

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

**EFEITOS DA ATRAZINA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
MORFOLOGIA DE CASCAS DE OVOS DE *Podocnemis
expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS
ARTIFICIALMENTE**

Rogério Rodrigues de Souza

Farmacêutico

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2013

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

**EFEITOS DA ATRAZINA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
MORFOLOGIA DE CASCAS DE OVOS DE *Podocnemis
expansa* (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS
ARTIFICIALMENTE**

Rogério Rodrigues de Souza

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos

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

Uberlândia – MG
Dezembro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S729e Souza, Rogério Rodrigues de, 1988-
2013 Efeitos da atrazina na composição química e morfologia de cascas de ovos de *Podocnemis Expansa* (testudines, podocnemididae) incubados artificialmente / Rogério Rodrigues de Souza. – 2013.
52 f. : il.

Orientador: André Luiz Quagliatto Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Atrazina - Teses. 3. Ovos - Contaminação - Teses. I. Santos, André Luiz Quagliatto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROGÉRIO RODRIGUES DE SOUZA – nasceu em São Gotardo, Minas Gerais, em 21 de dezembro de 1988, filho de José Wilson de Souza e Elza Helena Rodrigues de Souza. Em Janeiro de 2011, graduou-se como Bacharel em Farmácia pelo Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Durante a graduação foi monitor e estagiário do Laboratório de Anatomia Humana. Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias na área de Saúde Animal na Universidade Federal de Uberlândia – MG.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

Dedico aos meus pais José Wilson e Elza Helena e aos meus irmãos Rafael e
Rodrigo, pelo amor e pelo incentivo sempre.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Primeiramente a Deus.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade oferecida para realização deste sonho.

Ao orientador Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos pelo apoio, orientações e ensinamentos.

À equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres (LAPAS), pela credibilidade, parceria, e convívio.

À pós-doutoranda Lucélia Gonçalves Vieira, pela amizade sincera, pela confiança, pela disposição e pela ajuda sempre. Tornamo-nos verdadeiros amigos.

Ao pós-doutorando Sady Alexis Chavauty Valdes, cuja inteligência e determinação são admiráveis. Obrigado pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti pela paciência, disponibilidade e pelos ensinamentos.

À amiga Priscilla Rosa Queiroz Ribeiro, pela inestimável amizade, pelo convívio divertido e apoio na revisão da dissertação.

Aos meus colegas de mestrado, pela caminhada que fizemos.

Aos técnicos Fabrício Faria Araújo e Ester Cristina Borges Araújo do Laboratório de Histologia ICBIM-UFU, pela ajuda na execução do processo histológico.

Ao Prof. Evandro Abreu Fernandes pelo auxílio na execução e análise Bromatológica no laboratório de Nutrição Animal da faculdade de Medicina Veterinária da UFU.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por todo apoio logístico e pela cooperação técnica.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo do Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo pela doação do produto técnico Atrazina.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão de bolsa de mestrado.

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

Agradeço infinitamente todas as pessoas que, de um modo especial, sempre estiveram presentes em todos os momentos desta jornada.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Testudines.....	13
2.1.1 Podocnemis expansa.....	16
2.1.2 Cascas de ovos.....	17
2.2 Agrotóxicos.....	21
2.2.1 Atrazina.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Coleta das amostras.....	26
3.2 Incubação artificial dos ovos.....	27
3.3 Análise química.....	28
3.4 Análise morfológica.....	29
3.4.1 Espessura da casca.....	29
3.4.2 Microscopia de luz.....	29
3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	29
3.5 Análise estatística.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Composição química.....	30
4.1.1 Fósforo.....	30
4.1.2 Cálcio.....	32
4.1.3 Material mineral.....	34
4.1.4 Extrato etéreo.....	35
4.1.5 Proteína bruta.....	37
4.1.6 Nitrogênio.....	38
4.2 Composição morfológica.....	39
4.2.1 Espessura da casca.....	39
4.2.2 Microscopia de luz.....	41
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	42

5 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	44

**EFEITOS DA ATRAZINA NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MORFOLOGIA DE
CASCAS DE OVOS DE *Podocnemis expansa* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE) INCUBADOS ARTIFICIALMENTE**

RESUMO

As cascas de ovos servem como indicador para investigar os efeitos de substâncias lançadas no ambiente. No entanto, informações a respeito dos impactos de contaminantes ambientais na fauna silvestre são escassas. Objetivou-se estudar a composição química e a morfologia de cascas de ovos de *P. expansa* ao longo de um período de incubação artificial e verificar se a exposição à atrazina no dia zero de incubação interfere nas alterações que ocorrem nas cascas dos ovos. Foram utilizados 168 ovos de *P. expansa*, que foram incubados artificialmente e divididos em quatro grupos, de acordo com a exposição dos ovos ao herbicida atrazina em quatro diferentes concentrações: 0, 2, 20 e 200 ppb. As cascas dos ovos de todos os grupos foram analisadas em três períodos: 1-20, 21-40 e 41-60 dias de incubação. Foram analisados aspectos da composição química e morfologia dos ovos. A incorporação do produto técnico atrazina ao substrato no primeiro dia de incubação artificial de ovos de *P. expansa* interferiu nas variações que ocorreram ao longo da incubação em teor de fósforo, extrato etéreo e espessura das suas cascas; houve interferência também no último terço da incubação artificial, nos teores de extrato etéreo (concentrações 2 e 200 ppb), proteína bruta (concentração 2 ppb) e nitrogênio (concentração 2 ppb), bem como aumento da espessura das cascas em todas as doses; não ocorreu alteração da morfologia das cascas.

Palavras-chave: Contaminação, Herbicida, Cálcio, Espessura, Histologia.

**EFFECTS OF ATRAZINE IN CHEMICAL COMPOSITION AND MORPHOLOGY
OF EGG SHELLS FROM *Podocnemis expansa* (TESTUDINES,
PODOCNEMIDIDAE) ARTIFICIALLY INCUBATED**

SUMMARY

Egg shells serve as an indicator to investigate the effects of substances released into the environment. However, information about the impact of environmental contaminants on wildlife is scarce. It objected to study the chemical composition and morphology of egg shells of *P. expansa* over a period of artificial incubation and verify if the exposure to atrazine at zero day incubation interferes in the changes that occur in the eggshells. It used 168 eggs of *P. expansa*, that were artificially incubated and divided into four groups, according to exposure of eggs to the herbicide atrazine in four different concentrations: 0, 2, 20 and 200 ppb. The shells of eggs from all groups were analyzed in three periods: 1- 20, 21- 40 and 41- 60 days of incubation. Aspects of the chemical composition and morphology of the eggs were analyzed. There were significant differences in the chemical variables ether extract, crude protein and the real composition, and nitrogen and morphologically in thickness egg shells from *P. expansa* according to exposure to different concentrations of atrazine, particularly in incubation time of 60 days. In the morphological analysis by light microscopy and scanning electron microscopy there were no differences found.

Keywords: Contamination, Herbicide, Calcium, Thickness, Histology.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui 36 espécies de Testudines, distribuídas nos seus diversos ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo 29 espécies de água doce, duas terrestres e cinco marinhas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2012).

A *Podocnemis expansa*, conhecida popularmente como tartaruga da Amazônia, é a maior espécie do gênero *Podocnemis*. Nativa das bacias dos rios Amazonas, Tocantins-Araguaia, Orinoco e Essequibo, a espécie se dispersa por uma grande área ao norte do continente sul-americano, principalmente nas regiões amazônicas (IVERSON, 1992).

A tartaruga-da-Amazônia apresenta um comportamento reprodutivo extremamente complexo. Seu período reprodutivo ocorre na vazante dos rios da Amazônia, desovando em grandes grupos (VANZOLINI, 2001). As fêmeas depositam os ovos com número muito variável em função da espécie; a *P. expansa* deposita em média 100 ovos por ninhada (RUEDA-ALMONACID et al., 2007).

Os ovos podem ser esféricos ou alongados e, considerando a estrutura das cascas, estas podem ser rígidas e ásperas, com pequeno potencial de trocas hídricas e gasosas com o meio; ou flexíveis, com uma camada calcária porosa, sendo relativamente dependentes do ambiente hídrico (EWERT, 1979).

Segundo Pritchard e Trebbau (1984) informações sobre a biologia e ecologia dos répteis brasileiros são de fundamental importância para as medidas de proteção e manejo que estejam sendo exercidas ou propostas. Estudos do conteúdo e distribuição de minerais na casca de ovos de répteis são ainda mais escassos, mas a investigação futura neste campo é importante para compreender o papel complexo que a casca desempenha no desenvolvimento do embrião (OSBORNE; THOMPSON, 2005).

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, e pode alterar o 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; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Muitos compostos hidrofóbicos e seus metabólitos, que chegam aos ecossistemas aquáticos ainda precisam ser identificados, e seus impactos sobre a vida aquática e terrestre ainda não foram determinados. Dessa forma, toxicologistas ambientais vêm estudando extensivamente os efeitos de contaminantes químicos ou poluentes no ecossistema aquático e terrestre (VAN DER OOST et al., 2003).

As triazinas representam cerca de 30% de todos os herbicidas usados no mundo (CABRAL et al., 2003). A atrazina é um dos mais importantes herbicidas do grupo, pois tem uma utilização em ampla escala em todos os continentes (COUTINHO et al., 2005), sendo comum a utilização desta substância no controle de plantas daninhas em cultivos de milho, cana-de-açúcar e pinus. Na União Européia a atrazina foi recentemente retirada de uso, no entanto, no resto do mundo a atrazina continua sendo utilizada (SALABERRIA; HANSEN; ASENSIO, 2009).

A atrazina tem como principal rota de desaparecimento a hidrólise química e biodegradação por microbiota fúngica, sendo detectada no monitoramento de águas subterrâneas próximas a lavouras em longo prazo após sua aplicação. (COUTINHO et al., 2005). Este herbicida pode estar em direto contato com riachos, lagos e lagoas que tenham ligação com o lençol freático. Em contato com um ecossistema aquático ou terrestre a atrazina pode causar impacto a comunidades como crustáceos, peixes, anfíbios e répteis.

A maioria das investigações sobre a atrazina se concentram em anfíbios e peixes, e pouco se sabe sobre os efeitos desse agrotóxico sobre outros vertebrados, como os répteis (ROHR; MCCOY, 2010). Visto a falta de informações sobre contaminação por agrotóxicos em Testudines, objetivou-se estudar a composição química e a morfologia de cascas de ovos de *P. expansa* ao longo do período de incubação artificial e verificar se a exposição à atrazina no dia zero de incubação interfere nas alterações que ocorrem nas cascas dos ovos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Testudines

Existem aproximadamente 6400 espécies de répteis que, segundo uma revisão taxonômica baseada na filogenia, dividem-se em quatro ordens: Testudines (tartarugas, cágados e jabutis), Squamata (lagartos, serpentes e anfisbêneas), Crocodylia (crocodilos, jacarés, aligátors e gaviais) e Rhynchocephalia (tuataras e aves), (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

Os Testudines (Figura 1) existem há aproximadamente 250 milhões de anos, desde o Jurássico e são constituídos por 211 a 335 espécies de água doce, salgada ou terrestre (ANDRADE, 2008). Durante o fim do Cretáceo e o começo do Paleoceno, os répteis passaram por um processo de extinção; vários Testudines de diversas famílias foram extintas.

Atualmente, encontram-se duas sub-ordens entre os Testudines: Cryptodira e Pleurodira. Na primeira, onde está incluída a maioria das espécies, os animais retraem a cabeça por meio de uma flexão vertical das vértebras do pescoço. Já os pleurodiros flexionam o pescoço lateralmente (SOUZA, 2006).

Os Testudines apresentam como característica marcante, que as distingue dos outros répteis, uma carapaça formada por ossificações dermais que incorporam costelas, vértebras e porções da cintura pelvina (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

Os Testudines estão entre os vertebrados mais especializados morfologicamente (POUGH; JANIS; HEISER, 2003). A estrutura dos membros é altamente variável, refletindo o ambiente e os modos de locomoção das diferentes espécies. As espécies marinhas possuem os membros torácicos proporcionalmente grandes em relação ao tamanho da carapaça e em forma de remo; as espécies de água doce apresentam os membros pelvins e torácicos espalmados, com dedos distintos, tendo quatro ou cinco garras, enquanto as espécies terrestres possuem membros em forma de coluna, com dedos indistintos (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

Vários são os padrões de crescimento dos Testudines. Várias espécies podem dobrar de massa e tamanho no primeiro ano de vida. Em geral, têm sua

taxa de crescimento diminuída com o alcance da maturidade sexual e os fatores que determinam tais padrões podem ser mudança de uma dieta carnívora, quando filhote, para herbívora, quando adulto; dimorfismo sexual - em muitas espécies os machos são menores que as fêmeas; temperatura da água - maior crescimento no verão que no inverno; quantidade de alimento ingerido e fatores genéticos (IVERSON, 1977).

Considerando os aspectos reprodutivos pode-se salientar que os Testudines são animais ovíparos que depositam seus ovos em diferentes ambientes terrestres, como praias fluviais ou costeiras, solo barroso e areno-argiloso, próximos aos corpos d'água ou em meio à vegetação (FERRI, 2002). O acasalamento é frequentemente precedido por comportamento nupcial, que tende a ser quase ritualizado. Existem diversos sinais táteis que incluem mordidas, golpes e contatos corporais diretos. Esses comportamentos são usados primariamente entre machos e entre machos e fêmeas (POUGH; JANIS; HEISER, 2003).

A determinação sexual pode ser tanto genotípica quanto dependente de fatores ambientais. Estas duas modalidades de determinação sexual podem ocorrer tanto dentro de uma mesma família, como dentro de um mesmo gênero (MALLMANN, 1994). Os principais fatores que influenciam a determinação sexual são a temperatura, umidade e as trocas gasosas (FERREIRA JR., 2003).

Há espécies que apresentam a determinação sexual dependente de fatores ambientais, especialmente da temperatura em que os ninhos foram expostos. Esse dado ressalta a importância das informações relativas à biologia básica desses animais para uma conservação e um manejo bem sucedidos (POUGH; JANIS; HEISER, 2003). O sexo dos embriões depende da temperatura de incubação e é definido pela temperatura a que o ovo é submetido durante um período de tempo, chamado de período termo-sensitivo, que acontece no segundo terço do período de incubação (MROSOVSKY; PIEAU, 1991). As fêmeas de Testudines podem apresentar dois modelos distintos de DST (determinação sexual dependente da temperatura de incubação dos ovos): DSTIa, onde fêmeas são geradas em altas temperaturas e machos em baixas temperaturas e DSTII, onde as fêmeas são geradas em temperaturas altas e baixas temperaturas e os machos em temperaturas intermediárias (EWERT; NELSON, 1991).

A maioria das tartarugas, incluindo *P. expansa*, apresenta o modelo DSTIa (VALENZUELA; BOTERO; MARTINEZ, 1997). Em altas temperaturas ocorre no

embrião a produção da enzima aromatase, um hormônio feminilizante responsável pela geração de fêmeas. Temperaturas baixas não levam à produção dessa enzima, resultando em machos (PIEAU, 1996).

Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária do Abastecimento (BRASIL, 1997) no artigo 438, os Testudines são denominados como “pescado”, assim como os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, mamíferos de água doce ou salgada e Testudines de água salgada. Os Testudines sempre constituíram um recurso de grande importância para as populações que vivem às margens dos rios amazônicos. Sua carne, excelente fonte de proteína, como os seus ovos, gordura e vísceras são de grande importância às comunidades ribeirinhas (MARTINS; MOLINA, 2008).

No Cretáceo, o gênero *Podocnemis* existia na América do Norte. No período do Cretáceo superior e no Eocênio foram encontrados fósseis desse gênero na Europa e África. Atualmente, esse gênero existe em Madagascar (África) e na América do Sul (ANDRADE, 2008).

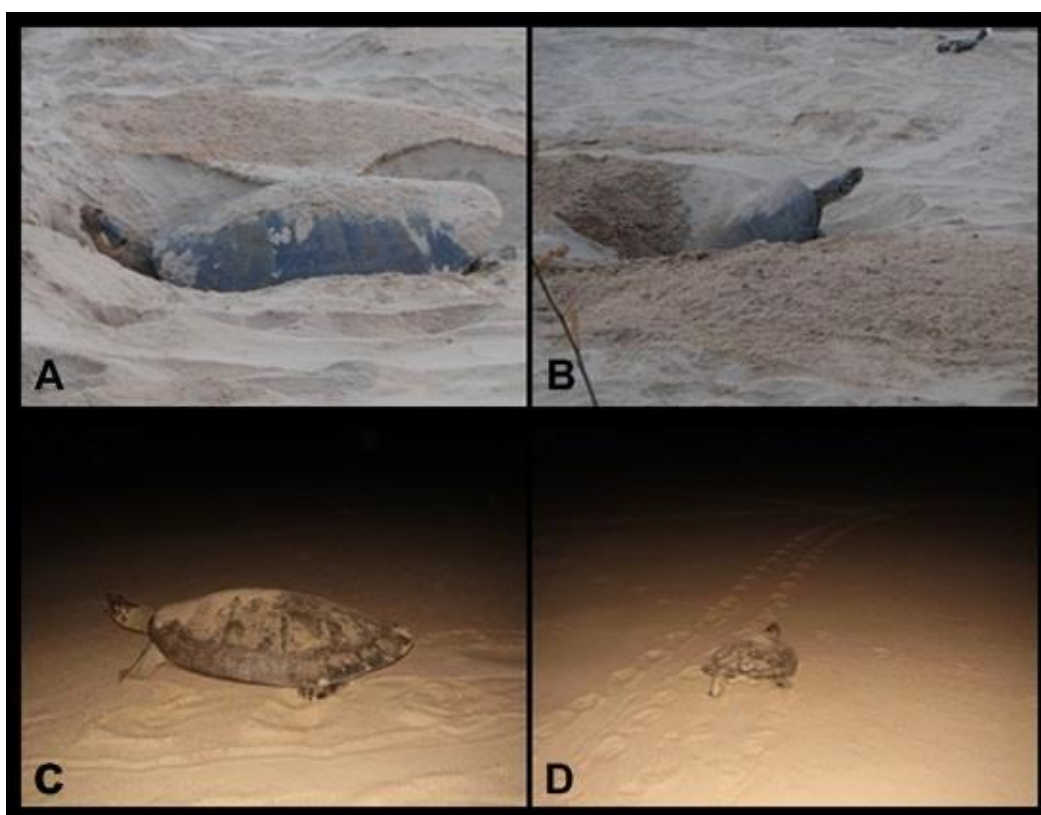


Figura 1 – A; B; C e D, Fêmeas da ordem Testudines em processo de postura.

2.1.1 *Podocnemis expansa*

Na família Pelomedusidae encontram-se as espécies *Podocnemis expansa*, *P. unifilis*, *P. eritrocephala*, *P. sextuberculata*, *Peltocephalus dumerilianus*, *Pelomedusas spp.* e *Pelusias spp.* A *P. expansa* é conhecida popularmente como tartaruga-da-Amazônia, tartaruga-do-Amazonas, tartaruga-grande-do-Amazonas, tartaruga-verdadeira, aráu ou jurará-açu (LUZ; REIS, 1998).

A *P. expansa* (Figura 2) é o maior Testudines fluvial da América do sul, medindo de 75 a 107 cm de comprimento por 50 a 75 cm de largura (RODRIGUES, 1992). Apresenta a seguinte classificação taxonômica: filo Cordados, subfilo Vertebrados, superclasse Tetrápodes, subclasse Anapsidea, classe Reptilia, ordem Chelonia ou Testudines, subordem Pleurodiros, família Podocnemididae, gênero *Podocnemis*, espécie *Podocnemis expansa* (LUZ; REIS, 1998).

Sua distribuição geográfica ocorre no norte e centro-oeste do Brasil, Guianas, Venezuela e Colômbia. Seu habitat são as baías de grandes rios como os da bacia Amazônica, chegando a alcançar a região central do território brasileiro, bacia dos rios Araguaia e Tocantins, em Goiás e Mato Grosso (BATAUS, 1998; VALENZUELA, 2001). Animais de hábito diurno vivem em grupos, alimentando-se de vegetais e peixes na natureza e de vegetais, peixes, carne moída e ração em cativeiro. Seu período de reprodução é entre setembro e março. As fêmeas enterram em média 60 a 100 ovos em covas de aproximadamente 60 cm de profundidade, cobertas por areia. A eclosão ocorre em um período de 45 a 60 dias (SALERA JR., 2005).

A tartaruga-da-Amazônia destaca-se devido às excelentes características sensoriais de suas partes comestíveis, o que levou a espécie ao risco de extinção (MELO et al., 2004). É uma das espécies silvestres mais exploradas zootecnicamente. O sabor e a qualidade de sua carne alcançam altos valores de mercado quando comparado com as carnes dos animais domésticos tradicionais (DORNELLES; QUINTANILHA, 2003). O grande problema da extração de tartarugas, é que na maioria das vezes, quando são abatidas, as mesmas encontram-se ovadas, uma vez que sua captura ocorre momentos antes da desova, quando estão cavando seus ninhos nas praias (ANDRADE, 1988).

A pressão imposta nas populações de tartaruga-da-Amazônia em decorrência da exploração inapropriada resultou na inclusão da espécie na Lista de Espécies Ameaçadas da *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* (IUCN, 2013), sendo apresentada na condição de baixo risco/dependente de conservação. A espécie também se encontra no apêndice II do *Convention on International Trade Endangered Species* (CITES), que lista as espécies que não se encontram ameaçadas de extinção, mas que podem vir a se tornar. Isto mostra a importância de estudos biológicos e ecológicos para melhorias nas práticas de manejo e conservação de *P. expansa*.



Figura 2 – A; B; C e D, Exemplares da espécie *P. expansa* durante e logo após a eclosão.

2.1.2 Cascas de ovos

Nos ovos de tartarugas (Figura 3), a casca é constituída por duas partes: um invólucro de membrana fibrosa e uma camada de calcário ligada à superfície externa da membrana. Tanto quanto se sabe, o componente de calcário de cascas de ovos de quelônios é carbonato de cálcio, que ocorre como aragonita. A estrutura

da casca do ovo pode estar relacionada com o ambiente do ninho em que tartarugas põem ovos (PACKARD et al., 1979; PACKARD, 1980; SILYN-ROBERTS; SHARP, 1985, 1986).

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, estando sua complexidade relacionada com o seu papel de proteger e manter o embrião em desenvolvimento. Sua composição, em relação ao embrião em desenvolvimento ainda não é totalmente compreendida. Anderson e Carter (1994) destaca a existência de pouca informação sobre a disponibilidade de minerais e compostos químicos das cascas de ovos de répteis.

Modificações na composição da casca podem ser produzidas por agentes abióticos, como lixiviação, umidade do solo ou abrasão por partículas do solo; bem como por bióticos, como degradação microbiana extrínseca (FERGUSON, 1981). Estes agentes não precisam ser considerados mutuamente exclusivos, pois parece mais provável que eles exercem em conjunto seus efeitos de modificação. Como a incubação, no presente estudo foi artificial, tais modificações não foram constatadas.

De acordo com Cox et al. (1984) independente dos constituintes da casca de ovo é evidente que alterações orgânicas implicam uma capacidade de mudança que pode ser importante para as propriedades funcionais do mesmo. As diferenças da composição química das cascas encontradas entre espécies podem ser explicadas pela necessidade do embrião em relação aos minerais que compõem a casca e fatores a que o ninho está exposto.

De acordo com Miller e Jones (1990) os fatores que podem interferir na composição química de cascas de ovos de *Chelodina longicollis* são alimentação, saúde, ambiente, idade e clima; o autor ainda afirma que os valores da composição química podem variar até 50%, dependendo do estado em que a fêmea se encontra.

Bryan (2005) descreve que análises de cascas a partir de diferentes períodos de incubação relativamente paralelos, podem ser diretamente comparadas para determinar constituintes relativos, como sua mobilização de minerais, e a influência de fatores ambientais sobre esses parâmetros.

Dentre os fatores ambientais que podem influenciar a composição das cascas de ovos de determinada espécie está a utilização de agrotóxicos, como, por exemplo, a atrazina, que em contato com um ecossistema aquático pode causar impacto às comunidades aquáticas como crustáceos, peixes, anfíbios e répteis. Os possíveis efeitos da atrazina sobre a composição de cascas de ovos poderiam ser desencadeados por seu amplo potencial de contaminação de diferentes compartimentos ambientais em virtude de suas características, tais como; alto potencial de lixiviação e escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada à matéria orgânica (GRISOLIA, 2005).

Há ainda que considerar-se os possíveis efeitos do tempo de incubação sobre as cascas dos ovos. Como um possível mecanismo que pode provocar alterações em cascas de ovos implica atividades intrínsecas ao ovo, incluindo absorção de componentes químicos como o cálcio ou possivelmente a ação direta dos elementos celulares da casca (COX et al., 1984); acredita-se que o decorrer do tempo de incubação possa aumentar ou diminuir os efeitos desses mecanismos que podem provocar alterações nas cascas.

A casca tem sido indicada como uma fonte de cálcio para o desenvolvimento de embriões, sendo um dos componentes mais importantes dos ovos e embriões de vertebrados. Os embriões de vertebrados superiores têm três fontes principais para atender suas necessidades de cálcio durante o desenvolvimento: vitelo, casca de ovo e sangue materno. Em Squamatas os vitelos de ovos são ricos em cálcio enquanto aqueles de Testudines, inclusive de *P. expansa*, e Crocodylia fornecem apenas uma fração do mesmo. Dessa forma, a casca tem sido indicada como uma fonte de cálcio para aves, crocodilos e tartarugas (SAHOO; SAHOO; MOHANTY-HEJMADI, 1998).

Os mesmos autores ainda afirmam que estudos da composição química das cascas de ovos durante o desenvolvimento não são acessíveis para a maioria dos répteis. Além disso, os processos como os embriões removem o cálcio da casca e como eles controlam este processo não foram elucidados para nenhuma espécie.

Packard (1994) demonstrou a contribuição de cálcio das cascas de ovos para os embriões de vários grupos de ovíparos, vertebrados amnióticos (cobras, lagartos, Testudines de água doce e Arcossauros), mostrando que os embriões nestes grupos obtêm cálcio, tanto do vitelo e da clara como da casca do ovo, mas a

importância relativa dessas fontes varia em diferentes grupos, dependendo do grau de calcificação da casca do ovo.

De acordo com Lawniczak e Teece (2005), embora o mecanismo de transporte de cálcio a partir da casca do ovo de répteis permaneça incerto, outros estudos mostram que a membrana está envolvida na mobilização de cálcio no desenvolvimento de tartaruga, sugerindo que o mecanismo de transporte de cálcio a partir da casca de ovo possa variar.

Packard, Packard e Gutzke (1984) descreveram que o declínio no teor de cálcio nas cascas de *Coluber constrictor* (corredora azul) não correspondeu exatamente ao aumento de cálcio dentro dos ovos, em parte, por causa da variabilidade inerente nas análises deste tipo e, em parte, porque não é possível seguir as alterações no conteúdo de cálcio do indivíduo nas cascas de ovos ao longo da incubação.

Xiang et al. (1997) analisaram a utilização de energia e de minerais durante o desenvolvimento embrionário em ovos de *Naja naja atra* (cobra chinesa) e relataram que o nível de cálcio retirado de outras fontes, que não o vitelo foi muito menor do que os valores relatados para crocodilos e tartarugas. E descreveram que essas diferenças provavelmente refletem as diferenças interespecíficas na casca de ovo de diferentes espécies.

Christensen (1983) e Roland (1982) demonstraram que variações na espessura da casca dentro de uma mesma espécie ocorrem em função do tamanho do ovo, com ovos maiores apresentando espessuras menores.

Mathies e Andrews (2000) avaliaram a espessura da casca dos ovos de vários répteis Squamata (*Sceloporus clarkii*, *Sceloporus undulatus hyacinthinus*, *Urosaurus ornatus*, *Sceloporus undulatus consobrinus*, *Sceloporus virgatus* e *Sceloporus scalaris*), concluindo que a espessura da casca diferiu entre as espécies, mas não foi negativamente relacionada com o grau de desenvolvimento embrionário, como previsto.

A espessura das cascas de ovos de *S. virgatus*, uma espécie com embriões bem desenvolvidos, não diferem dos de *S. u. consobrinus*, uma espécie com embriões relativamente subdesenvolvidos. Cascas de *U. ornatus*, uma espécie com embriões ainda menos desenvolvidos do que *S. u. consobrinus* eram mais finas do que as de qualquer das outras espécies. Foi evidenciado, ainda, que cascas de ovos de *S. u. hyacinthinus*, eram substancialmente mais espessa do que as das

outras espécies. Assim, praticamente toda a variação na espessura da casca entre as espécies do oeste dos EUA foi explicada pela variação na massa do ovo (MATHIES; ANDREWS, 2000).

A forte relação entre a espessura da casca e massa de ovos sugere que as diferenças interespecíficas na espessura da casca são principalmente o resultado de considerações estruturais, como é o caso de ovos de espécies de aves (AR et al., 1974). Mathies e Andrews (2000) relataram a necessidade de considerar a possível alometria entre a espessura da casca e o tamanho do ovo ao fazer comparações inter e intraespecíficas de espessura da casca.

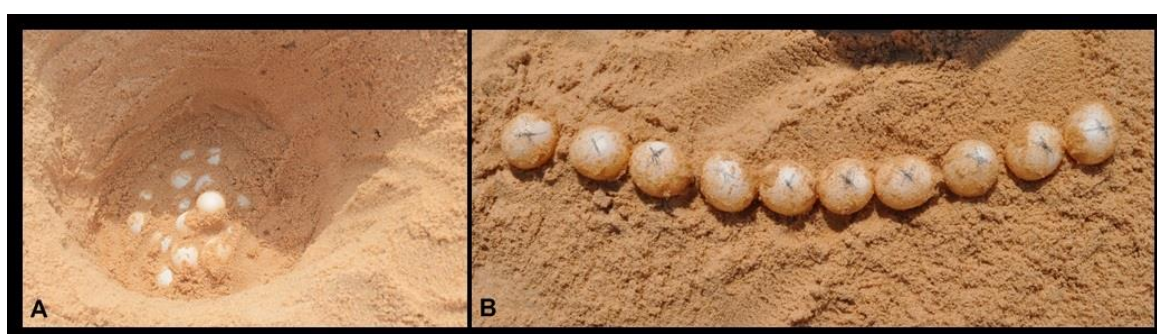


Figura 3 – A, Ovos de *P. expansa* no interior do ninho; **B,** Ovos de *P. expansa* retirados do ninho, com marcação do seu posicionamento.

2.2 Agrotóxicos

Um dos primeiros agrotóxicos utilizados pelo homem foi o enxofre, há 2700 anos. O uso deste composto favoreceu o aparecimento do sulfato de cobre que foi utilizado no continente europeu no século XIX para o combate de fungos. As piretrinas, extraídas do crisântemo, foram utilizadas por volta de 1885. Com a expansão da agropecuária, outros compostos foram surgindo e em 1931 passou-se a estudar as características fungicidas dos ditiocarbamatos (DIERKSMEIER, 2001).

O uso de substâncias químicas com propriedades pesticidas é conhecido há algum tempo, mas foi a partir de 1930 que a ação se intensificou, com a introdução do alquiltiocianato, considerado a primeira substância orgânica sintética empregada no controle de pestes em lavouras. Entretanto, a substância que acabou se destacando foi o diclorodifenil-tricloroetano (DDT), sintetizado em 1939 por Muller e posteriormente produzido em escala comercial em 1943 por ser o mais eficiente. Desde então, outros compostos organoclorados, com diferentes mecanismos de

ação e seletividade, foram sendo incorporados à lista de substâncias para controle de organismos infestantes em lavouras (NUNES; RIBEIRO, 1999).

A Environmental Protection Agency (USEPA, 2012) definiu o termo “pesticides”, palavra em inglês com a tradução para o português de pesticidas, como todas as substâncias ou misturas de substâncias de natureza química que tem como objetivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Segundo a mesma agência, pragas são os organismos vivos que ocorrem onde não são pretendidos, causando dano às lavouras, aos seres humanos ou a outros animais.

O termo pesticida pode ser usado para englobar os termos mais específicos, como acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, moluscicidas, nematocidas e rodenticidas, destinados ao combate de ácaros, bactérias, fungos, ervas, insetos, moluscos, nematoides e roedores. (USEPA, 2012).

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, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja 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 inibidores do crescimento.

As finalidades dos pesticidas na agricultura incluem a elevação da produção com aumento da produtividade, a melhoria da qualidade dos produtos e a redução do trabalho e dos gastos com energia (BOWERS et al., 1997). No entanto, o uso de pesticidas tem provocado problemas ambientais e prejuízos à saúde humana (COUTINHO et al., 2005).

Segundo Grisolia (2005), ao Brasil corresponde mais de 55% do mercado latino americano de agrotóxico. Além disso, áreas agrícolas estão em plena expansão e as projeções são para o aumento do consumo desses produtos, principalmente de herbicidas, que no Brasil representam mais de 50% das vendas desde 1994.

As consequências do uso de pesticidas quando aplicados à agricultura, ainda que de maneira correta, é a eventual contaminação do solo e em alguns casos a posterior contaminação de fontes hídricas. Esta condição é algumas vezes

amenizada quando a concentração residual dos poluentes sofre degradação natural por via química, biológica ou por fotólise. No entanto, esse processo de degradação não é favorecido facilmente, devido a características como alta massa molecular e resistência a degradação, permanecendo no meio ambiente por longos períodos de tempo sem sofrer qualquer alteração. Dependendo das características do solo, essas moléculas podem ser absorvidas nas superfícies das partículas e posteriormente lixiviadas, para as fontes de águas superficiais e subterrâneas (SOUZA, 2011).

Os possíveis mecanismos envolvidos no processo de sorção de pesticidas em solos são pontes de hidrogênio, transferência de carga, ligação de Van-der-Waals e sorção hidrofóbica. A sorção é dependente das características químicas do pesticida, das propriedades do solo e de seus constituintes como tipo de matéria orgânica, argilas, óxidos, pH do solo, entre outros. As substâncias húmicas são apontadas como sendo os principais sítios de sorção da atrazina no solo via pontes de hidrogênio (TRAGHETTA et al., 1996).

Os pesticidas além do princípio ativo contêm os agentes de dispersão e solubilizantes, também chamados de surfactantes. Esses componentes não tem função pesticida, no entanto, podem ser biologicamente ativos e por vezes são esses os compostos mais tóxicos da fórmula (BOLOGNESI, 2003). O uso dos praguicidas, principalmente na agropecuária intensiva, a repetição de cultivos em uma mesma área e o uso inadequado em animais de produção têm levado a um desequilíbrio biológico, diminuindo o número de algumas espécies de seres vivos, assim como contaminando o meio ambiente.

2.2.1 Atrazina

As triazinas são um grupo de herbicidas químicos similares, registrados em 1955, como a atrazina, cianazina, propazina, ametrina e simazina, usadas para o controle de ervas daninhas, em cultivos de milho, cana-de-açúcar e pinus, devido à capacidade desse composto de inibir a fotossíntese bloqueando o transporte de elétrons e levando a morte da planta por falta de energia (JACOMINI, 2002). Os triazínicos têm amplo potencial de contaminação de diferentes compartimentos ambientais em virtude de suas características, tais como, alto potencial de

lixiviação e escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa solubilidade em água e absorção moderada à matéria orgânica (GRISOLIA, 2005).

Os mecanismos de ação dos herbicidas dependem do risco de desenvolvimento de resistência pelas espécies alvo. Os herbicidas do grupo C, inibidores do Fotossistema II, apresentam elevado número de biótipos resistentes. As triazinas pertencem ao grupo C1, inibidores do Fotossistema II. Atuam na membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLET; OVEREJO; CARVALHO, 2004). As plantas que recebem aplicações desses herbicidas apresentam clorose foliar e tem o seu crescimento inibido.

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um pesticida da família das triazinas e tem sua classificação toxicológica como classe III. Foi registrada em 1958 pela empresa Ciba-Geigy. O Brasil e os Estados Unidos ganham destaque quanto ao largo uso da atrazina em plantações. No mundo, o consumo desse herbicida é estimado em 70.000 toneladas/ano (BINTEIN; DEVILLERS, 1996).

Legislações dos Estados Unidos e do Brasil estabelecem concentrações máximas permitidas para cada pesticida em água, sendo o limite máximo permitido para o pesticida atrazina em água destinada ao consumo humano de 3 ppb nos Estados Unidos (USEPA, 2012) e de 2 ppb no Brasil, pela Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). A Comunidade Européia (CE) foi mais restritiva, estabelecendo em 0,1 ppb a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas para consumo humano e em 0,5 ppb para a concentração total de pesticidas (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Embora, altamente restringida pela Comunidade Européia, a detecção da atrazina em águas destinadas ao consumo humano permanecia em níveis superiores aos estipulados pelo Conselho da União Européia. Dessa forma, na União Européia a atrazina foi recentemente retirada de uso, no entanto, no resto do mundo continua sendo utilizada (SALABERRIA et al., 2009).

Estudos vêm identificando diversos pesticidas em corpos hídricos. Ricart et al. (2010) identificaram 20 diferentes pesticidas presentes em amostras de água e de sedimentos provenientes do rio *Llobregat* em Barcelona, Espanha, incluindo compostos triazínicos. A atrazina é comumente detectada no monitoramento de solos e águas, devido ao uso intenso, baixa reatividade e solubilidade. Seus

resíduos e metabólitos podem ser encontrados nesses locais após um longo tempo de aplicação (MELI et al., 1992).

Benvenuto et al. (2010) identificaram compostos triazínicos em amostras de rios de regiões da Itália e Espanha e detectaram a presença da atrazina em sete de onze rios estudados das regiões de Valencia (Espanha), e de Milão (Itália). Outros dez compostos triazínicos também foram identificados no estudo. Segundo Hallberg (1989), a atrazina já foi encontrada em águas subterrâneas, em uma frequência 10 a 20 vezes maior que o segundo contaminante da lista de ocorrências catalogada nos Estados Unidos.

No Brasil, o monitoramento de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas ainda não é prática corrente, devido à ausência de infraestrutura laboratorial necessária e aos custos elevados envolvido na realização das análises (ARMAS et al., 2007).

Embora existam alguns dados esparsos sobre detecção de atrazina em água subterrânea no Brasil, pouco tem sido feito para determinar resíduos deste composto nos aquíferos brasileiros (UETA et al., 1999). Filizola et al. (2002) citam que a concentração da maioria dos pesticidas encontrada em água é geralmente baixa, em parte, por serem pouco solúveis em água e em parte devido ao efeito da diluição. Mesmo em concentrações baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos.

Cerdeira et al. (2005) identificaram no aquífero Guarani, o maior e mais importante lençol de água subterrânea de toda a região centro-sul do país, atrazina em quase todas as amostras de água superficial coletada.

Souza et al. (2004) identificou atrazina somente em uma amostra no mês de abril em baixas concentrações em água de poços tubulares em áreas de cultura de algodão na microrregião de primavera do leste, Mato Grosso, e concluiu que as concentrações encontradas de atrazina foram inferiores às aquelas reportadas em estudos recentes desenvolvidos em outros países.

Pinheiro, Silva e Kraisch (2010) analisaram vários herbicidas, incluindo a atrazina, e verificaram que os herbicidas são detectados com baixa frequência em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, Santa Catarina.

Dores (2001) analisaram os principais pesticidas usados em áreas agrícolas próximas à cidade de Primavera do Leste, Mato Grosso, e concluíram os que possuem maior mobilidade no ambiente são: metomil, triadimefon, atrazina,

metribuzina, simazina, clorimuron etil, imazetapir, flumetsulan, fomesafen, glifosato e metolaclor. Ainda ressaltaram que dentre estes, a atrazina e seus metabólitos desetil atrazina e desipropil atrazina, simazina, metribuzina e metolaclor são os princípios ativos que foram detectados mais frequentemente em águas superficiais e subterrâneas, em diversos países.

Milhome et al. (2009) avaliaram o risco de contaminação por pesticidas aplicados na agricultura irrigada do Baixo Jaguaribe (CE) quanto a contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Foram utilizados os critérios sugeridos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Do total de pesticidas investigados a atrazina e outros agrotóxicos apresentaram potencial de contaminação das águas subterrâneas que exige monitoramento. Em relação ao risco de contaminação de águas superficiais, foram considerados como alto potencial contaminante diversos compostos, incluindo a atrazina.

Neuman-Lee e Janzen (2011) avaliaram a exposição da atrazina e seus impactos no comportamento e sobrevivência em tartarugas das espécies *Gratemys ouachitensis* e *G. pseudogeographica*, e descreveram que na eclosão, as tartarugas de diferentes grupos de tratamento não diferiram significativamente em massa, comprimento da carapaça, ou largura da carapaça. Nenhum dos resultados exibiu um impacto crescente com o aumento da concentração de atrazina. Em vez disso, o grupo controle e o maior grupo de tratamento mostraram efeitos semelhantes para vários dos parâmetros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Foram utilizadas cascas de 168 ovos de *P. expansa*, de área não agrícola protegida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), 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 e pela SISBIO/ICMBio licença nº 36957-1/2012.

Os ovos foram separados e identificados com respeito ao ninho de origem (Figura 4). Após a coleta, foram transportados em caixas de papelão com sacos plásticos, contendo 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 Incubação artificial dos ovos

Os ovos foram incubados artificialmente em sete bandejas plásticas colocadas em caixa 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 (Figura 4).

A incubação artificial dos ovos foi feita em areia do local de coleta dos ovos coberta com uma camada de dois centímetros, aproximadamente, de vermiculita.

Adicionou-se no primeiro dia de incubação artificial, água contaminada com atrazina, nas concentrações de 2, 20 e 200 partes por bilhão (ppb). Aos grupos controle foi adicionada água destilada. Dessa forma, os ovos estudados foram divididos em quatro diferentes grupos.

Foram realizadas coleta e análise das cascas dos ovos em três diferentes estágios em relação ao tempo de incubação, de 1 a 20, de 21 a 40 e de 41 a 60 dias de incubação artificial.

Ao longo da incubação, a temperatura foi mantida entre 28 e 31°C e a umidade relativa do ar entre 80 e 100%. Estas variáveis foram registradas diariamente por meio de um termohigrômetro digital acoplado ao interior da incubadora.

Após a eclosão, as cascas foram limpas manualmente para remoção de resíduos, tais como restos de membrana corioalantóide e areia; posteriormente secas em estufa a 80° C durante duas horas. As cascas foram distribuídas para análise de acordo com cada concentração do agrotóxico, tipo de substrato e tempo de incubação (Figura 4).

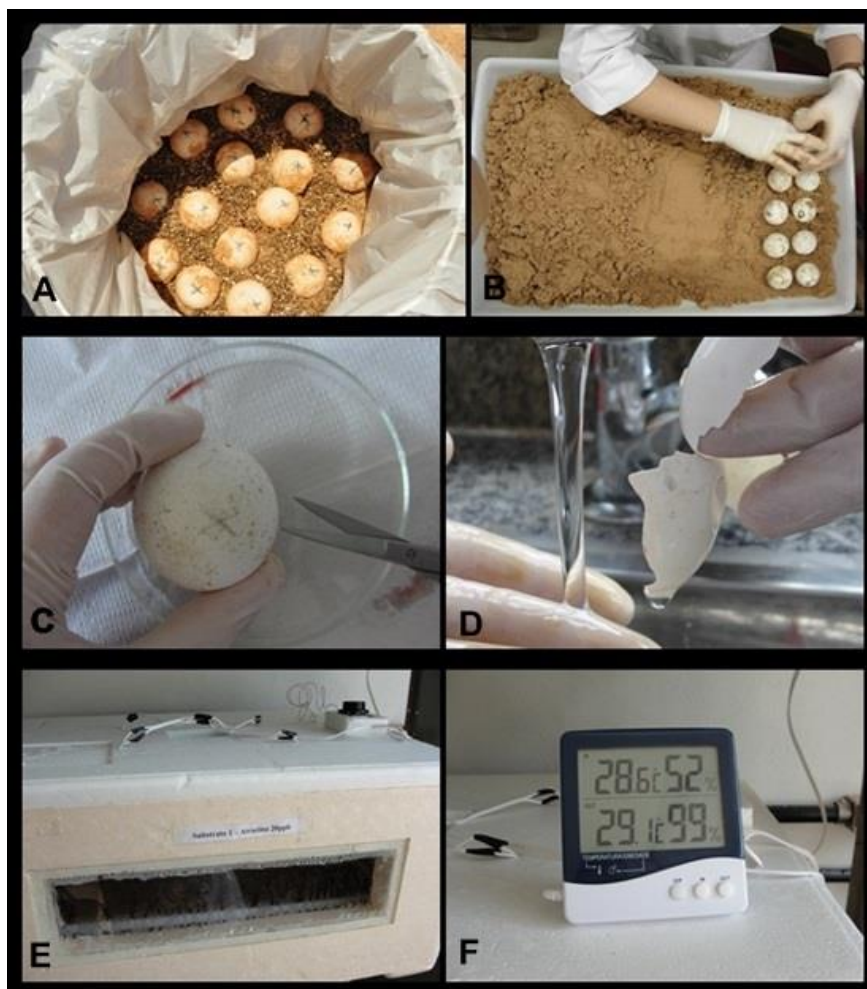


Figura 4 – A, Ovos separados e identificados com respeito ao ninho de origem; B, Ovos incubados artificialmente em bandejas plásticas; C, Abertura dos ovos; D, Limpeza manual dos ovos para remoção de resíduos; E, incubadora artificial; F, termohigrômetro digital.

3.3 Análise química

Para as variáveis de composição química, as cascas de cada grupo foram separadas em seis subgrupos, com cinco cascas em cada.

As cascas reunidas nos seis subgrupos foram secas em estufa, trituradas e preparadas para os procedimentos de análise de matéria mineral, cálcio, fósforo, extrato etéreo, proteína bruta e nitrogênio conforme Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal (1998), no laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da (UFU).

3.4 Análise morfológica

3.4.1 Espessura da casca

A espessura de cada 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.

3.4.2 Microscopia de luz

Foi coletado um fragmento de 1 cm² de cada casca. Eles foram lavados em água corrente 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 interna da casca.

Logo após, as membranas foram submetidas a dois banhos de parafina entre 52 e 58°C por 50 minutos cada para inclusão em blocos de parafina. Foram realizados cortes histológicos com espessura de 5µm em micrótomo EDGE SL-200. Posteriormente, os cortes foram deixados em banho-maria para distender 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), no Laboratório de Histologia ICBIM-UFU.

3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

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

3.5 Análise estatística

A análise dos dados foi conduzida em esquema de análise de variância (ANOVA), instalado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo considerados os fatores: tratamento (controle, atrazina 2 ppb, atrazina 20 ppb e atrazina 200 ppb) e tempo de incubação (0 a 20, 20 a 40 e 40 a 60 dias). Cada grupo tratado nas diferentes doses de atrazina foi comparado ao controle e os tempos de incubação 40 e 60 dias foram comparados aos 20 dias. Quando necessário foi utilizado o teste post hoc de Tukey, adotando-se nível de significância de 1% ($p < 0,01$) e 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição e análise dos resultados apresenta a comparação entre os grupos tratados com diferentes concentrações de atrazina (2, 20 e 200 ppb) com o grupo controle (tabelas) e a comparação entre os tempos de incubação 40 e 60 dias com os 20 dias de incubação (gráficos).

4.1 Composição química

4.1.1 Fósforo

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na concentração de fósforo nos grupos tratados com atrazina em diferentes concentrações (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb) em relação a concentração apresentada pelo grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de fósforo em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Concentração de atrazina (ppb)	Porcentagem de fósforo (média $\pm$ desvio-padrão)		
	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	0.146 $\pm$ 0.0114	0.150 $\pm$ 0.0158	0.170 $\pm$ 0.0000
2	0.146 $\pm$ 0.0089	0.150 $\pm$ 0.0100	0.184 $\pm$ 0.0089
20	0.146 $\pm$ 0.0114	0.160 $\pm$ 0.0140	0.178 $\pm$ 0.0084
200	0.146 $\pm$ 0.0114	0.156 $\pm$ 0.0114	0.180 $\pm$ 0.0158

Foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de fósforo aos 60 dias de incubação em relação aos 20 dias de incubação em todos os grupos tratados com atrazina (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb), o que não foi verificado no grupo controle (Figura 5).

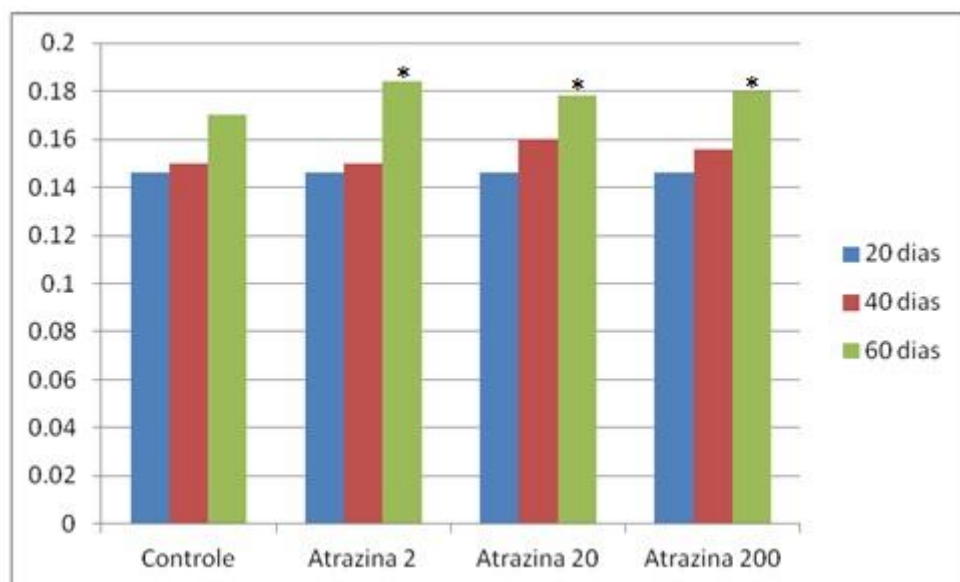


Figura 5 – Porcentagem média de fósforo nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

Foi evidenciada presença de fósforo em todas as cascas de ovos de *P. expansa* estudadas, diferente do que foi descrito por Sahoo, Sahoo e Mohanty-Hejmadi (1998), que apontaram ausência de fósforo na espécie *Lepidochelys olivacea* (tartaruga oliva). Packard, Phillips e Packard (1992) afirmam que a quantidade de fósforo na casca do ovo é desprezível, e o vitelo é a única fonte significativa de fósforo para o desenvolvimento. Esses autores afirmam que a quantidade de fósforo no conteúdo dos ovos não varia como uma função da

incubação ou do ambiente hídrico. O conteúdo dos ovos estudados por esses autores continha a mesma quantidade de fósforo, independentemente do dia da colheita ou do ambiente hídrico.

A ausência de diferenças estatisticamente significativas nos grupos tratados em relação ao grupo controle mostrou que a exposição ao herbicida atrazina não provocou alterações na concentração de fósforo das cascas de ovos de *P. expansa* dentro dos mesmos períodos de incubação.

As diferenças estatisticamente significativas encontradas no teor de fósforo aos 60 dias de incubação em relação aos 20 dias de incubação nos grupos tratados, mostram alterações ao longo do período de incubação, diferente do que foi evidenciado no grupo controle, onde estas diferenças não foram encontradas. Este aumento no teor de fósforo da casca ao longo da incubação induzido pela atrazina pode produzir alterações embrionárias que merecem investigação.

4.1.2 Cálcio

Diferenças estatisticamente significativas na concentração de cálcio nos grupos tratados com atrazina em diferentes concentrações (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb) não foram encontradas quando comparadas a concentração apresentada pelo grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem de cálcio em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Porcentagem de cálcio (média $\pm$ desvio-padrão)			
Concentração de atrazina (ppb)	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	10.002 $\pm$ 0.0630	11.340 $\pm$ 0.0964	12.470 $\pm$ 0.0566
2	10.024 $\pm$ 0.0523	11.220 $\pm$ 0.2264	12.550 $\pm$ 0.1522
20	10.404 $\pm$ 0.2301	11.464 $\pm$ 0.2384	12.556 $\pm$ 0.2482
200	10.424 $\pm$ 0.2150	11.626 $\pm$ 0.2281	12.528 $\pm$ 0.2552

Encontraram-se diferenças estatisticamente significativas na concentração de cálcio aos 40 e 60 dias de incubação em relação aos 20 dias de incubação em todos os grupos tratados com atrazina (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb), bem como no grupo controle (Figura 6).

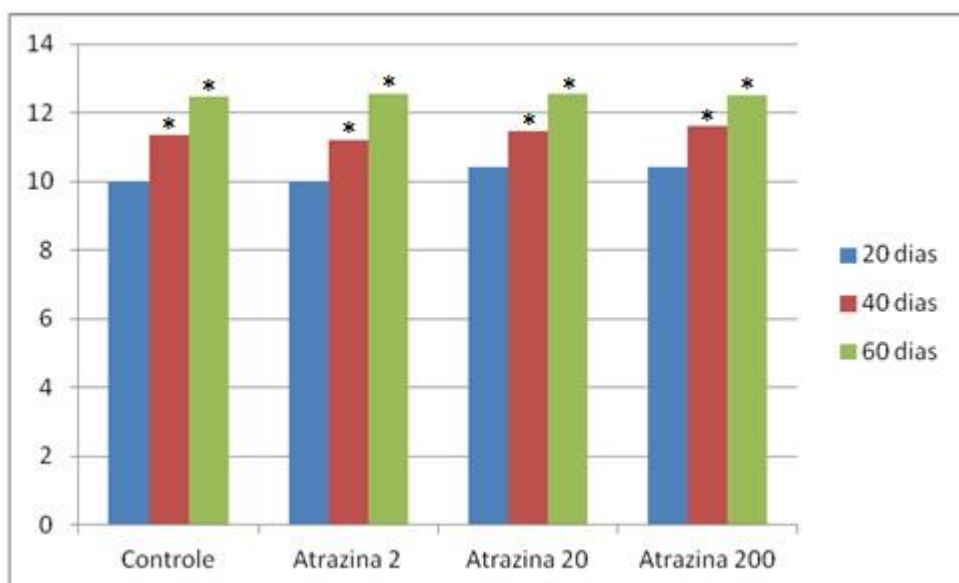


Figura 6 – Porcentagem média de cálcio nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

A exposição ao herbicida atrazina não provocou alterações na concentração de cálcio das cascas de ovos de *P. expansa*, uma vez que diferenças estatisticamente significativas na concentração de cálcio nos grupos tratados em comparação ao grupo controle não foram encontradas.

Durante a incubação houve aumento na concentração de cálcio das cascas de ovos de *P. expansa*, sendo que essa concentração aos 40 e 60 dias foi significativamente maior em relação aos 20 dias nos grupos tratados e grupo controle, corroborando com os achados de Packard, Phillips e Packard (1992), que analisaram fontes de minerais em cascas de ovos de *Iguana iguana* (iguana verde) expostos a diferentes ambientes hídricos e concluíram que o cálcio total aumentou em ambos os grupos de ovos, mas aqueles expostos às condições úmidas continham mais cálcio na eclosão do que aqueles expostos a ambientes secos.

Em oposição Packard, Packard e Gutzke (1984) descreveram declínio no teor de cálcio nas cascas de *Coluber constrictor* (corredora azul) e Cox et al. (1984) 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 na espécie *Lepidochelys olivacea*. A quantidade de cálcio presente na gema-albúmen

satisfaz apenas 40% da quantidade total de cálcio necessário pelas crias durante o seu desenvolvimento normal. Os 60% restantes são fornecidos pela casca do ovo.

Lawniczak e Teece (2005) evidenciaram que a mobilização de cálcio pode depender da quantidade relativa disponível na gema em relação ao exigido pelo desenvolvimento da tartaruga da espécie *Chelydra serpentine*. Se a gema contém cálcio suficiente para o desenvolvimento do embrião, então a utilização deste elemento a partir da casca de ovo pode ser desnecessária.

Miller e Jones (1990) apontam que os embriões da maioria dos répteis ovíparos esgotam praticamente todo o seu suprimento de cálcio da gema ao longo do desenvolvimento. Embora, Cox et al. (1984) apontem a hipótese de que dentre os répteis apenas os Squamatas não dependam da casca de ovo como fonte de cálcio; acredita-se que essa relação da disponibilidade de cálcio na gema e a utilização desse cálcio do vitelo durante o desenvolvimento do embrião pode estar relacionada à manutenção e/ou aumento do teor de cálcio evidenciado nas cascas de ovos de *P. expansa*.

4.1.3 Matéria mineral

Não se evidenciou diferenças estatisticamente significativas na concentração de matéria mineral nos grupos tratados com atrazina em diferentes concentrações (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb) em relação a concentração apresentada pelo grupo controle (Tabela 3). O que denota que a exposição a atrazina não provocou alterações na concentração de matéria mineral de *P. expansa* dentro do mesmo período de incubação.

Tabela 3 – Porcentagem de matéria mineral em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Porcentagem de matéria mineral (média $\pm$ desvio-padrão)			
Concentração de atrazina (ppb)	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	16.698 $\pm$ 0.2109	17.382 $\pm$ 0.2322	18.466 $\pm$ 0.2150
2	16.394 $\pm$ 0.5161	17.414 $\pm$ 0.3061	18.614 $\pm$ 0.0934
20	16.664 $\pm$ 0.1539	17.692 $\pm$ 0.1808	18.622 $\pm$ 0.1171
200	16.554 $\pm$ 0.1348	17.716 $\pm$ 0.2152	18.590 $\pm$ 0.1306

Já o tempo de incubação provocou modificações na concentração de matéria mineral das cascas de ovos de *P. expansa*. Comparando-se a concentração de matéria mineral apresentada aos 40 e 60 dias com a concentração encontrada aos 20 dias de incubação nos grupos tratados (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb) e controle foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (Figura 7).

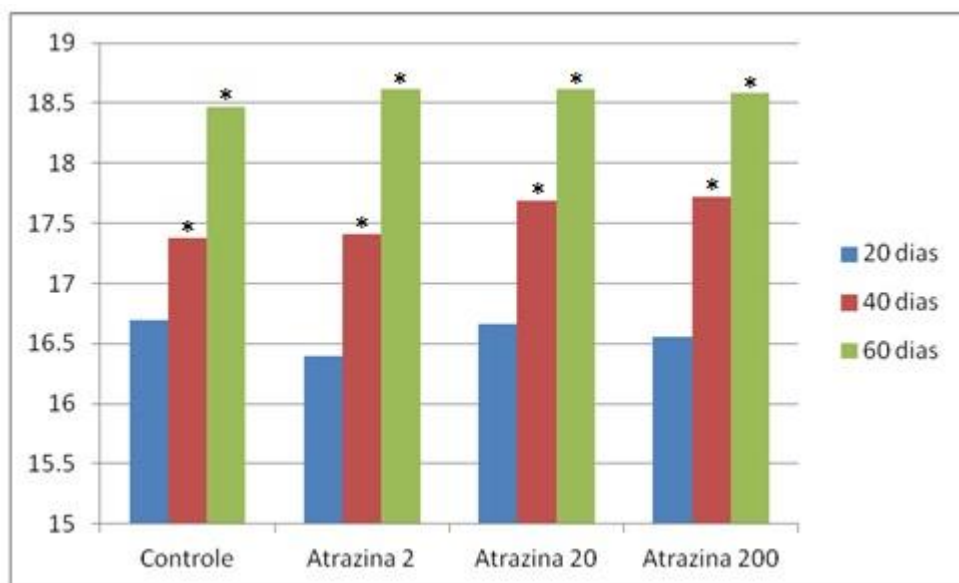


Figura 7 – Porcentagem média de matéria mineral nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

Não foram encontradas informações em literatura sobre concentração de matéria mineral em cascas de outros répteis que permitissem confrontar com os resultados obtidos no presente estudo, porém fica evidente que a exposição à atrazina no primeiro dia de incubação não alterou o padrão de alteração desta variável ao longo da incubação.

4.1.4 Extrato etéreo

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na concentração de extrato etéreo no grupo tratado com atrazina 2 ppb em relação ao controle, onde foi verificada diminuição da concentração de extrato etéreo e no grupo tratado com atrazina 200 ppb em relação ao grupo controle, onde foi

verificado aumento da concentração de extrato etéreo, ambos aos 60 dias de incubação (Tabela 4), o que mostra influência da exposição ao herbicida atrazina nas doses 2 e 200 ppb na concentração de extrato etéreo no último terço da incubação.

Tabela 4 – Porcentagem de extrato etéreo em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Porcentagem de extrato etéreo (média $\pm$ desvio-padrão)			
Concentração de atrazina (ppb)	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	0.074 $\pm$ 0.0114	0.072 $\pm$ 0.0084	0.060 $\pm$ 0.0000
2	0.078 $\pm$ 0.0084	0.070 $\pm$ 0.0100	0.040 $\pm$ 0.0000*
20	0.068 $\pm$ 0.0148	0.060 $\pm$ 0.0000	0.060 $\pm$ 0.0000
200	0.078 $\pm$ 0.0130	0.072 $\pm$ 0.0045	0.080 $\pm$ 0.0000*

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

No grupo tratado com atrazina 2 ppb foi encontrada diferença estatisticamente significativa aos 60 dias de incubação em relação aos 20 dias. Já nos demais grupos tratados (20 ppb e 200 ppb) e no grupo controle não foram encontradas diferenças significativas nem aos 40 nem aos 60 dias de incubação em relação aos 20 dias (Figura 8).

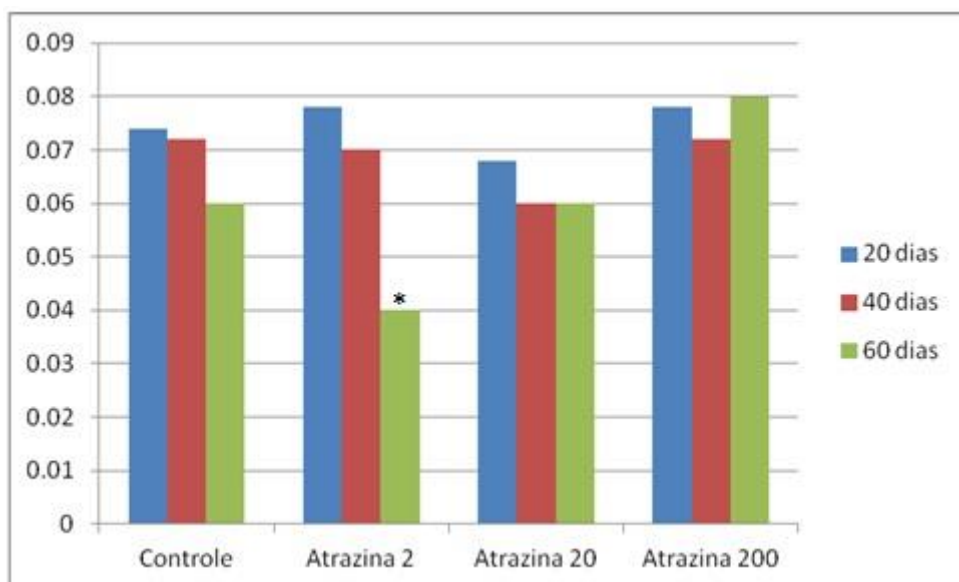


Figura 8 – Porcentagem média de extrato etéreo nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

Estas diferenças em extrato etéreo produzidas pela exposição à atrazina sugerem uma maior investigação, pois alterações na gordura da casca podem interferir com o transporte de gases e líquidos através da casca, afetando o embrião.

4.1.5 Proteína bruta

Diferença estatisticamente significativa foi encontrada na concentração de proteína bruta no grupo tratado com atrazina 2 ppb em relação ao controle, onde foi verificada diminuição da concentração aos 60 dias de incubação (Tabela 5). A diferença encontrada na concentração de proteína bruta no grupo tratado com atrazina 2 ppb em relação ao controle mostra influência da utilização desse herbicida nessa dose sobre a concentração de proteína bruta.

Tabela 5 – Porcentagem de proteína bruta em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Porcentagem de proteína bruta (média ± desvio-padrão)			
Concentração de atrazina (ppb)	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	57.146 ± 0.2784	50.610 ± 0.2375	40.378 ± 0.3737
2	57.038 ± 0.1368	50.670 ± 0.2021	41.134 ± 0.4151*
20	57.584 ± 0.2281	50.264 ± 0.1303	40.380 ± 0.1666
200	57.066 ± 0.4206	50.512 ± 0.1303	40.778 ± 0.4853

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

Encontrou-se redução estatisticamente significativa na concentração de proteína bruta aos 40 e 60 dias de incubação em relação aos 20 dias em todos os grupos, independentemente da exposição à atrazina (Figura 9). Nesse mesmo sentido Cox et al. (1984) mostraram diminuição da concentração de proteína durante a incubação da espécie *Opheodrys vernalis*, sendo que as alterações da proteína da casca do ovo pode também ocasionar modificações no cálcio associado.

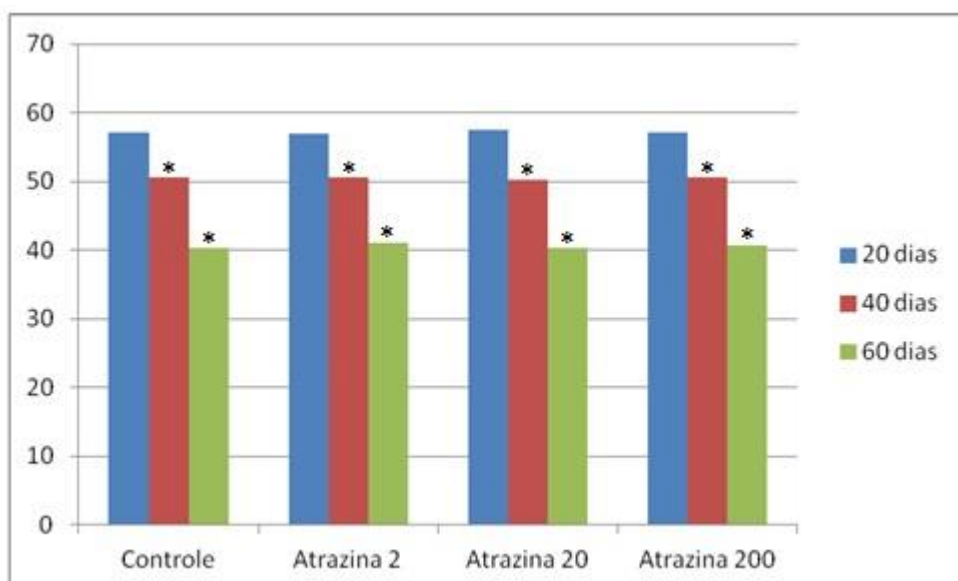


Figura 9 – Porcentagem média de proteína bruta nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

4.1.6 Nitrogênio

Encontrou-se diferença estatisticamente significativa na concentração de nitrogênio no grupo tratado com atrazina 2 ppb em relação ao controle, onde verificou-se diminuição da concentração aos 60 dias de incubação (Tabela 6). O que mostra influência da exposição à atrazina 2 ppb na concentração de nitrogênio.

Tabela 6 – Porcentagem de nitrogênio em cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Porcentagem de nitrogênio (média $\pm$ desvio-padrão)			
Concentração de atrazina (ppb)	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	9.144 $\pm$ 0.0451	8.098 $\pm$ 0.0383	6.460 $\pm$ 0.0596
2	9.130 $\pm$ 0.0245	8.110 $\pm$ 0.0308	6.582 $\pm$ 0.0661**
20	9.216 $\pm$ 0.0385	8.044 $\pm$ 0.0182	6.460 $\pm$ 0.0265
200	9.132 $\pm$ 0.0691	8.096 $\pm$ 0.0498	6.524 $\pm$ 0.0764

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

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na concentração de nitrogênio aos 40 e 60 dias de incubação em relação aos 20 dias de incubação

em todos os grupos tratados com atrazina (2 ppb, 20 ppb e 200 ppb) e no grupo controle (Figura 10).

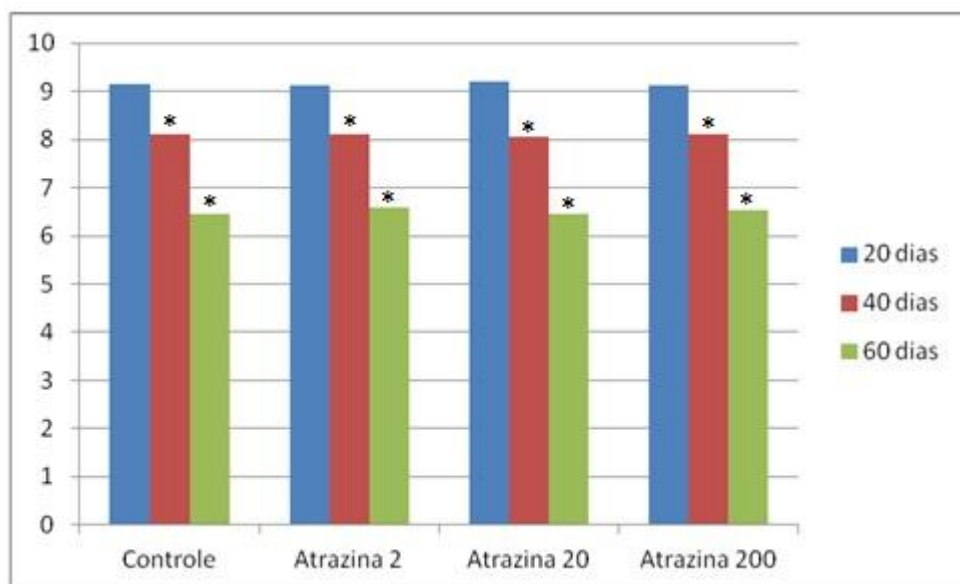


Figura 10 – Porcentagem média de nitrogênio nas cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

4.2 Composição morfológica

4.2.1 Espessura da casca

A espessura média encontrada nas cascas de ovos de *P. expansa* analisadas variou de 0.174 a 0.226 mm (Tabela 7), apresentando-se inferior à relatada em cascas de ovos de *Gallus gallus*, onde a média foi de 0.46 mm. (FERREIRA et al., 2012). Kusuda et al. (2013) encontraram espessuras médias de cascas de ovos de Testudines variando entre 77 e 758 μm .

Houve aumento estatisticamente significativo na espessura da casca dos ovos do grupo tratado com atrazina 20 ppb aos 40 dias de incubação e dos grupos tratados com atrazina 2 ppb, 20 ppb e 200 ppb aos 60 dias de incubação.

Tabela 7 – Espessura das cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, de acordo com o período de coleta.

Concentração de atrazina (ppb)	Porcentagem de espessura (média $\pm$ desvio-padrão)		
	1-20 dias	21-40 dias	41-60 dias
0	0.184 $\pm$ 0.0055	0.184 $\pm$ 0.0055	0.174 $\pm$ 0.0089
2	0.188 $\pm$ 0.0084	0.184 $\pm$ 0.0114	0.220 $\pm$ 0.0000*
20	0.180 $\pm$ 0.0100	0.224 $\pm$ 0.0089*	0.220 $\pm$ 0.0000*
200	0.206 $\pm$ 0.0207	0.202 $\pm$ 0.0217	0.226 $\pm$ 0.0089*

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

Aumentos significativos na espessura foram encontradas também aos 60 dias de incubação em relação aos 20 dias no grupo tratado com atrazina 2 e aos 40 e 60 dias de incubação em relação aos 20 dias no grupo tratado com atrazina 20 (Figura 11).

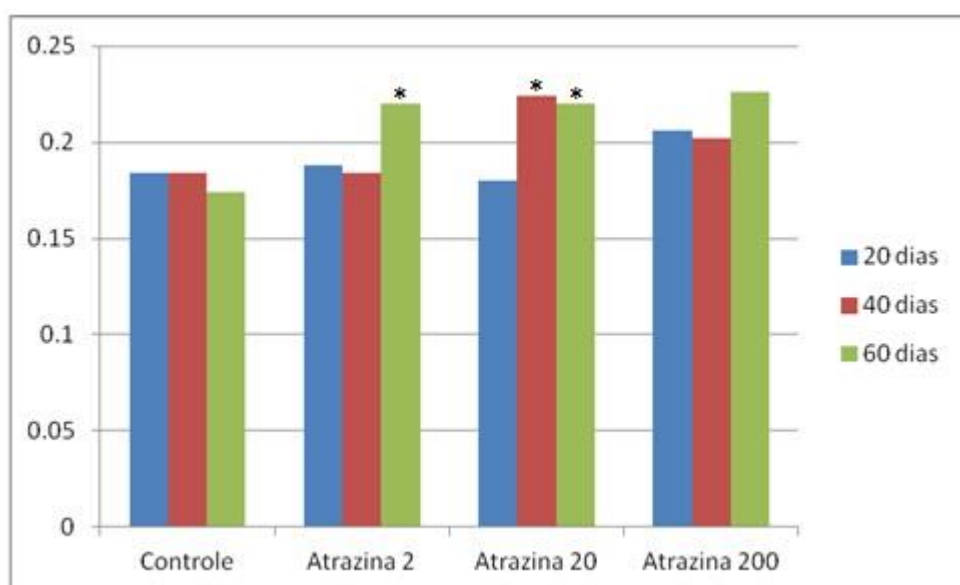


Figura 11 – Espessura das cascas de ovos de *P. expansa* submetidos a exposição a diferentes concentrações de atrazina no primeiro dia de incubação artificial, coletados ao longo da incubação. (*), diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação 20 dias $p < 0.01$.

Os aumentos da espessura verificados podem prejudicar as trocas hídricas e gasosas. De acordo com Ferguson (1981), ovos de jacarés necessitam realizar trocas de fluidos com o ambiente para a manutenção da hidratação e concentração adequada de minerais no embrião. Da mesma forma, Sahoo et al. (1998) afirmam que quelônios necessitam uma maior troca de calor e umidade com o meio externo para que haja a eclosão de embriões saudáveis, o que justifica a necessidade de cascas mais finas em relação a ovos de aves.

4.2.2 Microscopia de luz

A microscopia de luz realizada na membrana interna da casca, com a coloração de Picrosirius, mostrou a presença de fibras de colágeno (longitudinais), caracterizadas como estruturas finas e alongadas com tonalidade rósea, estriações transversais e presença de núcleos em toda a estrutura. Diferenças morfológicas da casca de *Podocnemis expansa* entre os diferentes grupos e tempos de incubação não foram evidenciadas (Figura 12).

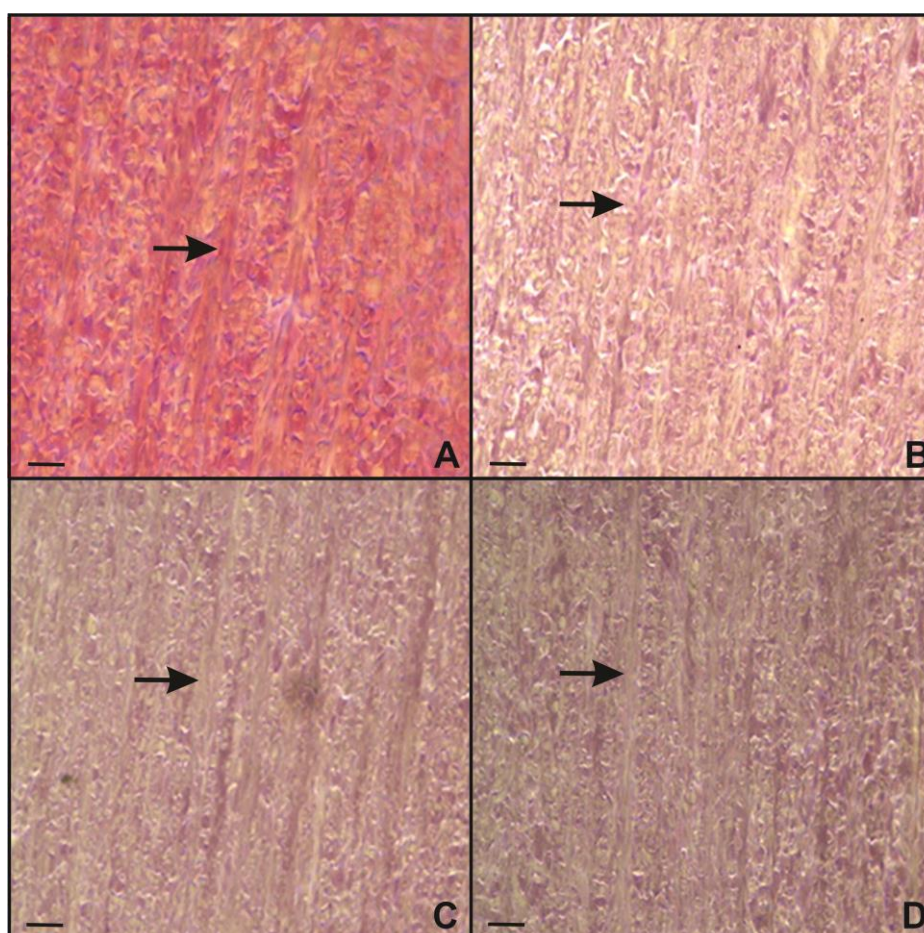


Figura 12 – Fotomicrografias em microscopia de luz de cascas de ovos de *Podocnemis expansa*. (A), três dias de incubação; (B), 20 dias de incubação; (C), 40 dias de incubação; (D), 60 dias de incubação. (Setas), fibras de colágeno (longitudinais). Coloração: Coloração Picrosirius. Aumento 100x. Barra: 10um.

Nos cortes histológicos, as estruturas finas e alongadas com tonalidade rósea identificadas nas cascas de ovos de *P. expansa* na microscopia de luz se assemelham à descrição feita por Glerean (2003) para fibras de colágeno Tipo I. As mesmas estruturas, classificadas como fibras de colágeno, também foram

observadas por Roland (1982) em cascas de ovos de galinha. Junqueira e Carneiro (1995) descrevem que as fibras de colágeno são constituídas por moléculas alongadas e paralelas e ressaltam que por serem longas e de trajeto tortuoso sua morfologia não é fácil de ser estudada nos cortes histológicos. Não foram encontrados relatos em répteis.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura mostrou claramente a existência de poros em uma casca bastante calcificada. Ficou clara a existência de cristais em forma de agulhas (espículas) dispostos em arranjo concêntrico ao redor dos poros. Observou-se que a camada calcária da casca de ovos de *P. expansa* é formada por várias espículas organizadas de forma radial, paralelas à sua superfície (Figura 13). Não foram encontradas diferenças morfológicas da casca de *P. expansa* entre os grupos experimentais.

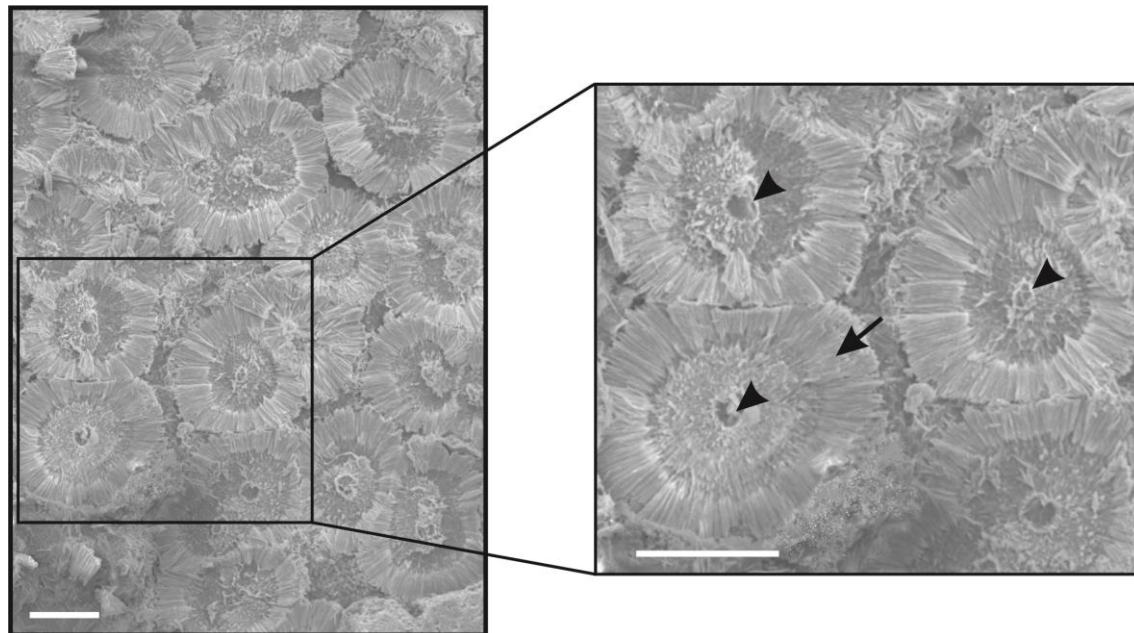


Figura 13 – Fotoeletromicrografia em microscopia eletrônica de varredura de cascas de ovos de *Podocnemis expansa*. Destaque para os poros (ponta da seta) e para os cristais em forma de agulhas dispostos em arranjo concêntrico ao redor do mesmo (seta). Aumento de 100x e 1.500x, respectivamente. Barra: 10um.

A presença de poros em uma casca calcificada registrada pela microscopia eletrônica de varredura está em concordância com os achados de Bryan (2005) que ao estudar as cascas de ovos de *Alligator mississippiensis* (jacaré americano) em

três lagos contaminados no centro-norte da Flórida, identificou poros do tipo cratera desenvolvidos na superfície exterior de uma casca bem calcificada em todos os ovos.

A presença e disposição dos poros e espículas nas cascas de ovos de *P. expansa*, está em concordância com o que foi descrito em *Chelonia mydas* (AL-BAHRY et al., 2009), onde o centro de cada grupo de espículas tinham um ou vários poros.

Estudo de Kusuda et al. (2013) examinou por microscopia eletrônica e difração de raios-X as cascas de ovos de 56 Testudines e propôs uma classificação em seis tipos com base na 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, com unidades de casca composta de núcleos mamilares, além de uma camada única paliçada também calcificada com cristais de aragonita; o tipo IV, com características semelhantes ao do tipo III; o tipo V, com unidades de casca composta de núcleos mamilares, além de duas camadas em paliçada; e, o tipo VI, com uma camada de cutícula calcificado com cristais de calcita com a mesma estrutura que o tipo V.

As análises das cascas de ovos de *P. expansa* sugerem maior proximidade de características com o tipo II, descrito por Kusuda et al. (2013). Entretanto, são necessárias novas análises, com a utilização de métodos mais próximos àqueles adotados por estes autores, para que se possa afirmar que os ovos de *P. expansa* pertençam ao tipo II.

Destaca-se que embora se tenha verificado que a exposição ao herbicida atrazina ocasionou modificações na concentração de extrato etéreo, proteína bruta e nitrogênio e também na espessura das cascas de ovos de *P. expansa*, essa exposição foi feita em dia único e com a utilização do produto técnico (sem surfactante), situações essas diferentes do que aconteceria em uma contaminação no ambiente.

5 CONCLUSÃO

A incorporação do produto técnico atrazina ao substrato no primeiro dia de incubação artificial de ovos de *P. expansa*:

- interfere nas variações que ocorrem ao longo da incubação em teor de fósforo, extrato etéreo e espessura das suas cascas;
- interfere, no último terço da incubação artificial, nos teores de extrato etéreo (concentrações 2 e 200 ppb), proteína bruta (concentração 2 ppb) e nitrogênio (concentração 2 ppb) , bem como aumenta a espessura das cascas em todas as doses;
- não altera a morfologia das cascas.

REFERÊNCIAS

AL-BAHRY, S. N.; ET AL. Ultrastructural features and elemental distribution in eggshell during pre and post hatching periods in the green turtle, *Chelonia mydas* at Ras Al-Hadd, Oman. **Tissue and Cell**, v. 41, p. 214-221, 2009.

ANDERSON, C. B.; CARTER, T. C. The hen's egg: Shell craking at impact a heavy, stiff body and factors that affect it. **Bretish Poultry Science.**, v. 17, 1994, p. 613.

ANDRADE, M. **Pratos, lendas, estórias e superstições de alguns peixes do Amazonas (Folclore do peixe do Amazonas)**. Manaus: Edição Governo do Estado, 1988. 593 p.

ANDRADE, P. C. M. **Criação e manejo de quelônios no Amazonas**. 2. ed. Manaus, AM: Pro Várzea, 2008. 528 p.

AR, A.; ET AL. The avian egg: water vapour conductance, shell thickness, and functional pore area. **Condor**, v.76, p.153–158 , 1974.

ARMAS, E. D. D.; ET AL. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, p. 1119-1127, 2007.

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

BENVENUTO, F.; ET AL. Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry II. **Analytical Bioanalysis Chemical**, v. 397, p. 2791–2805, 2010.

BINTEIN, S.; DEVILLERS, J. Evaluating the environmental fate of atrazine in france. **Chemosphere**, v. 32, n.12, p.2441-2456, 1996.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

BOWERS, N.; ET AL. Comparative evaluation of soil toxicity using Lettuce seeds and soil ciliatesII. **Environmental Toxicology**, v.16, n. 2, p. 207-213, 1997.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. **Portaria nº 518, de 25 de março de 2004**. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 23 set. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** (Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25/06/62, 1.236 de 02/09/94, nº 1.812 de 08/02/96 e nº 2.244 de 05/06/97). DIPOA– MAPA, Brasília, DF, 1997. 241 p.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei nº 7.082, de 11 de julho de 1989**. Brasília, DF, 1989. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 20 out. 2013.

BRYAN, T. A. **Morphological and constituent analyses of american alligator (*alligator mississippiensis*) eggshells from contaminated and reference lakes. Florida, university of Florida**. 2005. 45 f. Thesis (Graduate of master of science), School of the University of Florida, Florida, 2005.

CABRAL, M. F.; ET AL. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.

CERDEIRA, L. A.; ET AL. Lixiviação de atrazina em solo em área de recarga do Aquífero guarani. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v 4, n. 2, p. 92-101, 2005

CHRISTENSEN, V. L. Distribution of pores on hatching and nonhatching turkey eggs. **Poultry Science**, v. 62, p. 1312-1316, 1983.

CHRISTOFFOLET, P. J.; OVEREJO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2. ed. Campinas: Associação brasileira de ação à resistência de plantas aos herbicidas, 2004.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Métodos analíticos**. Brasília, Ministério da Agricultura e dos Abastecimentos, 1998, 199p.

COUTINHO, C. F. B.; ET AL. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

COX, D. L.; ET AL. External incubation alters the composition of squamate eggshells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 79B, n. 3, p. 481-187, 1984.

DIERKSMEIER, G. **Resíduos, efectos y presencia en la médio**. Ciudad de La Habana, ed. Científico técnica, 2001.

DORES, E. F. G. C; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – análise preliminar II. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 27-36, 2001.

DORNELLES, A. M. G.; QUINTANILHA, L. C. **Relatório do abate experimental da tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa*) criada em cativeiro**. Brasília: IBAMA-RAN, 2003.

EWERT, M. A.; NELSON, C. E. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. **Copeia**, v. 1991, n. 1, p. 50-69, 1991.

EWERT, M. A. The Embryo and its Egg: Development and Natural History. In: HARLESS, M.; MORLOCK, H. (eds.). **Turtles Perspectives and Research**. Wiley, New York: EEUU, 1979. p. 333-413.

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.

FERREIRA JR., P. D. 2003. 296 f. **Influência dos processos sedimentológicos e geomorfológicos na escolha das áreas de nidificação de *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-amazônia) e *Podocnemis unifilis* (tracajá), na bacia do rio Araguaia**. Tese (Doutorado em Geologia), Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Geologia, Ouro Preto, 2003.

FERRI, V. **Turtles & Tortoises**: a firefly guide. Michigan: Firefly Books, 2002.

FILIZOLA, H. F.; ET AL. Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guairá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2002.

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

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora da UNB, 2005. 392 p.

HALLBERG, G.R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 26, p. 299-367, 1989.

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

IUCN. 2013. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 3 nov. 2013.

IVERSON, J. B. **A revised checklist with distribution maps of the turtles of the world**. Richmond, Indiana: Printed Privately, 1992. 363 p.

IVERSON, J. B. Reproduction in freshwater and terrestrial turtles of north Florida. **Herpetologica**, v. 33, n. 2, p. 205-212, 1977.

JACOMINI, A. E. **Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves limnicos *Anodontides trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)**. 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia comparada), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 433 p.

KUSUDA, S.; ET AL. Diversity in the Matrix Structure of Eggshells in the Testudines (Reptilia). **Zoological Science**, v. 30, p. 366-374, 2013.

LAWNICZAK, C. J.; TEECE, M. A. Spatial Mobilization of Calcium and Magnesium from the Eggshell of the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. **Journal of Herpetology**, v. 39, n. 4, p. 659-664, 2005.

LUZ, V. L. F.; REIS, I. J. Biologia, Manejo e Conservação de Répteis. Ordem dos Testudines. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGICOS, IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE ZOOLOGICOS. Área Técnica de Criação de Testudines em Cativeiro, Centro Nacional dos Testudines da Amazônia, CENAQUA, **Anais...** p. 5-8. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, Salvador: 1998.

MALLMANN, M.T.O. **Influência da temperatura de incubação na determinação sexual em *Geochelone carbonaria* (Spix,1824) (Reptilia, Testudines, Testudinidae)**. 1994. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

MARTINS, M.; MOLINA, F. B. Panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília e Belo Horizonte: MMA e Fundação Biodiversitas, 2008. p. 327-334.

MATHIES, T.; ANDREWS, R. M. Does reduction of the eggshell occur concurrently with or subsequent to the evolution of viviparity in phrynosomatid lizards. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 71, p. 719–736, 2000.

MELI, G.; ET AL. Metabolic profile of atrazine and nitrosoatrazine in rat urine. **Bulletin environmental contamination toxicology**, v. 48, n. 5, p. 701-708, 1992.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; LIMA, M. das G. H.; SILVA, A. V. da; ANDRADE, P. C. M. Criação e Manejo de Testudines no Amazonas. Projeto Diagnóstico da Criação de Animais Silvestres no Estado do Amazonas. In: I SEMINÁRIO DE CRIAÇÃO E MANEJO DE TESTUDINES DA AMAZÔNIA OCIDENTAL. cap.12. **Anais...** FAPEAM/SDS, Manaus, 477 p., cap.12, 2004.

MILHOME, M.A.L.; ET AL. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do baixo Jaguaribe, CE. Artigo Técnico, **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.3, 2009.

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

MROSOVSKY, N.; PIEAU, C. Transitional range of temperature, pivotal temperature and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. **Amphibia - Reptilia**, v. 12, n. 2, p.169-179, 1991.

NEUMAN-LEE, L. A.; JANZEN, F. J. Atrazine exposure impacts behavior and survivorship of neonatal turtles. **Herpetologica**, v. 67, n. 1, p. 23–31, 2011.

NUNES, G. S.; RIBEIRO, M. C. Pesticidas: uso, legislação e controle. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, pp. 31-34, 1999.

OSBORNE, L.; THOMPSON, M. B. Chemical Composition and Structure of the Eggshell of Three Oviparous Lizards. **Copeia**, v. 3, p. 683-692, 2005.

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

PACKARD, M. J. Ultrastructural morphology of the shell and shell membrane of eggs of Common Snapping Turtles (*Chelydra serpentina*). **Journal of Morphology**, v. 165, p. 187–204, 1980.

PACKARD, M. J.; PACKARD, G. C.; GUTZKE, W. H. N. Calcium metabolism in embryos of the oviparous snake *Coluber constrictor*. **Journal of experimental Biology**, v. 110, p. 99-112, 1984.

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.

PACKARD, G. C.; TAIGEN, T. L.; PACKARD, M. J.; SHUMAN, R. D. Water vapor conductance of testudinian and crocodilian eggs (Class Reptilia). **Respiratory Physiology**, v. 38, p.1–10, 1979.

PIEAU, C. Temperature variation and sex determination in reptiles. **BioEssays**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 1996.

PINHEIRO, A.; SILVA, M. R.; KRAISCH, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, **SCREGA** – Vol. 7, no. 2, p. 17-26, jul./dez. 2010

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A Vida dos Vertebrados**. São Paulo (SP): Atheneu, 2003. 699 p.

PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Caracas: Society for Study of Amphibians and Reptiles, 1984. 403 p.

RICART, M.; ET AL. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. **Journal of Hydrology**, v. 383, p. 52–61, 2010.

RODRIGUES, R. M. Quelônios. In: _____. **A fauna da Amazônia**. Belém: CEJUP, 1992, p. 209-214.

ROHR, J. R.; MCCOY, K. A. A qualitative metaanalysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 20–32, 2010.

ROLAND, D. A. Relationship of body-checked eggs to photoperiod and breaking strength. **Poultry Science**, v. 61, n. 12, p. 2338-2343, 1982.

RUEDA-ALMONACID, J. V.; ET AL. **Las Tortugas y Los Cocodrilianos de los Países Andinos del Trópico**. Bogotá, Colômbia: Panamericana, Formas e Impresos, 2007. 538 p.

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.

SALABERRIA, I.; ET AL. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and applied pharmacology**, v. 234, n. 1, p. 98-106, 2009.

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

SILYN-ROBERTS, H.; SHARP, R. M. Crystal growth and the role of the organic network in eggshell biomineralization. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. B227, n. 303–324, 1986.

SILYN-ROBERTS, H.; SHARP, R. M. Preferred orientation of calcite and aragonite in the reptilian eggshells. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. B225, n. 445–455, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista brasileira de répteis**. 2012. Disponível em: http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis/ListaRepteis30Setembro2012-INGLES.pdf. Acesso em: 15 out. 2013.

SOUZA, B. S. **Avaliação do processo H₂O₂/UV como pós-tratamento e remoção da atrazina de um efluente secundário de ETE para fins de reuso**. 2011. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, R. A. M. **Comparação de diferentes protocolos terapêuticos na cicatrização de carapaça de trigre-d'água. (Trachemys ssp.)**. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOUZA, V.; CARBO, L.; DORES, E. F. G. C.; RIBEIRO, M. L.; VECCHIATO, A. B.; WEBER, O. L. S.; PINTO, A. A.; SPADOTTO, C. A. & CUNHA, M. L. F. Determinação de pesticidas em água de poços tubulares em áreas de cultura de algodão na Microrregião de primavera do leste, mato grosso. **SUPLEMENTO**, XIII Congresso Brasileiro de águas subterrâneas. 2004.

TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C. M. P.; MACHADO, S. A. S.; CRESTANA, S.; VIEIRA, E. M.; MARTIN-NETO, L. Mecanismos de sorção da atrazina em solos: estudos espectroscópicos e polarográficos. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n. 14, p.1-7, p. 1413-6244, 1996.

UETA, J.; ET AL. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, v.10, p.10-13, 1999.

USEPA - *Environmental Protection Agency*. **Pesticides definitions**. 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>>. Acesso em: 13 out. 2013.

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.

VALENZUELA, N.; BOTERO, R.; MARTINEZ, E. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. **Herpetologica**, v. 53, n. 3, p. 390-398, 1997.

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.

VANZOLINI, P. E. On the eggs of Brazilian *Podocnemis* (Testudines, Podocnemididae). **Biologia Geral e Experimental**, v. 2, n. 2, p. 3-17, 2001.

XIANG, J. I.; ET AL. Incubation and Utilization of Energy and Material during Embryonic Development in Eggs of *Naja naja atra*. **Journal of Herpetology**, v. 3 n. 2, p. 302-306, 1997.