sucesso destas funções depende da adequada formação e composição estrutural. (KITIMASAK et al., 2003; KUSUDA et al., 2013).

De acordo com Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998) o material orgânico de um ovo de tartarugas é o vitelo e o albumen e são os primeiros utilizados para o desenvolvimento embrionário e, em seguida, presumivelmente, para manutenção e crescimento do recém-nascido. Os mesmos autores ainda afirmam que o ovo tem uma complexa estrutura física e composição química, estando elas relacionadas com o seu papel de proteger e manter o embrião em desenvolvimento. Entretanto, a disponibilidade da composição, para o embrião em desenvolvimento ainda não é totalmente compreendida. Anderson (1994) destaca a

existência de pouca informação sobre a disponibilidade de minerais e compostos químicos das cascas de ovos de répteis.

Atualmente os inseticidas inibidores das colinesterases (organofosforados e carbamatos) são os mais utilizados na agricultura brasileira (IBAMA, 2010). A parationa metílica é um inseticida organofosforado cuja meia-vida em ambientes aquáticos pode variar entre 30 a 100 dias e no solo entre 1 a 30 dias, dependendo das condições climáticas (WAUCHOPE et al., 1992) e de classificação toxicológica Classe I - extremamente tóxico (ANVISA, 2013), sendo importante em termos de contaminação ambiental.

Kalipciet al. (2010) apontam que a parationa metílica é um inseticida comumente usado na agricultura do Brasil e que alguns dos problemas ambientais surgem devido ao uso crônico deste pesticida. Os autores ainda citam que este inseticida é um fator ameaçador para o ecossistema e provoca a formação de um meio tóxico para seres humanos, pássaros, peixes de água doce, outros animais aquáticos, bem como de organismos marinhos; misturando-se ao ar, solo e água.

As cascas de ovos podem ser utilizadas para indicar e investigar efeitos de substâncias lançada ao meio ambiente, podendo alterar a forma, tamanho e composição da casca dos ovos. (VAN DER OOST et al., 2003).

Sendo assim, objetivou-se compreender como a parationa metílica interfere nas modificações químicas e morfológicas que ocorrem em cascas de ovos de *P. expansa* ao longa incubação artificial.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta dos ovos

Foram utilizadas cascas de 264 ovos de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812), oriundos das áreas protegidas pelo Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios (RAN/IBAMA), a APA Meandros do Rio Araguaia, no município de São Miguel do Araguaia – GO (13° 20' 38" S e 50° 38' 05" W). A sua utilização para o procedimento de pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) sob o protocolo nº 055/12.

Após a coleta, os ovos foram identificados em relação ao ninho de origem e transportados em caixas de papelão com sacos plásticos contendo areia das praias com vermiculita úmida até o Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia (LAPAS/UFU), na mesma posição em que foram retirados dos ninhos.

3.2.2 Incubação artificial dos ovos e coleta das cascas

Os ovos foram incubados artificialmente em sete bandejas plásticas colocadas em incubadoras feitas com caixas de isopor de 90L (79x59x47cm), contendo $24,0 \pm 4,27$ ovos por caixa. Em cada tampa foram acoplados um termostato e duas lâmpadas incandescentes (25W, 220V), distribuídas na superfície inferior da tampa da caixa, de modo a dispersar o calor de forma homogênea.

O substrato utilizado na incubação artificial dos ovos foi areia das praias com uma camada de 2cm de vermiculita. Adicionou-se no primeiro dia de incubação artificial, água contaminada com o produto técnico parationa metílica, nas concentrações de 35, 350 e 3500 partes por bilhão (ppb). As concentrações foram estabelecidas da seguinte forma: utilizou como a primeira dose 35ppb, baseada na porção mínima permitida pela ANVISA de parationa-metílica em águas superficiais, e realizou uma “super dosagem” multiplicando o menor valor por 100x e 1000x para

os dois grupos seguintes. Aos grupos controle foi adicionada água destilada. Dessa forma, os ovos estudados foram divididos em quatro grupos.

Foram realizadas coletas de cascas com intervalos de três dias com início no 3º e término no 63º dia de incubação artificial. Foram realizadas análises em três grupos, de acordo com o tempo de coleta: cascas coletadas entre os dias 3 e 23 (1º terço), 24 e 43 (2º terço) e 44 a 63 (3º terço) de incubação artificial.

Após a coleta, as cascas foram limpas manualmente para remoção de resíduos, tais como restos de membrana corioalantóide, areia e vermiculita. As cascas foram distribuídas para análise de acordo com cada concentração do agrotóxico e tempo de incubação.

3.2.3 Espessura da casca

A espessura da casca foi medida em três regiões aleatórias com auxílio de paquímetro (Starrett 125 MEB), considerando-se a média das três medições como a espessura individual da casca.

3.2.4 Análise química

Para as variáveis de composição química, as cascas de cada grupo foram separadas em cinco subgrupos, com quatro cascas em cada, com o intuito de ter massa suficiente para as análises.

As cascas foram então secas em estufa, trituradas e preparadas para os procedimentos de análise de matéria mineral, cálcio, fósforo, extrato etéreo e proteína bruta, conforme Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal (1998). As análises foram feitas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2.5 Microscopia de luz

Foi coletado um fragmento de 1cm² de cada casca. Eles foram lavados em água corrente por 5 minutos e em seguida desidratados e clareados. Para descalcificação, os fragmentos foram imersos por 50 minutos em soluções crescentes de etanol, e posteriormente, em xilol puro por duas vezes, de acordo com a metodologia de Humason (1972). Deste modo, obteve-se apenas a membrana fibrosa.

Logo após, as membranas foram submetidas a dois banhos de parafina entre 52 e 58°C por 50 minutos cada para inclusão. Foram realizados cortes histológicos com espessura de 5µm em micrótomo EDGE SL-200. Posteriormente, os cortes foram deixados em banho-maria para distensão e então colocados em lâminas. Depois disso foram feitas as técnicas de rotina de desparafinização e hidratação, seguidas de coloração com picrossirius de acordo com Humason (1972). A confecção e observação do material foram realizadas no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

Foi coletado um fragmento de 1cm² de cada casca. As amostras foram lavadas em água corrente por 5 minutos para remoção de resíduos. O material foi seco de forma natural e posteriormente foram metalizados em “sputtercoater”. As observações do material foram realizadas no laboratório de microscopia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, em microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-7001F.

3.2.7 Análise estatística

A análise dos dados foi conduzida em esquema de análise de variância (ANOVA) para experimento no esquema de parcela subdividida em tempo, instalado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo considerados dois fatores:

tratamento (controle, parationa 35ppb, parationa 350ppb e parationa 3500ppb) e tempo de incubação (3-23, 24-43 e 44-63 dias). Quando necessário foi utilizado o teste post hoc de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.3 Resultados

Os resultados foram colocados em forma de tabelas e gráficos sendo comparados os primeiros 23 dias de incubação em relação aos demais períodos de coleta.

3.3.1 Fósforo

A concentração de fósforo foi significativamente maior no último terço de incubação artificial em relação ao primeiro terço em todos os grupos expostos à parationa metílica. No grupo exposto à concentração de 350 ppb do inseticida este aumento já ocorreu de forma significativa no segundo terço da incubação (Tabela 3.1 e Gráfico3.1).

Tabela 0.1: Porcentagem média de fósforo na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metílica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.

Concentração de parationa metílica (ppb)	Teor de fósforo (média \pm desvio-padrão)		
	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	0.1460 \pm 0.0114	0.1500 \pm 0.0158	0.1700 \pm 0.0000
35	0.1500 \pm 0.0071	0.1540 \pm 0.0114	0.1780 \pm 0.0164*
350	0.1420 \pm 0.0110	0.1840 \pm 0.0055**	0.2060 \pm .0182**
3500	0.1500 \pm 0.0187	0.1640 \pm 0.0055	0.1780 \pm 0.0130*

(*) $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias;

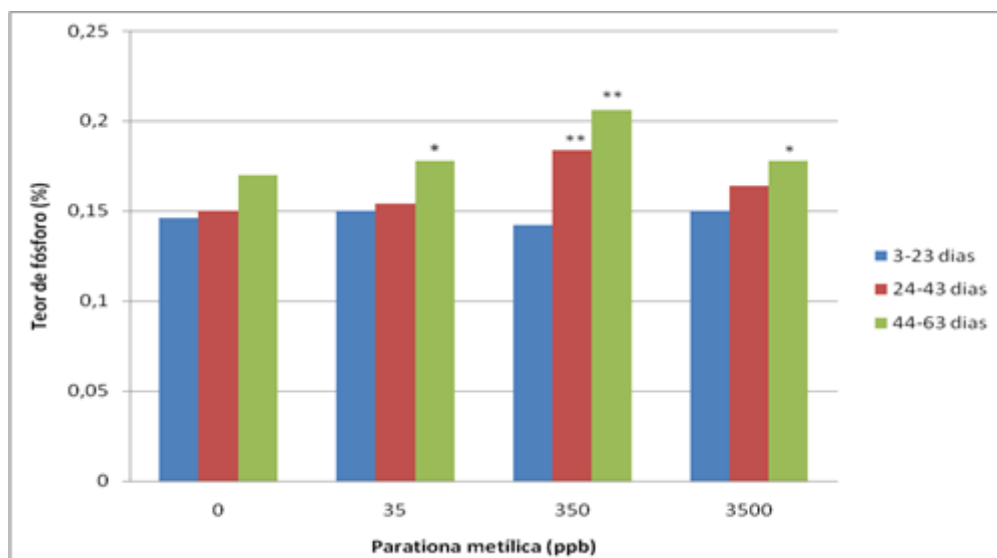


Figura 0.1: Porcentagem média de fósforo na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.

3.3.2 Extrato etéreo

A concentração de extrato etéreo foi significativamente menor no segundo terço em relação ao primeiro terço nas concentrações de 350ppb de parationa metilica. A concentração de 3500ppb apresentou diferença significativa no segundo e último terço em relação ao primeiro terço. A mesma significância foi encontrada para as concentrações 35ppb e 350ppb no último terço (Tabela 3.2 e Gráfico 3.2).

Tabela 0.2: Porcentagem média de extrato etéreo na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.

Concentração de parationa metilica (ppb)	Teor de Extrato etéreo (média \pm desvio-padrão)		
	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	0.0740 \pm 0.0114	0.0720 \pm 0.0084	0.0600 \pm 0.0000
35	0.0760 \pm 0.0114	0.0740 \pm 0.0055	0.0500 \pm 0.0000**
350	0.0800 \pm 0.0071	0.0600 \pm 0.0141*	0.0440 \pm 0.0055**
3500	0.0800 \pm 0.0071	0.0440 \pm 0.0089**	0.0440 \pm 0.0089**

(*) $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias;

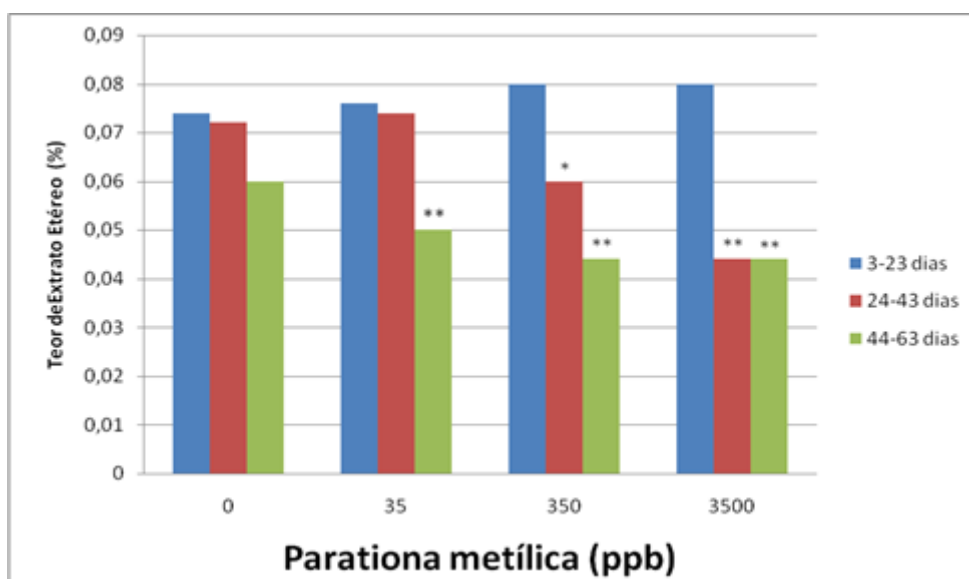


Figura 0.2: Porcentagem média de Extrato etéreo na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.

3.3.3 Cálcio

A concentração de Cálcio foi significativamente maior no segundo e último terço em relação ao primeiro terço independentemente da exposição à parationa metilica (Tabela 3.3 e Gráfico 3.3).

Tabela 0.3: Porcentagem média de Cálcio na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.

Concentração de parationa metilica (ppb)	Teor de Cálcio (média \pm desvio-padrão)		
	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	10.0020 \pm 0.0630	11.3400 \pm 0.0964*	12.4700 \pm 0.0566*
35	10.1580 \pm 0.0999	11.4920 \pm 0.2111*	12.5100 \pm 0.1082*
350	10.1340 \pm 0.1180	11.7320 \pm 0.1262*	12.3340 \pm 0.0783*
3500	10.5140 \pm 0.1662	11.3440 \pm 0.0410*	12.3860 \pm 0.1541*

(*), diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle $p < 0.01$.

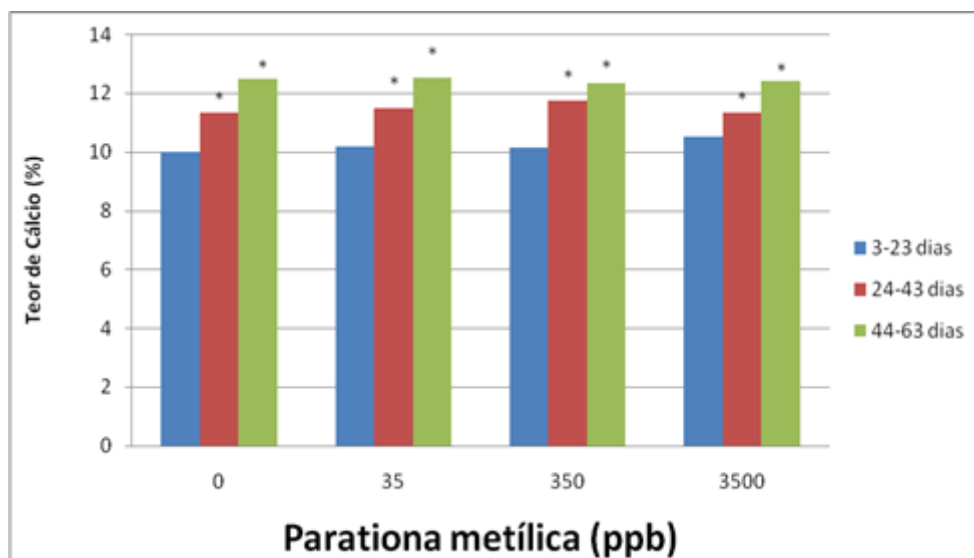


Figura 0.3: Porcentagem média de Cálcio na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.

3.3.4 Matéria mineral

A concentração de Matéria Mineral foi significativamente maior no segundo e último terço em relação ao primeiro terço independentemente da exposição à parationa metilica (Tabela 3.4 e Gráfico 3.4).

Tabela 0.4: Porcentagem média de Matéria mineral na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.

Teor de Matéria mineral (média \pm desvio-padrão)			
Concentração de parationa metilica (ppb)	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	16.6980 \pm 0.2109	17.3820 \pm 0.2322*	18.4660 \pm 0.2150*
35	16.5860 \pm 0.1544	17.4920 \pm 0.1264*	18.5540 \pm 0.2909*
350	16.3540 \pm 0.2277	17.3960 \pm 0.3066*	18.4700 \pm 0.2457*
3500	16.5100 \pm 0.3378	17.5320 \pm 0.4043*	18.5860 \pm 0.1506*

(*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

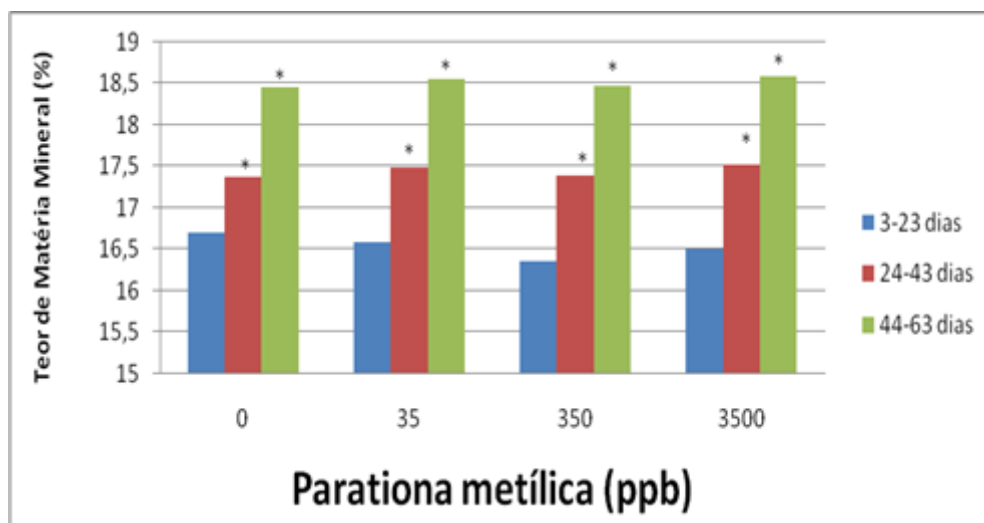


Figura 0.4: Porcentagem média de Matéria Mineral na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.

3.3.5 Proteína bruta

A concentração de Proteína bruta foi significativamente maior no segundo e último terço em relação ao primeiro terço independentemente da exposição à parationa metilica (Tabela 3.5 e Gráfico 3.5).

Tabela 0.5: Porcentagem média de Proteína bruta na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação.

Concentração de parationa metilica (ppb)	Teor de Proteína Bruta (média \pm desvio-padrão)		
	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	57.1460 \pm 0.2784	50.6100 \pm 0.2375*	40.3780 \pm 0.3737*
35	57.2400 \pm 0.3829	50.7100 \pm 0.6589*	41.3080 \pm 0.2801*
350	57.3500 \pm 0.3916	50.6400 \pm 0.2399*	41.0220 \pm 0.4321*
3500	57.3440 \pm 0.3279	50.6000 \pm 0.1206*	41.0340 \pm 0.5464*

(*), diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle $p < 0.05$.

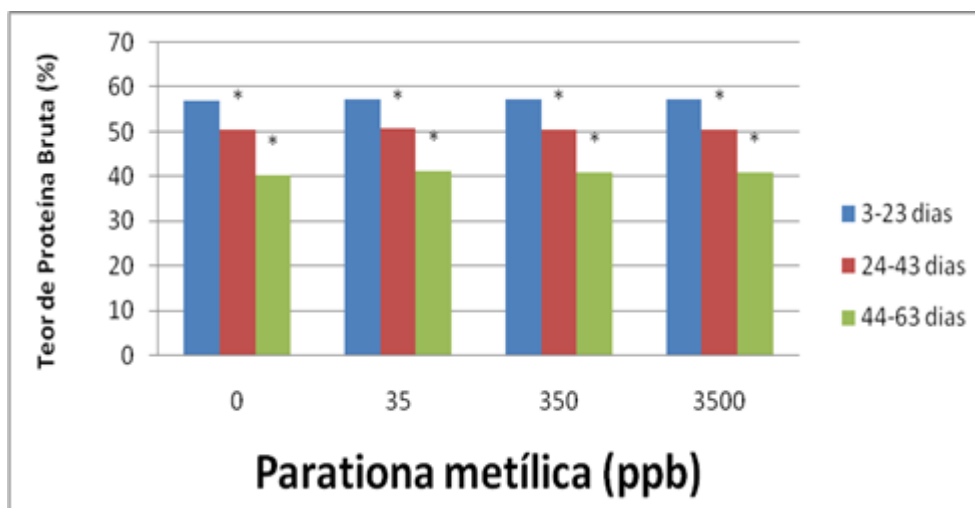


Figura 0.5: Porcentagem média de Proteína bruta na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos à exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), $p < 0.05$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias; (**), $p < 0.01$ em relação ao tempo de incubação 3-23 dias.

3.3.6 Espessura

Não foi encontrada diferença significativa entre os tempos de incubação artificial para variável Espessura (Tabela 3.6 e Gráfico 3.6).

Tabela 0.6: Média de Espessura na casca de ovos de *Podocnemis expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de parationa metilica no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação (mm).

Concentração de parationa metilica (ppb)	Espessura (média \pm desvio-padrão)		
	3-23 dias N=80	24-43 dias N=80	44-63 dias N=80
0	0.1840 \pm 0.0055	0.1840 \pm 0.0055	0.1740 \pm 0.0089
35	0.2160 \pm 0.0089	0.2260 \pm 0.0182	0.2160 \pm 0.0089
350	0.2180 \pm 0.0084	0.2120 \pm 0.0179	0.1980 \pm 0.0205
3500	0.2180 \pm 0.0130	0.2180 \pm 0.0130	0.2320 \pm 0.0110

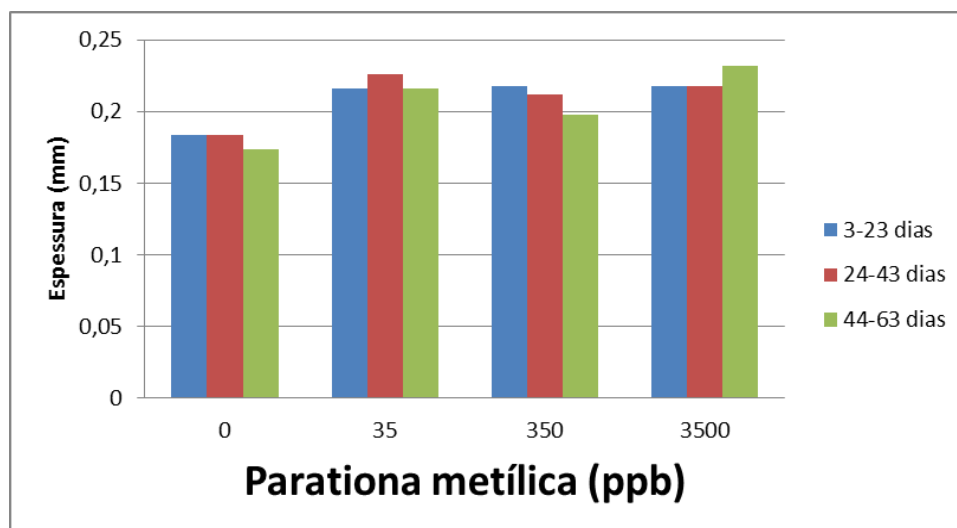


Figura 0.6: Comparação das médias e desvio padrão da variável Nitrogênio em relação aos 20 primeiros dias de incubação com os demais tempos.

3.3.7 Microscopia de luz

Não foram encontradas diferenças morfológicas da casca de *P. expansa* entre os grupos experimentais, como observado na Figura 3.7. Foram observadas estruturas finas e alongadas com tonalidade rósea, estriações transversais e presença de núcleos em toda a estrutura sendo classificadas como fibras de colágenos (FC).

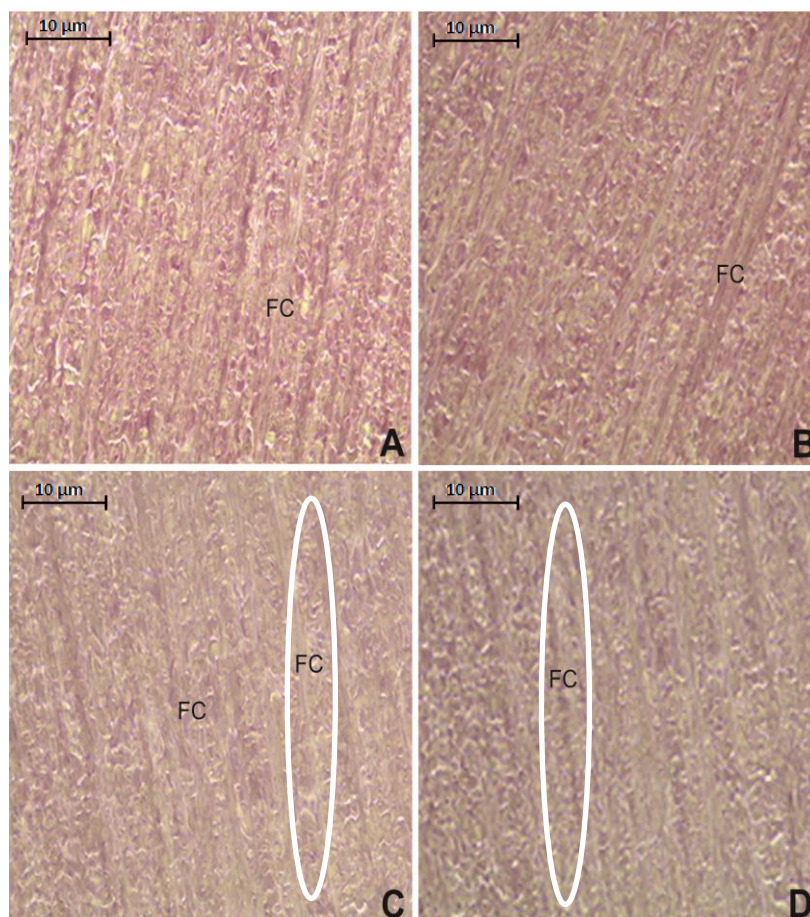


Figura 0.7: Fotomicrográficas de cascas de ovos de *Podocnemis expansa* incubados em areia com 2 cm de vermiculita em adição de agrotóxicos **A** 3 dias de incubação. **B**, 18 dias de incubação. **C**, 35 dias de incubação. **D**, 63 dias de incubação. com coloração picrosirius **FC** **Circuladas**, Fibras de Colágenos(Uberlândia, 2013).

3.3.8 Microscopia eletrônica de varredura

Observou-se claramente a existência de poros em casca bastante calcificada, com existência de cristais na forma de agulhas em arranjo concêntrico ao redor dos poros. Foram evidenciados cristais de cálcio. Não foram encontradas diferenças morfológicas na casca de *P. expansa* entre os grupos experimentais (Figura 3.8).

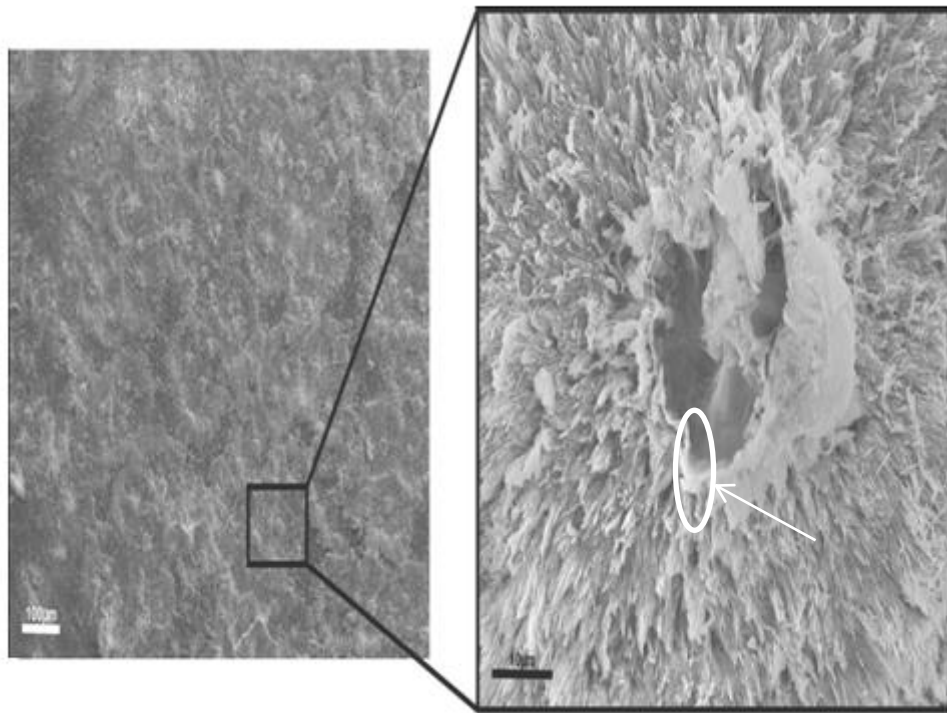


Figura 0.8: Fotoeletromicrografias da casca de ovo de *Podocnemis expansa* com 39 dias de incubação sem exposição a agrotóxico. **Seta**, espículas (Brasília, 2013).

3.4 Discussão

O presente estudo evidenciou as alterações de alguns constituintes da casca do ovo de *P. expansa* exposta ao inseticida parationa metílica em diferentes concentrações nos tempos de incubação de 3-23, 24-43 e 44-63 dias. Essas modificações podem ser naturais à medida que ocorre o desenvolvimento do embrião. Alterações orgânicas implicam uma capacidade de mudança que pode ser importante para as propriedades funcionais quaisquer sejam os constituintes da casca dos ovos (COX et al., 1984).

Podem ser previstas duas explicações para as alterações de cascas de ovos. A primeira supõe que essas alterações resultam da ação de um ou mais agentes extrínsecos sobre o ovo em desenvolvimento, podendo as modificações na composição das cascas dos ovos serem produzidas por agentes abióticos, como lixiviação, umidade do solo ou abrasão pelas partículas do solo, bem como por bióticos, como degradação microbiana extrínseca (FERGUSON, 1981). O segundo mecanismo possível para alterações nas cascas de ovos implica atividades intrínsecas ao ovo, o que pode incluir a absorção de cálcio ou possivelmente a ação direta dos elementos celulares da casca (COX et al., 1984).

Os teores de fósforo e extrato etéreo na casca de ovos de *P. expansa* foram as únicas variáveis que apresentaram alterações diferentes ao longo da incubação nos grupos expostos à parationa metílica, em relação ao grupo controle. Sugere-se assim que o inseticida interferiu na dinâmica destes constituintes ao longo da incubação. Kalipci et al. (2010) afirmam que entre os fatores que podem influenciar as alterações nos constituintes das cascas dos ovos está a utilização de substâncias agrotóxicas como a parationa metílica. De acordo com estes autores não se conhece bem os possíveis efeitos ecológicos deste agrotóxico e tampouco sobre os efeitos nas cascas dos ovos de *P. expansa* ou repteis, que tem sido utilizado em diversas culturas, o que denota a importância de investigações sobre os problemas ambientais e ecológicos que esse inseticida pode causar.

O teor de fósforo encontrado nas cascas dos ovos de *P. expansa* estudadas variou de 0,14 a 0,20 mg. Esses valores corroboram com achados de Packard, Phillips e Packard (1994) que afirmam que a quantidade de fósforo na casca de ovo

é pequena e o vitelo é a única fonte significativa deste mineral para o desenvolvimento embrionário. Já Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998), em estudo com a espécie *Lepido chelyso livacea* (tartaruga oliva), apontaram ausência de fósforo em ovos livres de agrotóxicos.

Ao comparar cascas coletadas nos três terços da incubação, observou-se que não houve alteração significativa nos teores de fósforo de cascas do grupo controle. Da mesma forma, Packard, Phillips e Packard (1992), estudou cascas de ovos de iguanas (*Iguana iguana*), encontraram a mesma quantidade de fósforo nas cascas dos ovos, independentemente do dia da coleta, em ovos não expostos a contaminantes. Por outro lado, os resultados apresentados aqui evidenciam que a exposição à parationa metílica provocou aumento no teor de fósforo ao longo da incubação. Este aumento induzido pelo inseticida em cascas de ovos de *P. expansa* pode produzir alterações embrionárias que merecem investigação.

Assim como ocorreu com o fósforo, a exposição à parationa metílica alterou os níveis de extrato etéreo na casca dos ovos de *P. expansa* ao longo da incubação (Gráfico 2), produzindo redução significativa no teor deste componente, independentemente da concentração de exposição. Sabe-se que a casca desempenha a importante função de transporte de gases e líquidos durante a incubação (Andréa, 2008). Deste modo é razoável pensar que uma redução no extrato etéreo, ou gordura bruta, afete os mecanismos e/ou taxas de transporte, podendo interferir no desenvolvimento embrionário. Recentemente, verificou-se que a exposição ao herbicida atrazina também reduz os níveis de extrato etéreo na casca de ovos de *P. expansa* ao longo da incubação (SOUZA, 2014). Desse modo, sugere-se continuar investigando a influência de poluentes neste parâmetro e como alterações podem prejudicar o correto desenvolvimento embrionário.

Em nossos resultados pode-se sugerir o nível de extrato etéreo como parâmetro para indicar níveis de poluentes, tendo em vista seu decréscimo estatisticamente comprovado. Andréa (2008) cita que variações na quantidade de lipídios em um organismo podem ser um biomarcador para avaliação de respostas biológicas que indiquem exposição a agrotóxicos, citando como exemplo a grande correlação, encontrada em vários lugares do mundo, entre contaminação com o organoclorado hexaclorobenzeno e conteúdo de lipídios em organismos. De forma

paralela, maiores investigações podem determinar valores esperados de extrato etéreo em cascas de ovos de répteis e identificar padrões de alteração provocados por agrotóxicos, permitindo sua utilização como biomarcador de contaminação ambiental.

O cálcio é o principal constituinte inorgânico da casca, mostrando que este mineral é de grande importância para o desenvolvimento do embrião. Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998) apontam que o cálcio é um dos componentes mais importantes dos ovos e embriões de vertebrados.

No presente estudo foi verificado aumento no teor de cálcio das cascas de ovos de *P. expansa* durante a incubação. No entanto a exposição a este inseticida não alterou este padrão. Cox et al. (1984) em sentido oposto demonstraram que as concentrações de cálcio diminuíram durante a incubação em Squamatas. Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998) afirmam que a diminuição do teor de cálcio na casca começa aproximadamente após 40 dias de incubação. De acordo com o mesmo autora quantidade de cálcio presente na gema-albúmen satisfaz apenas 40% da quantidade total de cálcio necessário pelas crias durante a seu desenvolvimento normal. Os 60% restantes são fornecidos pela casca de ovo.

A concentração de proteína bruta nas cascas de ovos de *P. expansa* diminuiu ao longo da incubação, não sendo alterada pelo inseticida. Neste mesmo sentido Cox et al. (1984) relataram diminuição da concentração de proteína durante a incubação e ainda apontaram que as alterações da proteína da casca do ovo pode ocasionar modificações no cálcio associado.

A espessura das cascas de ovos de *P. expansa* nos diferentes tempos de incubação variou de 0,17 a 0,23 mm, não sofre alterações significativas ao longo da incubação, independentemente da exposição à parationa metílica. Kusuda et al. (2013), ao analisar espessura de cascas de ovos de diferentes espécies de Testudines, verificaram diferenças entre cascas rígidas e flexíveis. De acordo com os nossos resultados, cascas de ovos de *P. expansa* situam-se no padrão de cascas flexíveis (0,14 a 0,26mm) encontradas pelos mesmos autores.

Não foram observadas diferenças na morfologia, quantidade de fibras e poros presentes na casca dos ovos de *P. expansa*, independente da exposição ao agrotóxico.

Nos cortes histológicos, observaram-se estruturas finas e alongadas com tonalidade rósea. Esses achados se assemelham à descrição feita por Glerean (2003) para fibras de colágeno Tipo I.

As fotomicrografias registradas no presente trabalho identificaram claramente a existência de poros em uma casca bastante calcificada, corroborando com os achados de Bryan (2005) ao estudar cascas de ovos de *Alligator mississippiensis* em três lagos contaminados do centro-norte da Flórida, sendo possível identificar em todos os ovos poros do tipo cratera, que se desenvolveram na superfície externa de uma casca bem calcificada.

Em nossos resultados observou a existência de cristais na forma de agulhas em arranjo concêntrico ao redor dos poros. Esses arranjos são definidos como núcleo mamilar por Kusuda et al. (2013). Estes autores examinaram por microscopia eletrônica e difração de raios-X as cascas de ovos de 56 quelônios e propôs uma classificação em seis tipos em termos da sua estrutura de matriz de camada de calcário.

3.5 Conclusão

A incorporação do produto técnico parationa metílica ao substrato no primeiro dia de incubação artificial de ovos de *Podocnemis expansa*:

- aumenta teores de fósforo em suas cascas ao longo da incubação;
- reduz teores de extrato etéreo em suas cascas ao longo da incubação.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias: Parationa Metílica** Brasília, DF, 2002. Disponível em: <URL: <http://anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/poe.pdf> >. Acesso em: 20 jan.2014

ANDREA,M.M.**Bioindicadoresecotoxicológicos de agrotóxicos.comunicados técnicos. 2008. Disponível em:**
<http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83>.
Acessoem:30/01/2014.

ANDERSON, C. B.; CARTER, T. C. The hens eggs: Shellcrakage at impact a veavy, stiff body and factors that affect it. **Science.**, v. 17, p. 613, 1994.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de agrotóxicos – **Parationa metílica**. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d68e2100474596eb9f0cdf3fbc4c6735/p03.pdf?MOD=AJPERES&useDefaultText=0&useDefaultDesc=0>>. Acesso em: 15 de jan. 2014.

BATAUS, Y. S. L. **Estimativa de parâmetros populacionais de *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) no rio Crixás-açu (GO) a partir de dados biométricos.** 1998. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998.

BOUR, R. Global diversity of turtles (Chelonii; Reptilia) in freshwater.**Hydrobiologia**, v. 595, p. 593-598, 2008.

BRASIL. Ministério de Agricultura. **Compêndio Brasileiro De Nutrição Animal.** Brasília - DF, 1998. v. 1.

BRYAN, T. A. **MORPHOLOGICAL AND CONSTITUENT ANALYSES OF AMERICAN ALLIGATOR (*Alligator mississippiensis*) EGGSHELLS FROM CONTAMINATED AND REFERENCE LAKES.** FLORIDA, UNIVERSITY OF FLORIDA. 45p. (Tese de doutorado). 2005

CHAMBERS, J. E.; CARR, R. L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. **Toxicology**, v. 105, p. 291-304, 1995.

COX, D. L.; KOOB, T. J.; MECHAM, D. L.; SEXTON, O. J. External incubation alters the composition of squamate eggshells. **Composition Biochemical Physiology**, v. 79B, n. 3, p. 481-187, 1984.

DUPRE, A.; DEVAUX, B.; BONIN, F. **Turtles of the World**. London, RU: A & C Black, 2007. 416 p.

ERNST, C. H.; BARBOUR, R. W., **Turtles of the World**. Washington, Smithsonian Institution Press. 1989. 313p.

FERGUSON, M. W. J. Extrinsic microbial degradation of the alligator eggshell. **Science**, v. 214, p. 1135-1137, 1981.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GLEREAN, A. **Manual de histologia**: texto e atlas. São Paulo: Atheneu, 2003. 223p.

HUMASON, G. L. **Animal tissue techniques**. 3. ed. São Francisco: W.H. Freeman and Company. 1972. 641p.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, 2010. 84p.

KALIPCI, E.; OZDEMIR, C.; OZTA, F.,; SAHINKAYA, S. Ecotoxicological effects of Methyl parathion on living things and environment. **AfricanJournal of Agricultural Research**, v. 5, n. 8, p. 712-718, 2010.

KITIMASAK. W; THIRAKUPT. K; MOLL.D. L. Eggshell structure of the Siamese narrow-headed softshell turtle *chitrachitranutphand*, 1986 (testudines: Trionychidae). **Science Asia**.v. 29, p.95-98. 2003.

KUSUDA, S. YASUKAWA, Y. SHIBATA, H. SAITO, T. YOSHIZAKI, N. Diversity in the Matrix Structure of Eggshells in the Testudines (Reptilia) **Zoological Science**.v.30, p.366–374,2013.

MARCO.A; CARMEN DÍAZ-P; HIDALGO-VILA. J. Influence of egg aggregation and soil moisture on incubation of flexible-shelled lacertid lizard eggs. **Jounal Zoology**. v.60, p. 60-65. 2004.

PACKARD, M. J.; PACKARD, G. C.; BOARDMAN, T. J. structure of eggshells and water relations of reptilian eggs. **Herpetologica**, v.38, n.1, p.136-155, 1982.

PACKARD, M. J. Patterns of mobilisation and deposition of calcium in embryos of oviparous, amniotic vertebrates.**Journal. Zoology**., v. 40, p. 481-492, 1994.

PACKARD, M. J.; PHILLIPS, J. A.; PACKARD, G. C. Sources of mineral for green iguanas (*Iguana iguana*) developing in eggs exposed to different hydric environments. **Copeia**, v. 1992, n. 3, p. 851-858, 1992.

SAHOO, G.; SAHOO, R. K.; MOHANTY-HEJMADI, P. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development. **Comparative Biochemis tryand Physiology**Part A, v. 121, p. 91–97, 1998.

SOBREIRA, A. G. P.; ADISSI P. J. Agrotóxicos: falsaspremissas e debates. **Ciência & Saúde Coletiva** v. 8, n. 4, p. 985-90, 2003.

SOUZA, R.R.; **EFEITOS DA ATRAZINA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MORFOLOGIA DE CASCAS DE OVOS DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE.** 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

VALDES, A.C.; Avaliação da exposição a agrotóxicos em aves silvestres de vida livre. In: Von Matter S, Straube FC, Accordi I, Piacentini V, Cândido-JR. JF (Eds.) Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010, p. 429-439. 2010.

WALLACE. B. P; Sotherland. P. R; TOMILLO. P. S; BOUCHARD. S. S; REINA. R. D; SPOTILA. J.R; PALADINO. F. V. Egg components, egg size, and hatchling size in leatherback turtles. **Comparative Biochemistry and Physiology.**v. 145, p.524-532. 2006.

WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decisionmaking. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 123, p. 1-155, 1992.